**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์**

**เรื่อง**

# การศึกษาปริมาณ allicin ที่ต่างกันระหว่างกระเทียมโทน *Allium ampeloprasum* และกระเทียมกลีบ *Allium sativum*

A study of allicin content in garlics of the single bulb garlic *Allium ampeloprasum* and common garlic *Allium sativum.*

**โดย**

**นศภ. อนาวิล รอดสม รหัสนิสิต** 56210154
**นศภ. ธฤษ มกรสุต รหัสนิสิต** 56210159

**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต**
**ปีการศึกษา** 2560
**คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**

**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์**

**เรื่อง**

# การศึกษาปริมาณ allicin ที่ต่างกันระหว่างกระเทียมโทน *Allium ampeloprasum* และกระเทียมกลีบ *Allium sativum*

A study of allicin content in garlics of the single bulb garlic *Allium ampeloprasum* and common garlic *Allium sativum.*

**โดย**

**นศภ. อนาวิล รอดสม รหัสนิสิต** 56210154
**นศภ. ธฤษ มกรสุต รหัสนิสิต** 56210159

**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตร์บัณฑิต**
**ปีการศึกษา** 2560
**คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**

# คำนำ

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์เรื่องนี้จัดทำขึ้นเนื่องมาจาก ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา การดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Resistance: AMR) ได้ทวีความรุนแรงมากขึ้นและยังไม่มีแนวโน้มจะลดลงแต่กลับกันที่แทบไม่มียาต้านเชื้อจุลชีพชนิดใหม่ที่ออกสู่ท้องตลาด คณะผู้วิจัยสนใจในการศึกษาหาสารที่ออกฤทธิ์ในต้านเชื้อจุลชีพ ทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกกระเทียมโทน ซึ่งเป็นพืชในสกุล Allium ที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ ต้านจุลชีพได้ทั้ง แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส แต่จะมีรูปพรรณที่แตกต่างจากกระเทียมทั่วไป และงานวิจัยเกี่ยวกับกระเทียมโทนยังมีไม่มากนักเมื่อเทียบกับกระเทียมปกติ มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและหาปริมาณ allicin ในกระเทียมที่ต่างกันของกระเทียมโทนและกระเทียมจีน โดยพบว่าปริมาณ allicin ในกระเทียมโทนมีมากกว่ากระเทียมจีนและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดี

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ สุนันต์ ใจสมุทร ที่ได้ให้คำแนะนำ ชี้แนะและให้การตรวจสอบด้วยดีเสมอ คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า การวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ศึกษา เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาทางด้านศึกษาวิจัยทางเภสัชศาสต์ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับทุกประการ

คณะผู้วิจัย

20 ธันวาคม พ.ศ. 2560

**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา** 2560

**เรื่อง** การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพขององค์ประกอบทางเคมีในกระเทียมโทนและความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีระหว่างกระเทียมที่มีสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน


**ผู้จัดทาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์**

1.นสภ. อนาวิล รอดสม รหัสนิสิต 56210154

2.นสภ. ธฤต มกรสุต รหัสนิสิต 56210159

**อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์**

1. ดร. สุนันต์ ในสมุทร


---

## บทคัดย่อ


จากรายงานการดื้อยาของเชื้อจุลชีพที่เพิ่มมากขึ้น แต่มียาใหม่ที่ระบุว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ดื้อยาอยู่ปัจจุบันได้น้อยมาก ทำให้ผู้วิจัยสนใจหาสารที่มีฤทธิ์ ในการต้านเชื้อจุลชีพ จึงได้เลือกกระเทียมโทน (*Alliuim ampeloprasum*) ซึ่งเป็นพืชในสกุล allium ที่มีการรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพมากมาย และการเปรียบเทียบสารสำคัญในปริมาณแตกต่างจากสองสายพันธุ์คือกระเทียมโทนสายพันธุ์ *A. ampeloprasum* และกระเทียมจีน *A. sativum* ซึ่งมีสารกลุ่ม organosulfur ที่พบมากในกระเทียมและเป็นสารหลักในกลุ่มนี้คือ allicin นำมาสกัดด้วย 20 % ethanol พบว่าเมื่อเทียบกับกระเทียมจีน *A. sativum* กระเทียมโทนมีปริมาณของ allicin เท่ากับ 9.066 mg/g ในขณะที่ กระเทียมจีนมีปริมาณ allicin เท่ากับ 0.25 mg/g และฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพของกระเทียมโทนอยู่ในช่วงระหว่างการทดสอบ


ดร. สุนันต์ ใจสมุทร<br>อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Senior ProjectAcademicYear2017

: Antimicrobial activity of phytochemical of single bulb garlic and difference amount of phytochemical in difference morphology of garlic

By

1. Mr. Anawin Rodsom ID 56210154
2. Mr. Tharit Makarasut ID 56210159

Advisor:

1. Dr. Sunan Jaisamut

---

## ABSTRACT

From the report of resistance of the microorganism increased. However, there is a new drug that has shown to have very little antimicrobial activity. We are interested in finding the active substance. To antimicrobial in this study, alluvial (Allium cucumber), an allium species, was reported to have broad spectrum antimicrobial activity. The two species study is different from the garlic. The organosulfur compounds found in garlic and the main constituents in this group are allicin, extracted with 20% ethanol, compared with the different species of garlic *Allium sativum*. Garlic has the same amount of allicin as 9.066 mg/g, while Chinese garlic has an allicin content of 0.25 mg / g. Antimicrobial activity test of garlic on the process.

Dr. Sunan Jaisamut

Major Advisor

# สารบัญ



# สารบัญตาราง

# สารบัญภาพ

# บทที่ 1 บทนำ

จากสถานการณ์การดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย ที่จัดทำโดยคณะกรรมการประสานและบูรณาการงานด้านการดื้อยาต้านจุลชีพ พบว่าในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา การดื้อยาต้านจุลชีพ (Antimicrobial Resistance: AMR) ได้ทวีความรุนแรงมากขึ้นและยังไม่มีแนวโน้มจะลดลง ขณะที่อัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้น แต่จำนวนยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่ออกสู่ท้องตลาดกลับลดลงและแทบไม่มี ในช่วง พ.ศ. 2551-2555 มียาปฏิชีวนะใหม่เพียง 2 ชนิดเท่านั้นและไม่ใช่ยาสำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายขนาน ซึ่งกำลังเป็นภัยคุกคามอย่างสูงในขณะนี้ ผลกระทบจากเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเป็นภาระของทั้งประเทศที่กำลังพัฒนา และประเทศที่พัฒนาแล้วเช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการประมาณการว่าแต่ละปีมีคนจำนวน 2 ล้านคนป่วยจากการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา และในจำนวนนี้ 23,000 คนเสียชีวิต และคิดเป็นความสูญเสียประมาณ 21-34 พันล้านเหรียญสหรัฐ12สำหรับประเทศสมาชิกในกลุ่มสหภาพยุโรป (European Union: EU) คาดว่ามีคนเสียชีวิตจากเชื้อแบคทีเรียดื้อยาประมาณปีละ 25,000 คน และคิดเป็นความสูญเสียประมาณ 1.5 พันล้านยูโรในแต่ละปี

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลกระทบจากเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพต่อสุขภาพและค่าใช้จ่ายของประเทศไทย ในเชื้อดื้อยา 5 ชนิด คือ *Escherichia coli (E. coli), Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae), Acinetobacter baumannii (A. baumannii), Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa*) และ *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) พบว่า การติดเชื้อดื้อยาจำนวน 87,751 ครั้ง โดยในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิตจากเชื้อดื้อยา 38,481 คน (หรือโดยเฉลี่ยเสียชีวิต 104 คน/วัน) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยาอยู่รักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้น 3.24 ล้านวัน มูลค่ายาต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษาเชื้อดื้อยา คิดเป็น 2,539-6,084 ล้านบาท และมูลค่าการสูญเสียทางเศรษฐกิจโดยรวมไม่ต่ำกว่า 40,000 ล้านบาท หรือคิดเป็นประมาณร้อยละ 0.6 ของผลิตภัณฑ์มวลรวมในประเทศ (Gross Domestic Product: GDP) (10) จากสถานการข้างต้นคณะผู้วิจัยใจจึงสนใจที่จะทำการศึกษาค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจลชีพ โดยใช้พืชสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศไทยเป็นหลัก ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกกระเทียมโทน (*A. ampeloprasum*) มาศึกษาวิจัย

กระเทียมเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้ประกอบอาหารและเป็นยารักษาโรคในหลากหลายภูมิภาคทั่วโลกมาตั้งแต่โบราณกาลมาจนถึงปัจจุบัน และมีผลิตภัณฑ์จากกระเทียมออกมมามากมายในท้องตลาดปัจจุบัน กระเทียมเป็นพืชในสกุล allium ที่มีความหลากหลายมากกว่า 600 สายพันธุ์ (3) ในประเทศไทยมีลักษณะสัณฐานวิทยาของกระเทียม ที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือ หัวกระเทียมที่ 1 หัว มีหลายกลีบ กับหัวกระเทียมที่ไม่มีกลีบ คือ กระเทียมโทน โดยมักจะนำมาใช้ในลักษณะที่คล้ายคลึงกันคือประกอบอาหารและรักษาโรค เพียงแต่กระเทียมโทนมักจะถูกนำไปดองเพื่อเก็บไว้กินเป็นอาหารมากกว่าเนื่องจากมีเนื้อเยอะและไม่ค่อยมีการนำไปใช้เป็นยาสมุนไพร

กระเทียมจัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Liliaceae ซึ่งมีลักษณะดังนี้

1. ไม้ล้มลุก มีหัวใต้ดิน มีเยื่อหุ้มหัวหอม
2. ใบ รูปแถบ รูปใบหอกหรือรูปรีเรียงสลับ ระนาบเดี่ยวหรือเรียงเวียนสลับ โคนใบมักมีกาบหุ้มคล้ายลำต้นเทียม ดอกออกเป็นช่อมีก้านดอกโดด ช่อดอกแบบซี่ร่ม มีกาบหุ้มช่อดอก
3. ลักษณะต้นกระเทียม ราก เป็นรากฝอย แผ่กระจายหาอาหารบริเวณผิวดินและลึกไม่เกิน 10-12 นิ้ว
4. ลำต้นใต้ดินชนิด blub แต่ละหัวประกอบด้วยกลีบ (สะสมอาหาร) หลายกลีบเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ บางพันธุ์แต่ละหัวมีเพียงกลีบเดียว เรียกว่า กระเทียมโทน แต่ละกลีบมีเปลือก (sheathing leaf) หุ้มโดยรอบและสามารถแยกออกจากหัวเป็นอิสระได้ แต่ละกลีบสามารถนำไปปลูกได้หนึ่งต้นหรือหนึ่งหัวเป็นอย่างน้อย มีหลายสีแตกต่างกันไปตามพันธุ์ เช่น ขาว ชมพูหรือม่วง รูปทรงของหัวมีหลายแบบตั้งแต่ทรงกลมแป้น กลมรี กลมสูงและขนาดของหัวแตกต่างกันไปตามพันธุ์และสภาพพื้นที่ที่ปลูก เมื่อกระเทียมแก่จะมีแกนแข็ง (ก้านช่อดอก) เจริญงอกออกมาจากส่วนกลางของหัว

แหล่งการเพาะปลูกกระเทียมไทย พบว่ากระเทียมเหมาะที่จะปลูกในที่ที่เป็นดินร่วน หรือ ระบายน้ำได้ดีและมีอุณหภูมิค่อนข้างหนาวเย็นเป็นระยะเวลาหลายเดือนดังนั้นบริเวณเพาะปลูกกระเทียมที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่

1. ภาคเหนือตอนบน : เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา และอุตรดิตถ์
2. และยังพบการเพาะปลูกได้ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : ศรีสะเกษ และ บุรีรัมย์

ชนิดกระเทียมในประเทศไทยแบ่งสายพันธ์

1. กระเทียมโทน *A. ampeloprasum* มีลักษณะใบ มีรูปร่างแคบ ลักษณะแบนยาวประมาณ 1-1.5 ฟุต กว้างประมาณ 1-2.5 ซม. ปลายใบแหลม จำนวนประมาณ 14-16 ใบต่อต้น ดอก เป็นช่อ (umbel) ก้านช่อดอกยาว ดอกติดเป็นกระจุกที่ปลายก้านช่อที่มีลักษณะกลม ประกอบด้วยดอกหลายดอก มีกาบหุ้ม (bract) เป็นจะงอยยาว กลีบดอกมี 6 กลีบ ยาวประมาณ 6 มม. กลีบดอกมีรูปร่างยาวแหลม สีขาวแต้มสีม่วงหรือสีขาวอมชมพู ก้านดอกยาวเล็ก อับเรณู (anther) หันออกไปทางด้านนอกของดอก
2. กระเทียมจีน *A. sativum* มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 150 วัน หรือมากกว่า แต่ถ้าปลูกในบริเวณที่อากาศเย็นไม่มากจะแก่เมื่อมีอายุประมาณ 135 วัน มีลักษณะทั่วไป ได้แก่ หัวมีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 เซนติเมตร เปลือกหุ้มมีสีขาว หรือขาวปนม่วง กลีบมีลักษณะอ้วนใหญ่ ค่อนข้างกลม การจัดเรียงตัวของกลีบไม่เป็นระเบียบ ขนาดกลีบไม่สม่ำเสมอ เนื้อมีกลิ่นฉุนปานกลาง ส่วนใบมีลักษณะอวบใหญ่ และหนากว่าทุกพันธุ์

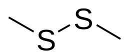
มีการรายงานว่าพืชในสกุล allium นั้นประกอบสารพฤกษาเคมี (phytochemical) หลายชนิด และในความเป็นจริงพืชในสกุลนี้ยังถูกใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาและป้องกันโรคต่างมากมาย ตัวอย่างเช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง โรคอ้วน โรคเบาหวาน ภาวะไขมันในเลือดสูง และมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (4, 5) เป็นต้น สารพฤกษาเคมีที่พบในกระเทียมส่วนใหญ่จะเป็นสารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เรียกสารกลุ่มนี้ว่า organosulfur ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ที่พบในกระเทียม เช่น allicin allysulfide และ thiofulfinates ที่ได้จากการสลายตัวของ alliin โดยเอนไซม์ allinase เมื่อมีการตัด หั่น หรือบดกระเทียม นอกจากนี้ยังพบสารอื่น ๆ เช่น amino acid, phenolic acid และ flavonoid เป็นต้น (1)

ด้วยเหตุนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำกระเทียมโทนมาสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและศึกษาหาความแตกต่างของปริมาณ allicin ระหว่างกระเทียมโทนและกระเทียมจีน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากกระเทียมทั่วไปบวกกับมีการศึกษาวิจัยค่อนข้างน้อย คณะผู้วิจัยหวังอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ศึกษาวิจัยทางเภสัชศาสตร์ในการศึกษาค้นคว้าหายาใหม่ ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

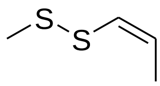
# บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

สกุล Allium แบ่งได้เป็นสายพันธ์หลัก ๆ ดังนี้ *A. porrum*, *A. ampeloprasum*, *A. ampeloprasum* var. *porrum*, *A. ampeloprasum porrum*, *or Allium ampeloprasum* Leek Group โดยสายพันธุ์ของกระเทียมโทนจะใกล้เคียงกับ leek (*A. porrum* L. ) ซึ่งเคยได้รับการยอมรับมาก่อน แม่ว่าบางงานวิจัยยอมรับอนุกรมวิทานของ *A. ampeloprasum* ว่าเป็นสายพันธ์ย่อยของ *A. ampeloprasum* บ้างก็บอกว่าใกล้เคียงกับสายพันธ์ของ wild leeks โดยจะไม่พูดถึงสายพันธ์ย่อย พืชทั้ง 2 มักจะถูกจัดให้อยู่ร่วมกับ leek ว่ามันคือสายพันธ์ *Allium ampeloprasum* (9)

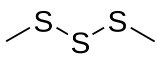
จากการศึกษาสารประกอบหลักในกระเทียมโทน *A. ampeloprasum* พบว่า สารประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเป็นสารกลุ่มที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (sulfur-containing compound) ตัวอย่าง เช่น dimethyl disulfide, methyl propenyl disulfide, propyl propenyl disulfide, dimethyl trisulfide เป็นต้น (9)



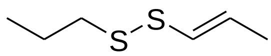
dimethyl disulfide



methyl propenyl disulfide



dimethyl trisulfide

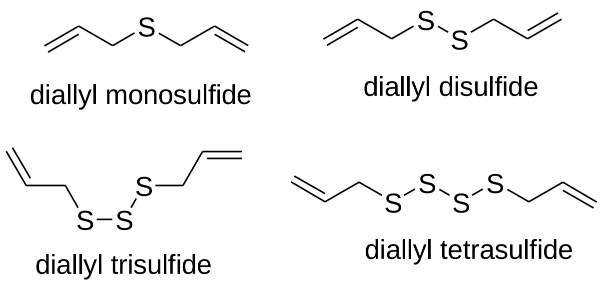


propyl propenyl disulfide

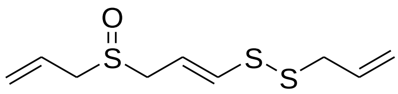
รูปที่ 1 โครงสร้างของสารกลุ่ม ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ

รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพของสารกลุ่ม sulfur-containing สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส และ ปรสิต โดยพบว่า Minimum inhibition concentrations (MICs) ของ Diallylmonosulfides (DMS), Diallyldisulfides (DDS), Diallyltrisulfides (DTS) และ Diallyltetrasulfides (DTTS) มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เช่น MICs ของ DMS, DDS, DTS และ DTTS ในการยับยั้ง Escherichia coli O157:H7 เท่ากับ 25, 1.57, 0.2 and 0.05 mcg/ml ตามลาดับ ในขณะที่ MICs ในการยับยั้ง Bacillus cereus เท่ากับ 100, 12.5, 1.57 และ 0.4 mcg/ml ตามลาดับ (8) และยังพบว่าสารที่เป็นอนุพันธ์ของ allicin ในกระเทียมโทนคือ ajoene และ stable unsaturated disulfide มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่กว้าง (broad spectrum antibacterial activity) มี MICs ต่อแบคทีเรียแกรมบวก

*Bacillus spp*. ที่ถูกยับยั้งน้อยกว่า 5 mg/ml *Staphylococcus aureus, Mycobacterium spp., Lactobacillus plantarum, Streptomyces griseus* และ yeast ถูกยับยั้ง ที่ 20 mg/ml MICs ของ *Micrococcus luteus* และ *Streptococcus spp*. Gram-negative bacteria อย่างเช่น *E. coli, Klebsiella pneumonia* และ *Xanthomonas maltophilia* จะถูกยับยั้งที่ MICs ในช่วง 100-160 mg/ml ไม่มีการยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อให้ MICs ที่ 500 mg/ml (6)




รูปที่ 2 โครงสร้าง DMS - Diallyl monosulfide, DDS - Diallyl disulfide, DTS - Diallyl trisulfide, DTTS - Diallyl tetrasulfide



ajoene

รูปที่ 3 โครงสร้าง Ajoene

ในด้านฤทธิ์ต้านจุลชีพของกระเทียมโทน มีการรายงานว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพของ essential oil จากกระเทียมโทน ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (1, 4, 7 and 10%) ต่อเชื้อยีสต์ 3 ตัวได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* และ *Rhodotorula* sp. และเชื้อรา 3 ตัว ได้แก่ *Aspergillus tamarii*, *Penicillium griseofulvum* and *Eurotium amstelodami* พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ดีมากด้วยความเข้มข้นของ essential oil เพียงแค่ 1% แต่กับเชื้อ *Rhodotorula* sp. พบว่ายับยั้งได้เพียงแค่ 78. 3% ที่ความเข้มข้น 10% นอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพของสายพันธ์ย่อยของกระเทียม*โทน A. ampeloprasum* L. var, *atroviolaceum* (endemic to Kermanshah, Iran) ที่พบว่าสารสกัดจาก ethyl acetate extract มีฤทิ์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อจุลชีพต่อเชื้อแบคทีเรีย Klebsiella pneumonia โดยมีค่า MIC = 250 μg/ml และมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Shigella flexenry* มีค่า

MIC = 250 μg/ml และมีการสันนิฐานว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพของ *A. ampeloprasum* L. var *atroviolaceum* อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณ pinene และ phenol (9)

# บทที่ 3 วัตถุดิบและวิธีการดำเนินการวิจัย

## ตัวอย่างกระเทียม

กระเทียมโทน (*A. ampeloprsum*) และกระเทียมจีน (*A. sativum*) ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยซื้อมาจากตลาดหนองมน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน ซึ่งเป็นกระเทียมทั้งสองสายพันธ์มีแหล่งที่ปลูกอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

## การสกัดและการแยก

การสกัดกระเทียมโทน ทำการนำกระเทียมโทนมาปลอกเปลือกหุ้มกระเทียมออก จากนั้นนำไปปั้นหรือตำให้ละเอียดมากที่สุดจากนนั้น นำไปชั่งน้ำหนักให้ได้ 5 g ไปหมักด้วย 20% ethanol ปริมาตร 50 mL โดยทำการหมักข้ามคืน แล้วจะกรองเอาแต่ส่วนที่เป็นสารละลายที่สกัดออกมาด้วยผ้าขาวบางแล้วไปทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) โดยใช้ความเร็ว 1,000 x g เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 10,000 x g เป็นเวลา 4 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (supernatant) ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 °C

การแยกสารสกัดจากกระเทียมโทนแยกโดยใช้เทตนิคทางโครมาโตกราฟี โดยในตอนแรกเราเลือกวิธี column chromatography โดยใช้เฟสคงที่เป็น silica gel และเฟสเคลื่อนที่เป็น hexane : isopropanol (92:8) แต่ปัญหาคือไม่สามารถแยกสารสกัดจากกระเทียมโทนได้และสารที่เราติดตามคือ allicin เนื่องจากติดคอลัมน์ และยังมีการสลายตัวของสารที่แยกได้ด้วย ซึ่งเราได้ลองทำหลาย ๆ ครั้งก็ยังคงพบเป็นหาเดิมคือสารไม่แยกจากกัน เราจึงแก้ปัญหาด้วยการเปลี่ยนวิธีการแยกโดยเป็น Preparative thin layer chromatography (PLC) นำสารกัดจากกระเทียมโทน 50 mL ทำการแยกแบบหยาบก่อนด้วยการทำ partition ด้วย hexane, dichloromethane และ ethyl acetate จากนั้นนำแต่ละส่วนมาจุดบนแผ่น TLC ขนาด 20 x 20 cm แล้วทำการรันด้วย เฟสเคลื่อนที่เป็น hexane : isopropanol (92:8) ใช้เฟสคงที่เป็น silica gel นำไปส่องดูด้วยตาเปล่าภายใต้แสงยูวี (UV light) ที่ความยาวคลื่น 254 nm จากนั้นทำการขูด silica gel บนแผ่น TLC ที่มีสารที่เราแยกได้ออกมาละลายด้วยตัวทำละลายที่สามารถละลายสารตัวนั้นได้ ซึ่งเราละลายด้วย hexane จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 μm ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้สารละลายระเหยให้หมดจากนั้นนำไปกำจัดความชื้นด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer)

## การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี

การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกสกัดได้จากกระเทียมโดยพิสูจน์ด้วย $^{1}$H-NMR ($^{1}$H- Nuclear magnetic resonance spectroscopy) เทียบกับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาแล้ว โดยนำสารที่แยกได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย $^{1}$H-NMR ซึ่งเราได้ใช้บริการของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ.ชลบุรี ประเทศไทย

## การหาปริมาณสารสำคัญ

การหาปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีของกระเทียมที่มีสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันด้วย HPLC (High-performance liquid chromatography) จะใช้วิธีตาม Lee, Jenny et al (2) โดย sample จะแยกด้วย gradient RP-HPLCs (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) column ที่ใช้จะเป็น C18 column เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 mm ความยาว 150 mm ใช้อัตราการไหลที่ 1mL/min มีเฟสเคลื่อนที่ที่มีระบบเป็นแบบ binary solvent ที่ประกอบด้วย A คือ น้ำและ B คือ ethanol ทำการ run แบบ gradient จะเริ่ม run ด้วย 5% ของ B เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 5-10% ของ B เป็นเวลา 10 นาที ต่อด้วย 10-35% ของ B เป็นเวลา 8 นาที และสุดท้าย 35-100% ของ B เป็นเวลา 15 นาที detector คือ UV light 250 nm และ retention time ของ allicin ที่รายงานอยู่ที่ 18.3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

### การเตรียมตัวอย่าง

นำสารสกัดจากกระเทียมโทนและกระเทียมจีนที่ได้จากการหมักด้วย 20% ethanol ข้ามคืนนำมาปรับ pH ด้วยกรด acetic acid 1.0 M ให้มี pH $\leq$ 5 ซึ่งใช้ประมาณ 10 หยด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 4 นาที นำส่วนใส่มากรองด้วยกระดาษกรอง 0.22 µm เพื่อกำจัดตะกอนที่เหลือและแบคทีเรียออกไป และเตรียม spiked sample เพื่อหาปริมาณ allicin  และตรวจสอบ peak ของ allicin ทำได้โดยการเติมสารมาตรฐานความเข้มข้นสูง ปริมาณน้อยลงในตัวอย่าง (ไม่เกิน 2 % ของปริมาตรตัวอย่าง) (2)

**วิธีการเตรียม spiked sample**

แบ่งสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน เท่าๆกัน ในปริมาณที่เท่ากับที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ส่วนแรกใช้เป็นตัวอย่างปกติ เรียกว่า ตัวอย่างเริ่มต้น (original sample) อีกส่วนหนึ่งนำมาเติมสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอนลงไป ส่วนนี้เรียกว่า spiked sample และหาปริมาณจากการคำนวณด้วยการเทียบความสูงของ peak ที่เราสนใจกับ peak ข้างเคียงที่ได้จาก chromatogram

## สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

**หาอัตราส่วนความสูง**

$$\text{อัตราส่วนความสูงของของ sample หรือ spike} = \frac{\text{ความสูงของ } \boldsymbol{peak} \text{ ที่เราสนใจ}}{\text{ความสูงของ } \boldsymbol{peak} \text{ ข้างเคียง}}$$

$$\text{อัตราส่วนความสูง } \boldsymbol{spike} - \text{อัตราส่วนความสูงของ } \boldsymbol{sample} = \text{อัตราส่วนความสูงของ } \boldsymbol{standard} \text{ ที่เพิ่มเข้าไป}$$

**หาความเข้มข้น**

$$\text{ความเข้มข้นของ } \boldsymbol{sample} = \frac{\text{อัตราส่วนความสูงของ } \boldsymbol{sample}}{\text{อัตราส่วนความสูงของ } \boldsymbol{standard}} \boldsymbol{x} \text{ ความเข้มข้อนของ } \boldsymbol{standard}$$

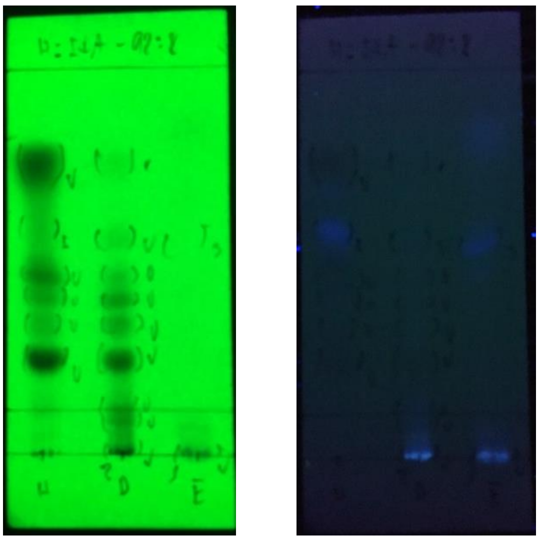
## การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของกระเทียมโทน

นำสารกสัดที่ได้จากกระเทียมโทนทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อ *Bacillus cereus*, *Candida albicans* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้บริการของ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย, ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง, จังหวัดปทุมธานี 12120

# บทที่ 4 ผลการวิจัย

## การแยกสกัดสารและการพิสูจน์โครงสร้างของสารสกัดจากกระเทียมโทน

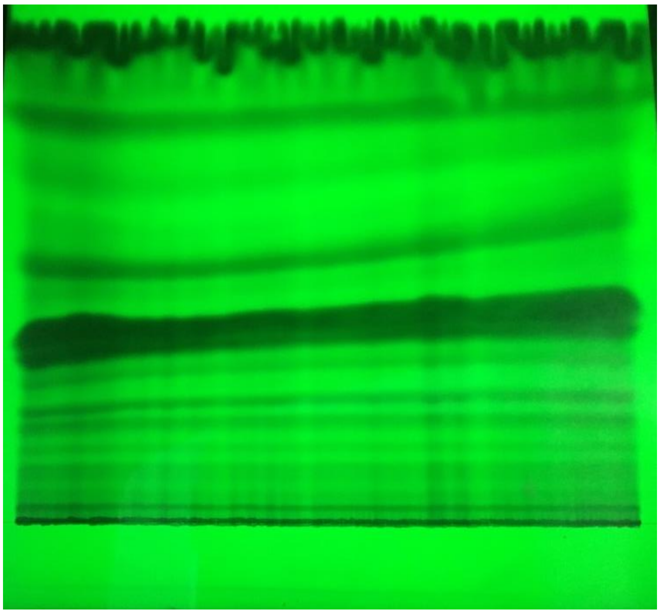
การสกัดกระเทียมโทนทำการสกัดด้วย 20% Ethanol จากนั้นนำไปกรองและทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน เก็บส่วนใสมาทำ แบบหยาบ ๆ ด้วยการ partition ด้วย hexane dichloromethane และ ethyl acetate จากนั้นนำแต่ละส่วนมาทำ TLC (Thin Layer Chromatography) เพื่อตรวจสอบว่าสารที่เราต้องการอยู่ส่วยไหน โดยสารที่เราติดตามคือ allicin พบว่าเมื่อทำการทดสอบ TLC ด้วยเฟสเคลื่อนที่เป็น isopropanol : hexane (92:8) allicin จะขึ้นที่ Rf = 0.45 ในชั้นของ hexane และ dicloromethane มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่แสง UV ความยาวคลื่น 254 nm ดังรูป



( a ) ( b )

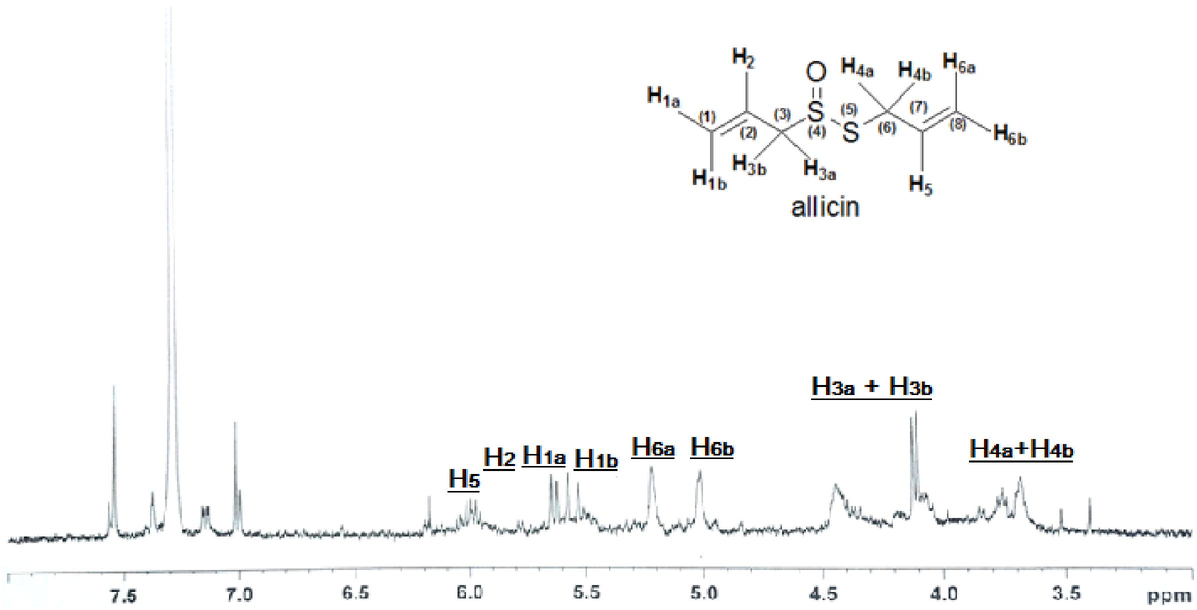
รูปที่ 4 แสดงผล TLC ของแต่ละ fraction ที่ได้จากการ partition ด้วย hexane (H), dichloromethane (D) และ ethyl acetate (E) ,(a) ผล TLC ที่แสง UV ความยาวคลื่น 254 nm,(b) ผล TLC ที่แสง UV ความยาวคลื่น 366 nm

เมื่อทราบว่าสารที่เราต้องการอยู่สารไหนก็จะนำมาแยกด้วยเทคนิค PLC (Preparative Thin Layer Chromatography) เพื่อแยกสารนั้นออกมา โดยการนำสารชั้น hexane มาหยดลงแผ่น TLC ขนาด 20 x 20 cm ลากยาวไปตาที่เรากำหนด จากนั้นกำ TLC ด้วย ระบบเดียวกันกับที่ใช้ตรวจสอบ คือ isopropanol : hexane (92:8) เก็บสารที่เราต้องการโดยการขูด silica gel ในบริเวณที่เราต้องการ (รูปที่ 6)



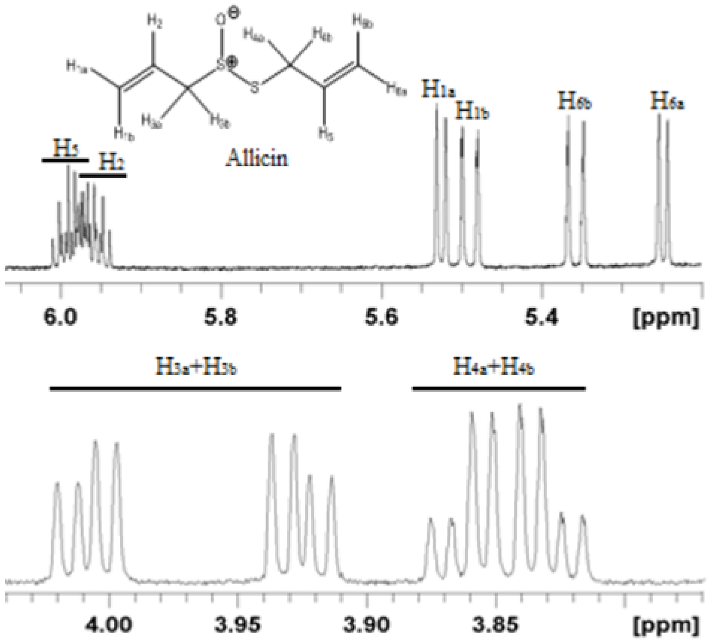
รูปที่ 5 แสดงผล PLC ของสารกสัดที่แยกได้จาก partition ในชั้น hexane

การพิสูจน์โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีของกระเทียมโทนจะนำสารที่แยกได้จาก TLC ไปทำการตรวจด้วยเครื่อง $^1$H-NMR และทำการพิสูจน์โครงสร้างจากสเปกตรัมที่ได้จาก $^1$H -NMR (รูปที่ 3) ได้ผลดังนี้ $\delta$ 5.95-6.02 ($CH_2$-**CH**-$CH_2$, ddt, J=17,J=10,J=7 Hz), $\delta$ 5.65 (**$CH_2$**=CH-$CH_2$-SO, d, J=10 Hz), $\delta$ 5.55 (**$CH_2$**=CH-$CH_2$-SO, d, J=17 Hz), $\delta$ 5.20 (S-$CH_2$-CH=**$CH_2$**, d, J=17 Hz), $\delta$ 5.02 (S-$CH_2$-CH=**$CH_2$**, d, J=10 Hz), $\delta$ 4.42 (C-**$CH_2$**-SO, dd, J=13,J=7 Hz), $\delta$ 4.10 (C-**$CH_2$**-SO, dd, J=13,J=7 Hz), $\delta$ 3.75 (S-**$CH_2$**-CH, dd, J=14,J=7 Hz), $\delta$ 3.69 (S-**$CH_2$**-CH, dd, J=14,J=7 Hz)




รูปที่ 6 Interpreate $^{1}$H-NMR spectrum เพื่อหาโครสร้างของสารตัวอย่าง

จาก $^{1}$H-NMR spectrum ที่ได้ไม่ค่อยชัดเจนเนื่องจากสารที่ใช้ทดสอบมีปริมาณน้อย ( 2.0 mg ) จึงทำการเทียบผล spectrum กับสารอ้างอิง คือ allicin (รูปที่) จะเห็นว่า spectrum มีลักษณะเหมือนกันซึ่งคาดว่าสารที่เราสกัดมาได้จะเป็น allicin แต่อยู่ในรูปของ semi-pure




รูปที่ 7 $^{1}$H-NMR spectrum ของ allicin ที่ได้จาก reference

## การเปรียบเทียบปริมาณ allicin ระหว่างกระเทียมโทน(*A. ampeloprasum*) และกระเทียมจีน (*A. sativum*)

เนื่องจาก allicin เป็นสารหลักที่พบในกระเทียมและสามารถเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ของ allicin ได้ เช่น allysulfides เป็นต้น ทำการหาปริมาณด้วยการคำนวณจากความสูงของ peak ที่ได้จากการคำนวณ และคำนวณหาปริมาณโดยคิดกลับเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของ allicin ระหว่างกระเทียมโทนและกระเทียมจีน

| | กระเทียมโทน (*A. ampeloprasum*) | กระเทียมจีน (*A. sativum*) |
|---|---|---|
| ความเข้มข้นของ allicin (mg/ml) | 13.5983 | 0.3748 |
| ปริมาณของ allicin (mg/g) | 9.0660 | 0.2500 |

# บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการวิจัยการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของกระเทียมโทนและการหาปริมาณของ allicin ระหว่างกระเทียมโทน *A. ampeloprsum* และกระเทียมจีน *A. sativum* พบว่าปริมาณของ allicin ที่พบในกระเทียมโทนมีมากกว่ากระเทียมจีน ส่วนเรื่องการทดสอบฤทธิ์เราได้ส่งทดสอบฤทธิ์แต่ด้วยเวลาที่จำกัดทำให้ไม่ทราบผลการทดสอบได้เนื่องจากผลการทดสอบยังไม่ได้ ซึ่งถ้าดูจากปริมาณ allicin ในกระเทียมโทนซึ่งมีปริมาณมากกว่ากระเทียมจีนมีความเป็นไปได้ว่าที่ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของกระเทียมโทนจะมากกว่ากระเทียมจีน

## ข้อเสนอแนะ

การแยกสกัดกระเทียมโทนควรเตรียมสารสกัดใหม่เนื่องจากสารสกัดสลายตัวง่ายจะสังเกตได้จากจากเมื่อทิ้งไว้จะเหมือนมีตะกอนซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันที่เกิดจากการสลายตัวของ allicin ซึ่งจะทำให้มีปัญหาในการแยกอย่างติดคอลัมน์หรือติด silica gel

# เอกสารอ้างอิง


1. Agnieszka Najdaa, Lidia Blaszczykb, Krystyna Winiarczykc, Jan Dyducha, Dorota Tchórzewskac. Comparative studies of nutritional and health-enhancing properties in the "garlic-like" plant Allium ampeloprasum var. ampeloprasum (GHG-L) and A. sativum. Scientia Horticulturae 2016; 201: 247–255.
2. Jenny Lee, Shalini Gupta, Jin-Sheng Huang, Lasanthi P. Jayathilaka, Bao-Shiang Lee. Preparation and Purification of Garlic-Derived Organosulfur Compound Allicin by Green Methodologies. Green Chromatographic Techniques: Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes 2013: 123-139.
3. Khalid Rahman. Garlic and aging: new insights into an old remedy. Ageing Research Reviews 2003; 2(1): 39–56.
4. Kyu Hang Kyung. Antimicrobial properties of allium species. Current Opinion in Biotechnology 2012, 23:142–147.
5. Liliana Gıˆtin, Rodica Dinic, Camelia Neagu, Loredana Dumitrascu. Sulfur compounds identification and quantification from Allium spp. fresh leaves. journal of food and drug analysis 2014; 22: 425-430.
6. Naganawa, R., Iwata, N., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T., Suzuki, A. Inhibition of Microbial Growth by Ajoene, a Sulfur-Containing Compound Derived from Garlic. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 1996; 62 (11): 4238–4242
7. Natália Martins, Spyridon Petropoulos, Isabel C.F.R. Ferreira. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (Allium sativum L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. Food Chemistry 2016; 211: 41–50
8. P. Rattanachaikunsopon and P. Phumkhachorn. Shallot (Allium ascalonicum L.) oil: Diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research 2009; 3(11): 747-750, Available online : http://www.academicjournals.org/ajmr

9. Purnima Dey, Kazi Layla Khaled. An Extensive Review on Allium ampeloprasum A Magical Herb. IJSR 2013; 4(7): 371-377

10. นิธิมา สุ่มประดิษฐ์, ศิริตรี สุทธจิตต์, สิตานันท์ พูลผลทรัพย์ม รุ่งทิพย์ ชวนชื่น, ภูษิต ประคองสาย. ภูมิทัศน์ของสถานการณ์และการจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทยLandscape of antimicrobial resistance situation and action in Thailand:สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; ธันวาคม 2558.