

โครงการวิจัยย่อยที่ 1

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลในประเทศไทย

Genetic Diversity of Plai (*Zingiber montanum* (Koen.) Theilade) in Thailand

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2552 จำนวนเงิน 3,873,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 25 พฤษภาคม 2552 ถึง 25 พฤษภาคม 2553

ชื่อผู้วิจัย	ผศ.ดร.วิเชียร กิรตินิจกาล	นางสาวเมทินี กัดมูข
	นางสาวฐนิตา บุญสร้างสม	นางสาวโสภิตา ชิดชื่นเชย
	นางสาวอุคมลักษณ์ สุขอัครตะ	นายชัยมงคล ตะนะสอน
	นายวัฒนา อาจวิชัย	

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยย่อยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์ตัวอย่างไพลที่รวบรวมมาจากทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการวิจัยแบ่งออกเป็นสามส่วนหลัก คือ (1) การศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันหอมระเหยไพล (2) การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกสายพันธุ์ไพลโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี และ (3) การคัดเลือกสายพันธุ์ไพลที่ให้ปริมาณผลผลิตสูง มีปริมาณน้ำมันสูงและให้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพ

การทดลองส่วนแรกคือ การศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันไพลที่เหมาะสม จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสองวิธีคือ วิธีการกลั่นด้วยน้ำและวิธีการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน ผลการศึกษาพบว่าวิธีการสกัดน้ำมันไพลที่เหมาะสมคือ วิธีการกลั่นด้วยน้ำ ซึ่งให้น้ำมันหอมระเหยปริมาณมากกว่าการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน และน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีคุณสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับมาตรฐาน ดังนั้นคณะวิจัยจึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วยน้ำไปใช้ในการทดลองอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป

การทดลองส่วนที่สองเป็นการศึกษาเพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในไพล ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย การทดลองย่อยที่ 1 ทดลองในไพลกลุ่มที่ 1 จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยเป็นไพลที่มีอายุการปลูก 32 เดือน ในไพลกลุ่มที่ 1 นี้จะมีการตรวจสอบและบันทึกข้อมูลลักษณะพื้นฐานวิทยา ผลผลิตโรโซม และปริมาณน้ำมันหอมระเหยไพลที่สกัดได้โดยใช้วิธีการที่เหมาะสมที่ได้ทำการทดลองไปแล้วข้างต้น รวมทั้งตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย ส่วนการทดลองย่อยที่ 2 ทดลองในไพลกลุ่มที่ 2 มีจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 132 ตัวอย่าง ที่ได้ทำการปลูกในปี 2552 ผลการ

ทดลองพบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและใช้จำแนกสายพันธุ์ไพลได้ดี จากแผนภูมิทางพันธุกรรมสามารถจำแนกไพลกลุ่มที่ 1 ได้เป็น 6 กลุ่มสายพันธุ์ และไพลกลุ่มที่ 2 จำแนกได้เป็น 49 กลุ่มสายพันธุ์

ส่วนสุดท้ายคือการคัดเลือกสายพันธุ์ไพลที่ให้ผลผลิตสูงและให้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพ เมื่อพิจารณาปริมาณผลผลิตน้ำมันต่อกอในตัวอย่างไพลกลุ่มที่ 1 พบว่าไพลสายพันธุ์ที่ 5 ให้ผลผลิตปริมาณน้ำมันเฉลี่ยต่อกอสูงที่สุดคือ 88.1 มิลลิลิตร และสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตรองลงมาได้แก่สายพันธุ์ที่ 1 ซึ่งให้ผลผลิตปริมาณน้ำมันเฉลี่ยต่อกอ 63.3 มิลลิลิตร ทั้งนี้คณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการทดลองเพื่อทดสอบผลผลิตของสายพันธุ์ไพลในกลุ่มที่ 1 อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลองในครั้งนี และควรมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการให้ผลผลิตของตัวอย่างไพลในกลุ่มที่ 2 ต่อไป

คำสำคัญ (Key words): ไพล การสกัด น้ำมันหอมระเหย องค์ประกอบทางเคมี เอเอฟแอลพี ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Abstract

The objectives of this sub-project are to evaluate genetic variation and to identify the varieties of Plai (*Zingiber montanum* (Koen.) Theilade) using DNA marker. The AFLP technique was used to generate DNA fingerprint of Plai samples which were collected throughout Thailand. The sub-project consists of three parts; (1) the study on volatile oil extraction methods; (2) the evaluation of genetic diversity and varieties identification of Plai using AFLP technique and (3) the selection of Plai varieties providing high yield and high volatile oil quality.

The first part was the experiment to find the appropriate method for volatile oil extraction. The two extraction methods, water distillation and hexane extraction, were studied. The result indicated that water distillation showed high extraction efficiency in term of quantity, physical characteristics, and chemical composition. We concluded that the best approach for volatile oil extraction from Plai rhizome was water distillation, which will be used in our further experiment.

In the second part, the AFLP technique was used to evaluate genetic variation and to identify varieties of Plai. The research was divided into two sub-experiments. The first sub-experiment was performed in Plai group 1 containing 21 samples, which were planted for 32 months, and the second sub-experiment was carried out in Plai group 2 containing 132 samples, which have been planted in 2009. The rhizome yield, volatile oil yield and chemical compositions of volatile oil of Plai group 1 samples were also investigated. The result showed that AFLP technique can be successfully applied to

identify Plai varieties. The AFLP fingerprints showed that Plai group 1 could be divided into six varieties and Plai group 2 could be divided into 49 varieties.

The last part was the selection of promising variety providing high yield and high volatile oil quality. The result indicated that the fifth variety of Plai group 1 showed high average volatile oil yield per clump at 88.1 ml and the second average volatile oil yield per clump was 63.3 ml found in the first variety. We recommended the fifth variety as a promising variety. We suggest that further experiment on yield test of all varieties should be focused to confirm this result. The morphological characteristics, rhizome yield and volatile oil yield of Plai group 2 should be also observed in next year when it matures enough to harvest rhizomes.

Keywords: Plai, *Zingiber montanum* (Koen) Theilade, volatile oil, oil compositions, AFLP, genetic diversity

บทนำ

ไพลเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ ในปัจจุบันมีการปลูกกันอย่างแพร่หลาย ในตำราแพทย์แผนไทยระบุว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้าไพลสามารถใช้รักษาอาการปวดบวม ฟกช้ำได้ดี นอกจากนี้ผลการศึกษาทางเภสัชวิทยายังพบว่าไพลมีฤทธิ์หลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ลดการอักเสบ แก้หอบหืด คลายกล้ามเนื้อ ลดการเต้นของหัวใจที่ผิดปกติ ชำเชื้ออสุจิ ไโลแมลง เป็นยาชาเฉพาะที่ ด้าน การฝังตัวของตัวอ่อนในมดลูก และต้านเชื้อแบคทีเรีย

เนื่องจากรัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรเป็นอุตสาหกรรมขนาดย่อมและ ส่งออก เช่น ผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ ทำให้ไพลมีศักยภาพสูงมากในการ ที่จะพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจ โดยปัจจัยหลักที่สำคัญในการที่จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ดี มีราคา เหมาะสมที่จะแข่งขันได้นั้น ต้องใช้สมุนไพรที่ให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพดี และมีสารสำคัญสม่ำเสมอตรง ตามมาตรฐาน แต่ในปัจจุบันพบว่าผลิตภัณฑ์จากไพลมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยไม่สม่ำเสมอ และอาจมี องค์ประกอบทางเคมีไม่ตรงตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลายประการ ปัจจัยเรื่อง สายพันธุ์อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการให้ผลผลิต ปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยใน สมุนไพร จากผลการศึกษาในขมิ้นชันซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง โดยสารสำคัญในขมิ้นชันคือ เคอร์คูมิน มีรายงานพบว่าสายพันธุ์ของขมิ้นมีผลต่อผลผลิตของขมิ้นและปริมาณเคอร์คูมิน (Nirmal Babu *et al.*, 1993; Chandra *et al.*, 1997, 1999; Lynrah *et al.*, 1998; Hazra *et al.*, 2000) ดังนั้นการ จำแนกสายพันธุ์ไพลจึงมีความสำคัญ จากงานวิจัยที่ผ่านมามีนักวิจัยหลายท่านพยายามจำแนกสายพันธุ์ ไพลโดยใช้ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ แต่เนื่องจากพืชตระกูลนี้มีความคล้ายคลึงกันอย่าง มาก และการใช้เกณฑ์ดังกล่าวมีข้อจำกัดคือ อาจได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อม ทำให้เกิดความ ผิดพลาดในการจำแนกสายพันธุ์ไพล

เครื่องหมายดีเอ็นเอ^{1/} เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบถึงองค์ประกอบสารพันธุกรรมซึ่งเป็น ส่วนควบคุมลักษณะทั้งทางคุณภาพและปริมาณได้โดยตรง จึงได้มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ใน การจำแนกพันธุ์ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น จากการศึกษาของ วิเชียร และคณะ (2547) ได้จำแนก ไพล (*Zingiber montanum* (Koen.) Theilade) จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 63 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite markers) จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ เมื่อนำ ข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ระหว่างตัวอย่าง พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วง 0.09 - 1.00 โดยจำแนกสายพันธุ์ไพลได้เพียง 3 สายพันธุ์ อาจเนื่องมาจากจำนวน เครื่องหมายดีเอ็นเอหรือตำแหน่งดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบน้อยเกินไป ทำให้ข้อมูลที่ได้นั้นไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ ในงานทดลองนี้จึงเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี

^{1/} เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึงดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่งหรือใน ระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซมหรือเป็นดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ก็ได้

(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP markers) ที่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง เพื่อให้สามารถตรวจสอบจำแนกสายพันธุ์ไพลได้อย่างละเอียดมากขึ้น

คณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในด้านการจำแนกสายพันธุ์ไพล โดยการวิจัยในครั้งนี้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี ผลของงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ไพลที่มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูง และนำสายพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางการศึกษาวิจัย และเพื่อปลูกเชิงการค้าต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของไพล โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี
2. เพื่อจัดจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ไพล โดยใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ร่วมกับลักษณะทางการเกษตร และปริมาณน้ำมันหอมระเหย
3. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ไพลที่มีผลผลิตและปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูง รวมทั้งมีคุณภาพน้ำมันที่ดี

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ไพลเป็นพืชสมุนไพรที่คนไทยนิยมปลูกไว้ใช้ภายในครัวเรือน มีชื่อเรียกแต่ละท้องถิ่นแตกต่างกัน ได้แก่ ปูลอย ปูเลย (ภาคเหนือ) ว่านไฟ (ภาคกลาง) มินี่สะล่าง (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน) ไพลมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr. (Synonym: *Zingiber cassumunar* Roxb., *Zingiber purpureum* Roscoe) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae



รูปที่ 1-1 ต้น ดอก และหัวไพล

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไพลเป็นพืชล้มลุก มีลำต้นอยู่ใต้ดินเรียกว่าเหง้า ซึ่งมีขนาดใหญ่ สีเหลืองอมเขียวและมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ลำต้นเทียมแทงขึ้นมาจากดิน สูงประมาณ 80-200 เซนติเมตร ลำต้นมีสีเขียว ใบมีลักษณะเรียวยาว ออกตรงข้ามกัน เนื้อใบบางและปลายใบแหลม ดอกเป็นช่อแทงจากเหง้าใต้ดินโดยตรง มีกลีบประดับสีน้ำตาลแดงซ้อนกันแน่น มีดอกสีเหลืองอ่อนอยู่ระหว่างกลีบประดับ (รูปที่ 1-1) ผลมีลักษณะกลมมัน เมล็ดมีสีดำ ไพลชอบดินเหนียวปนทรายที่มีอินทรีย์วัตถุสูง มีการระบายน้ำที่ดี ปลูกได้ทั้งที่โล่งแจ้งและที่ร่มรำไร ขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า (สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน และคณะ, 2547) การเก็บเกี่ยวไพล นิยมเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม ซึ่งจะสังเกตเห็นต้นไพลแห้งและพับลงกับพื้น แต่ไม่นิยมเก็บเกี่ยวในช่วงที่ไพลเริ่มแตกหน่อใหม่ เพราะจะทำให้ได้ปริมาณน้ำมันน้อยและคุณภาพต่ำ

ไพลมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียแถบประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย ไพลสามารถจำแนกตามลักษณะภายนอกและการเจริญเติบโตได้เป็น 4 ชนิด คือ ไพลเหลือง ไพลปลุกเสก ไพลดำ และไพลม่วง ซึ่งในประเทศไทยพบว่าการปลูกไพลอยู่ 2 ชนิด คือ ไพลเหลือง (*Zingiber montanum* (Koen.) Theilade) (ชื่อพ้อง: *Zingiber cassumunar* Roxb. และ *Zingiber purpureum* Roscoe) และไพลดำ (*Zingiber ottensii* Valetton) (นันทวัน และอรนุช, 2542) ไพลทั้ง 4 ชนิดมีการเจริญเติบโตโดยทั่วไปเหมือนกัน แต่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันเช่น ลักษณะใบ ดอก และลำต้นใต้ดินหรือเหง้า โดยเฉพาะสีเนื้อในของเหง้าไพลทั้ง 4 ชนิดมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนปริมาณสารในไพลเหลืองและไพลปลุกเสกไม่แตกต่างกันคือ 24.3 % และ 23.5 % ตามลำดับ (สมพิศ และเพ็ญศรี, 2548)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันไพล พบว่าเฉพาะน้ำมันสกัดดิบเท่านั้นที่ให้ผลลดอาการบวมของอุ้งเท้าหนู การศึกษาเบื้องต้นทางคลินิก พบว่าให้ผลในการรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อ ปวดข้อและอาการเคล็ดต่าง ๆ โดยสารสำคัญในน้ำมันไพลที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบคือ DMPBD ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase และ lipoxygenase ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของ arachidonic acid ที่ทำให้เกิดการอักเสบ (Jeenapongsa *et al.*, 1995) และผลการทดสอบสาร phenylbutenoids จำนวน 7 ชนิด ที่สกัดจากไพล ต่อการยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการอักเสบ (cyclooxygenase-2) พบว่ามีสาร 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ได้แก่ สาร phenylbutenoid dimer 2 ชนิด มีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) เท่ากับ 2.71 และ 3.64 ไมโครโมลาร์ สาร phenylbutenoid monomer 2 ชนิด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 14.97 และ 20.68 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Ar-Reum *et al.*, 1993)

ฤทธิ์ต้านฮีสตามีน

สารที่แยกได้จากการสกัดไพลด้วยเฮกเซนสามารถยับยั้งฤทธิ์ของฮีสตามีนในกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูตะเภาได้ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 0.533 มก./มล. และสารดังกล่าวสามารถยับยั้งฤทธิ์ของฮีสตามีนที่กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลมในตัวหนูตะเภาได้ด้วย (นียดา และคณะ, 2522) นอกจากนี้ยังพบว่าไพลมีฤทธิ์ต้านฮีสตามีนในผู้ป่วยเด็กโรคหืด โดยสามารถลดขนาดของกลุ่มหนูที่เกิดจากการฉีดด้วยฮีสตามีนได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังมีประสิทธิภาพน้อยกว่ายาคลอเฟนิลามีน (กณิกา และคณะ, 2550)

ฤทธิ์แก้ปวด

สาร (E)-4 (3',4'-dimethylphenyl) but-3-en-1-ol จากไพลมีฤทธิ์แก้ปวด เมื่อทดสอบในหนูขาว (Panthong *et al.*, 1990, 1997) และไพลเจมีฤทธิ์แก้ปวดเมื่อใช้เป็นยาทาภายนอก (ทวีศักดิ์ และคณะ, 2543; Laupattarakasem *et al.*, 1993)

ฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่

น้ำมันไพลออกฤทธิ์ต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเส้นประสาท sciatic ในคางคก ซึ่งคล้ายคลึงกับการออกฤทธิ์ของยาชา lidocaine (วัลภา และศักดิ์ชัย, 2518)

ฤทธิ์แก้หอบหืด

ไพลสามารถลดขนาดของกลุ่มหนูจากการฉีดด้วยน้ำยาฮีสตามีนได้อย่างมีนัยสำคัญ (กณิกา และคณะ, 2550) ผู้ป่วยที่ได้รับไพลมีอาการหอบน้อยลง ซิพจรและความดันโลหิตไม่เปลี่ยนแปลง ไพลจึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นยาบำบัดอาการหอบหืดได้ อย่างไรก็ตามการใช้เพื่อรักษาโรคหอบหืดยังต้องรอการวิจัยเกี่ยวกับปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์และการศึกษาพิษระยะยาวก่อน

ฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ

สารสกัดไพลสามารถลดการบีบรัดตัวของมดลูก ลำไส้ และกระเพาะอาหารของหนูขาว เนื่องจากพบว่าสาร compound D มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบมดลูก และลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูขาว (นียดา และคณะ, 2522)

ฤทธิ์ในการไล่แมลง

น้ำมันหอมระเหยจากไพลใช้ได้ผลดีในการทาผิวหนังป้องกันยุงกัด น้ำมันไพลมีข้อดีคือใช้แล้วไม่ร้อนผิวหนังและมีกลิ่นหอม นอกจากนี้ยังช่วยลดอาการอักเสบของผิวหนังได้อีกด้วย (ประคอง 2521, 2522)

ฤทธิ์ฆ่าเชื้ออสุจิ

สาร terpinen-4-ol ที่สกัดจากไพล ความเข้มข้น 0.016 % สามารถฆ่าเชื้ออสุจิได้ร้อยละ 100 (Wasuwat *et al.*, 1990)

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

สารสกัดจากไพลด้วยไดคลอโรมีเทน แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (แบคทีเรียแกรมบวก) และ *Pseudomonas aeruginosa* (แบคทีเรียแกรมลบ) โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากับ 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อแผ่น สารสกัดจากไพลด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย beta-streptococcus group A ที่ทำให้เกิดโรคของระบบทางเดินหายใจ (Habsah *et al.*, 2000)

ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

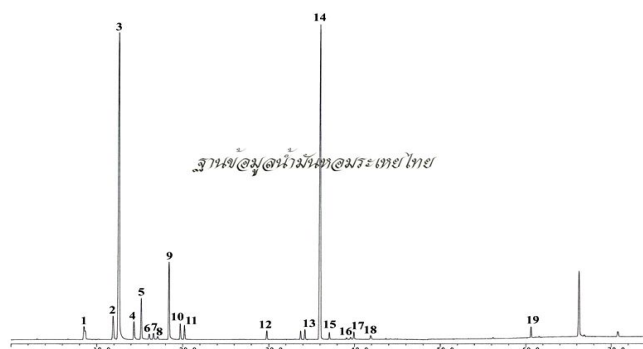
สารสกัดไพลสดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/แผ่น เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Wangiella dermatitidis*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporum gypseum*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhizopus* sp. และ *Trichophyton mentagrophytes* (Giwanon *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเมทานอล, ไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคผิวหนัง ได้แก่ *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* และ *Trichophyton rubrum*

การทดสอบความเป็นพิษ

ไม่พบอาการเป็นพิษเฉียบพลันแม้จะให้สารสกัดไพลด้วยแอลกอฮอล์ 50 % ขนาดเท่ากับไพล 10 กรัม/กิโลกรัม ทั้งกรอกทางปาก และฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนูถีบจักร และในการทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง ปรากฏว่าไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ กับสัตว์ทดลอง (กณิกา และคณะ, 2550)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพล

เหง้าไพลมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.5-0.9 มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก คือ สารประเภทโมโนเทอร์ปีนอยด์ (monoterpenoid) และฟีนิลิวทานอยด์ (phenylbutanoid) มีฤทธิ์ลดการอักเสบ บรรเทาอาการปวดบวม และมีผลเป็นยาชาเฉพาะที่ นอกจากนี้ยังมีสารสีเหลืองที่ชื่อว่า curcumin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อหนองได้ดี (องค์การเภสัชกรรม, 2549) องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลแสดงดังตารางที่ 1-1



รูปที่ 1-2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลด้วย Gas-Chromatography
ที่มา : ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2552)

ตารางที่ 1-1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพล

ลำดับที่*	องค์ประกอบทางเคมี	องค์ประกอบทางเคมี (%)
1	α -pinene + α -thujene	2.10
2	β -pinene	2.65
3	sabinene	34.68
4	myrcene + α -phellandrene	1.59
5	α -terpinene	3.69
6	limonene	0.45
7	β -phellandrene	0.54
8	1,8-cineole	0.27
9	γ -terpinene ()	6.73
10	p-cymene	1.26
11	terpinolene	1.14
12	sabinene hydrate	0.63
13	trans-menth-2-en-1-ol	0.71
14	terpinen-4-ol	32.30
15	cis-menth-2-en-1-ol	0.49
16	terpinyl acetate	0.17
17	α -terpineol	0.56
18	trans-piperitol	0.84
19	elemicin	0.76

ที่มา : ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2552)

*หมายเหตุ ลำดับเลขที่แสดงคือหมายเลขที่กำกับในแต่ละพีค (peak) จากรูปที่ 1-2

รุ่งฤดี (2550) ศึกษาการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพล จากวิธีการสกัดที่แตกต่างกันพบว่า น้ำมันไพลที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันมีปริมาณสารองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน (ตารางที่ 1-2)

ตารางที่ 1-2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลจากการกลั่นด้วยวิธีไมโครเวฟ การกลั่นเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย และการกลั่นด้วยวิธีไมโครเวฟร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราโซนิก

รายการที่	องค์ประกอบทางเคมี	การกลั่นโดยใช้วิธีไมโครเวฟ	การกลั่นโดยเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย	การกลั่นโดยใช้วิธีไมโครเวฟร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราโซนิก
1	α -Thujene	trace	trace	0.40
2	α -Pinene	0.94	0.96	1.08
3	Sabinene	41.01	36.36	42.69
4	β -Myrcene	1.25	1.18	1.53
5	α -Terpinene	1.68	1.89	2.16
6	p-Cymene	1.37	1.01	1.11
7	β -Phellandrene	0.92	0.83	0.89
8	γ -Terpinene	4.17	4.49	5.20
9	Sabinene hydrate	0.55	0.50	0.59
10	Terpinolene	0.80	7.06	0.89
11	Terpinen-4-ol	33.34	23.53	27.00
12	β - Sesquiphellandrene	1.86	1.20	1.74
13	DMPBD	9.15	9.28	10.28

ที่มา : รุ่งฤดี (2550)

การใช้ประโยชน์จากน้ำมันไพล

น้ำมันไพลใช้เป็นตัวยาสำคัญในผลิตภัณฑ์น้ำมันนวดเพื่อลดอาการอักเสบ และใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์โลชั่น ครีมที่มีน้ำมันไพล 14 % ได้ถูกจัดเข้าในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542 (บัญชียาจากสมุนไพร กลุ่มที่ 2 ยาจากสมุนไพรที่มีการพัฒนา) นอกจากนี้ยังมีการนำน้ำมันไพลมาใช้ประโยชน์ในด้านของเครื่องสำอางได้แก่ การใช้ในผลิตภัณฑ์สปา เช่น น้ำมันนวด แชมพู ยาสีฟัน ผลิตภัณฑ์รักษาผิว เป็นต้น

Pithayanukul *et al.*, (2007) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์เจลน้ำมันไพล โดยใช้ น้ำมันไพลเข้มข้น 5 % ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคผิวหนัง และพบว่าผลิตภัณฑ์เจลน้ำมันไพลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคผิวหนังในสถานะห้องทดลองได้

จุฬารัตน์ และคณะ (2551) ได้ศึกษาประสิทธิผลทางคลินิกของเจลไพลที่ทำจากน้ำมันไพลปริมาณ 1 % ในการรักษาผิวหนังเด็กน้อยถึงปานกลาง พบว่าการใช้เจลไพลมีความปลอดภัย และไม่พบรายงานอาการข้างเคียง เจลไพลมีแนวโน้มให้ผลการรักษาผิวหนังเด็กน้อยถึงปานกลาง โดยสามารถเห็นผลการรักษาได้ภายในเดือนแรกเมื่อเทียบกับยาหลอก

น้ำมันหอมระเหย (Volatile oils)

น้ำมันหอมระเหยเป็นน้ำมันที่พืชผลิตขึ้นตามธรรมชาติ และเก็บไว้ตามส่วนต่าง ๆ เช่น กลีบดอก ใบ ผิวของผล เกสร รากหรือเปลือกของลำต้น น้ำมันหอมระเหยมีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีอนุภาคขนาดเล็ก มีกลิ่นเฉพาะตัว อนุภาคเล็ก ๆ ของน้ำมันหอมเหล่านี้จะระเหยออกมาเป็นไอได้ในอุณหภูมิธรรมดาหรือเวลาที่ได้รับความร้อนทำให้เราได้กลิ่น น้ำมันหอมระเหยจัดเป็นสารพวก secondary metabolite ที่พืชสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเจริญเติบโต (metabolism) ซึ่งจะพบน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด โดยปริมาณและชนิดของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจะแตกต่างกันไปตามส่วนต่าง ๆ ของพืช คุณภาพของน้ำมันหอมระเหยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ดิน ภูมิอากาศ อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน ความสูงจากระดับน้ำทะเล การเก็บเกี่ยว เทคนิคและวิธีการสกัด น้ำมันหอมระเหยมีประโยชน์ต่อพืชคือช่วยดึงดูดแมลงให้มาผสมเกสรดอกไม้ ปกป้องการรุกรานจากศัตรูและการรักษาความชุ่มชื้นแก่พืช มนุษย์นำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน ขึ้นอยู่กับฤทธิ์หรือสรรพคุณของน้ำมันหอมระเหย เช่น ฆ่าเชื้อโรค บรรเทาอาการอักเสบหรือลดบวม คลายเครียด หรือกระตุ้นให้สดชื่น ทั้งนี้สรรพคุณของน้ำมันหอมระเหยขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมีอยู่มากมายหลายร้อยชนิด แต่สามารถจำแนกกลุ่มของสารได้เป็น 8 กลุ่ม (วันดี, 2544) ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะออกฤทธิ์ในการบำบัดที่แตกต่างกันดังนี้

1. Hydrocarbon volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มี hydrocarbon เป็น

องค์ประกอบหลัก ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ hydrocarbon monocyclic terpene เช่น limonene ซึ่งพบได้ในน้ำมันจากมินต์ ส้มกระวานและน้ำมันสน, สาร p-cymene ซึ่งพบในน้ำมันจากลูกผักชีและอบเชย, สารdicyclic monoterpene เช่น pinene ซึ่งพบในน้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันดอกส้ม และน้ำมันลูกผักชี

2. Alcohol volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ น้ำมันจากลูกผักชี ลูกกระวาน ดอกส้ม ดอกกุหลาบและน้ำมันสน แอลกอฮอล์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวได้แก่ geraniol, citronellol, mentol และ α -terpineol

3. Aldehyde volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวก aldehyde เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญได้แก่ น้ำมันอบเชย น้ำมันจากส้ม มะนาวและตะไคร้หอม สารประเภท aldehyde ที่พบในพืชดังกล่าวได้แก่ geraniol, neral และ citronellal เป็นต้น

4. Ketone volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวก ketone เป็นองค์ประกอบหลัก น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ การบูร และมินต์ สารประเภทลิโตนที่พบในพืชเหล่านี้ได้แก่ menthone, camphor, piperitone, pulegone fenchone และ thujone

5. Phenol volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวก phenol เป็นองค์ประกอบหลัก เช่น clove oil, thyme oil, pine tar และ juniper tar สารประกอบประเภท phenol ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชเหล่านี้ได้แก่ eugenol, thymol และ carvacrol เป็นต้น

6. Phenolic ether volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวก phenolic ether เป็นองค์ประกอบหลัก สายพันธุ์ของน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มนี้ได้แก่ น้ำมันโป๊ยกั๊ก และ น้ำมันจันทน์เทศ

7. Oxide volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวก oxide เป็นองค์ประกอบหลัก เช่น cineole ซึ่งพบในน้ำมันยูคาลิปตัส

8. Ester volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวก ester เป็นองค์ประกอบหลัก สารจำพวก ester ที่พบในน้ำมันหอมระเหยได้แก่ allyl isothiocyanate ซึ่งพบในน้ำมันมัสตาด และ methyl salicylate ที่พบได้ใน wintergreen oil

การสกัดน้ำมันหอมระเหย

วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชในปัจจุบันสามารถทำได้ 5 วิธี คือ

1. การสกัดโดยการกลั่น
2. การสกัดโดยการบีบอัด
3. การสกัดด้วยวิธี Enfleurage
4. การสกัดด้วยตัวทำละลาย
5. การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวภายใต้ความดันสูง

1. การสกัดโดยการกลั่น (Distillation)

การกลั่นเป็นการแยกสารที่ระเหยง่ายออกจากที่ระเหยได้ยากหรือสารที่ไม่ระเหย โดยอาศัยความร้อนทำให้สารสายพันธุ์เดือดจนกลายเป็นไอแล้วทำให้ไอควบแน่นกลับมาเป็นของเหลวอีกครั้งของเหลวที่ได้นั้นเรียกว่า distillate ของเหลวที่เหลืออยู่ในขวดกลั่นเรียกว่า residue ซึ่งเป็นสารที่ไม่ระเหยหรือมีความดันไอสูงกว่า distillate นอกจากนี้การกลั่นยังสามารถใช้แยกสารที่มีจุดเดือดต่างกันมาก ๆ ได้ โดยเครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นแบบธรรมดาจะใช้กับสารที่มีจุดเดือดต่างกันมากกว่า 80 องศาเซลเซียส การกลั่นมีข้อดีกว่าการสกัดโดยตรงเพราะปราศจากการปะปนของสารที่ไม่ระเหย ส่วนข้อเสียก็คือได้สารระเหยที่มีความเข้มข้นน้อย การกลั่นเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเพราะทำได้ง่าย ประหยัดได้น้ำมันหอมระเหยปนมากับน้ำแยกเป็น 2 ชั้น ซึ่งแยกออกจากกันได้ง่าย ได้ผลผลิตเป็นน้ำมันหอมระเหย (essential oil) และน้ำปรุง (aromatic water, floral water หรือ hydrosol) การกลั่นแบ่งได้เป็น 3 วิธี คือ การกลั่นโดยตรง การกลั่นโดยอ้อม และการกลั่นภายใต้สุญญากาศ (มณีษา, 2546)

1.1 การกลั่นโดยตรง (direct distillation) หรือการกลั่นด้วยน้ำ (water distillation)

เป็นกระบวนการต้มสารสายพันธุ์กับน้ำ วิธีนี้สารสายพันธุ์ต้องอยู่ในน้ำเดือด หรือลอยอยู่บางส่วน สารสายพันธุ์ที่ผสมกับน้ำจะถูกให้ความร้อนโดยตรงจากเปลวไฟหรือจากท่อไอน้ำ การสกัดวิธีนี้ทำให้สารตัวอย่างสัมผัสกับน้ำโดยตรง เมื่อสารสายพันธุ์เดือดจะระเหยกลายเป็นไอแล้วควบแน่นกลับมาเป็นของเหลวอยู่ในภาชนะรองรับ ปัญหาที่เกิดขึ้นจากการกลั่นคือสารสายพันธุ์จะได้รับความร้อนไม่สม่ำเสมอ ตรงกลางหม้อกลั่นมักจะได้รับความร้อนมากกว่าด้านข้าง จึงทำให้สารสายพันธุ์ไหม้ กลิ่นไหม้จะปนมาน้ำมันหอมระเหย และอาจทำให้อ่างประกอบในน้ำมันหอมระเหยเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งแก้ไขโดยการปั่นกวาดตลอดเวลา หรือใช้ไอน้ำร้อน หรืออาจใช้ closed steam coil จุ่มในหม้อต้ม แต่การใช้ coil นี้ไม่เหมาะกับดอกไม้บางชนิด เช่นกุหลาบ เนื่องจากเมื่อกลิบบอกถูก steam coil จะหดรตัวกลายเป็น glutinous mass ซึ่งทำให้ไม่สามารถกลั่นน้ำมันออกมาได้ ต้องกลั่นด้วยน้ำแบบธรรมดา โดยน้ำจะซึมเข้าไปในกลีบดอกไม้และนำกลิ่นออกมาได้ง่ายขึ้น การกลั่นแบบนี้ใช้กับวัตถุดิบที่ติดกันง่าย เช่น พงออลมอนด์ ใบไม้บาง ๆ หรือกลีบดอกไม้ เพราะเมื่อน้ำเดือดจะช่วยให้มีการเคลื่อนไหวของตัววัตถุดิบตลอดเวลา และน้ำหรือไอน้ำสามารถซึมผ่านเข้าไปได้

1.2 การกลั่นโดยอ้อม (indirect steam distillation) สามารถทำได้ 2 แบบได้แก่

1.2.1 การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water steam distillation)

เป็นกระบวนการกลั่นโดยวางสารสายพันธุ์ไว้บนตะแกรงเหนือระดับน้ำ แล้วต้มน้ำให้เดือด ไอน้ำจะลอยตัวขึ้นไปผ่านพืชหรือสารสายพันธุ์ที่จะกลั่น โดยน้ำจะไม่สัมผัสกับสารสายพันธุ์ ไอน้ำจากน้ำเดือดเป็นไอน้ำที่อึดตัว หรือเรียกว่าไอน้ำเปียก มีอุณหภูมิไม่ร้อนจัด เป็นการกลั่นที่สะดวก

ที่สุด ได้คุณภาพของน้ำมันดีกว่าการกลั่นด้วยน้ำ การกลั่นแบบนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันหอมระเหยทางการค้า

1.2.2 การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation)

เป็นกระบวนการผ่านไอน้ำโดยตรงไปบนสารสายพันธุ์ที่วางบนตะแกรงในหม้อกลั่น ไอน้ำภายนอก ไอบีเยกหรือไอร้อนจะถูกส่งไปตามท่อใต้ตะแกรงให้ไอน้ำผ่านขึ้นไปบนตะแกรงที่มีสารสายพันธุ์อยู่ ไอน้ำต้องมีปริมาณเพียงพอที่จะช่วยให้ น้ำมันระเหยออกมาจากสารสายพันธุ์ น้ำมันหอมระเหยจะถูกสกัดออกมา ข้อดีของการกลั่นวิธีนี้คือสามารถกลั่นได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเอาสารสายพันธุ์ใส่หม้อกลั่นไม่ต้องเสียเวลารอให้ร้อน ปล่องไอร้อนเข้าไปได้เลย ทำการกลั่นสารสายพันธุ์ได้ในปริมาณมาก ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมาก การกลั่นน้ำมันหอมระเหยจะดำเนินไปได้ดีที่อุณหภูมิสูง แต่ข้อเสียคือที่อุณหภูมิสูง สารประกอบพวกเอสเทอร์จะถูกไฮโดรไลซ์ให้เป็นกรดและแอลกอฮอล์ได้ง่าย ดังนั้นเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพดีที่สุด ควรกลั่นที่อุณหภูมิต่ำที่สุดเท่าที่จะทำได้ หากได้น้ำมันน้อย ควรใช้อุณหภูมิสูงขึ้น ใช้เวลาสั้นที่สุด การกลั่นจะต้องวัดอุณหภูมิและเวลาให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

1.3 การกลั่นภายใต้สุญญากาศ (vacuum steam distillation)

การกลั่นวิธีนี้คล้ายกับการกลั่นด้วยไอน้ำ แต่แตกต่างกันในส่วนที่มีการลดความดันโดยการทำให้เป็นสุญญากาศ เพื่อป้องกันการสูญเสียกลิ่นและลดการเกิดสารแปลกปลอมอันเนื่องมาจากสารที่ไม่เสถียรเมื่อถูกความร้อนสูง

2. การสกัดโดยการบีบอัด (Pressing)

การหีบหรือบีบ เป็นวิธีการแยกสารหอมที่ใช้กับพืชบางชนิดที่มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ในเปลือก เช่น ผลไม้ตระกูลส้ม ได้แก่ ผลส้ม ผลมะนาว และผลมะกรูด เป็นต้น (มณีษา, 2546)

2.1 Sponge process

เป็นวิธีที่สามารถทำเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือนได้ โดยนำสายพันธุ์มาผ่าเอาเนื้อออกแล้วนำเปลือกมาล้างน้ำและนำไปกดบีบให้น้ำมันออกมาจากเปลือกโดยใช้เครื่องมือที่ประกอบด้วยไม้ 2 แผ่น มีบานพับติดอยู่ด้านหนึ่ง ด้านตรงข้ามมีด้ามสำหรับกดยกขึ้นลงได้ ซึ่งตรงกลางของไม้จะบุด้วยฟองน้ำเวลาใช้จะนำสายพันธุ์ไปวางตรงกลางแล้วใช้แรงกดน้ำมันจะถูกบีบออกจากเปลือกและดูดซับอยู่ที่ฟองน้ำ เมื่อบีบมาก ๆ น้ำมันในฟองน้ำก็จะไหลออกมาลงไปอยู่ภาชนะรองรับ เมื่อได้น้ำมันหอมระเหยมากพอแล้วก็ตั้งทิ้งไว้ให้น้ำมันแยกจากน้ำ แล้วจึงนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.2 Ecuelle method

วิธีนี้ใช้ถังกลมที่ภายในมีเข็มเล็ก ๆ อยู่บริเวณด้านในถัง จากนั้นทำการใส่สายพันธุ์ลงในถังแล้วหมุนให้รอบเพื่อให้เข็มที่แทงเซลล์ค่อมน้ำมันของสายพันธุ์ที่กึ่งอยู่ในถัง น้ำมันหอมระเหยจะซึมออกทางช่องที่จัดทำไว้ ซึ่งปริมาณน้ำมันที่ได้นี้จะน้อยกว่าวิธีบีบคั้น แต่เป็นวิธีที่เตรียมง่าย สะดวก และช่วยผ่อนแรง

2.3 Machine process

เป็นวิธีที่โรงงานทำหัวน้ำมันหอมระเหยใช้สำหรับแยกน้ำมันหอมระเหยจากสารสายพันธุ์ ซึ่งจะใช้เครื่องคั้นที่มีกำลังคั้นสูง สารสายพันธุ์ที่ล้างสะอาดเมื่อผ่านกรรมวิธีนี้แล้วจะได้ทั้งน้ำมันหอมระเหยและน้ำผลไม้ จากนั้นกรองน้ำมันที่ได้แล้วนำไปกลั่นภายใต้สุญญากาศจะได้น้ำมันหอมระเหยที่บริสุทธิ์

3. การสกัดด้วยวิธี Enfleurage

เป็นวิธีการสกัดที่เก่าแก่ มักใช้กับกลีบดอกไม้ซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยปริมาณน้อย อาศัยหลักการที่ไขมันและน้ำมันสามารถละลายดูดซับหรือจับกับ ethereal oil ได้ การสกัดด้วยวิธี enfleurage นี้แบ่งออกเป็น 2 วิธี

3.1 การสกัดด้วยไขมันเย็น (Cold enfleurage)

วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติในการดูดกลืนของไขมัน นิยมใช้กับดอกไม้ที่สลายตัวง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น ดอกมะลิ (jasmine) และดอกชอนกลีน (tuberose) โดยเก็บดอกไม้สดเมื่อถึงช่วงเวลาที่ส่งกลิ่นหอมมาก นำมาโรยแผ่กระจายให้ทั่วบนกระเบื้องซึ่งจะมีไขมันอยู่และปิดด้วยกระจกทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง น้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้จะซึมเข้าไปอยู่ในไขมัน หลังจากนั้นจะทำการเปลี่ยนดอกไม้ใหม่จนกระทั่งไขมันนี้อิ่มตัว แล้วนำไปสกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่เย็นจัด จากนั้นนำไปแช่เย็นเพื่อแยกไขมันออกมา แอลกอฮอล์ที่ละลายน้ำมันหอมระเหยออกมาเรียกว่า *extratis aux fleurs* (extract of flower) ซึ่งจะถูกนำไปกลั่นภายใต้สุญญากาศเพื่อแยกแอลกอฮอล์ออก ส่วนที่เหลือเรียกว่า *enfleurage absolute* หรือ *concrete* วิธีนี้ไขมันที่นำมาใช้จะต้องสะอาด และมีความแข็งพอเหมาะ ถ้าแห้งไปจะดูดกลืนไม่ดี แต่ถ้ามันเกินไปจะแยกดอกไม้ได้ยาก สัดส่วนของไขมันมีดังนี้ คือ ไขมัน 1 ส่วน น้ำมันหมู 2 ส่วน

3.2 การสกัดด้วยไขมันร้อน (Hot enfleurage)

วิธีนี้นิยมใช้กับดอกไม้ที่ทนความร้อนได้ หรือดอกไม้บางชนิด เช่น ดอกกุหลาบ ดอกส้ม ซึ่งหลังจากเด็ดดอกออกมาจากต้น *physiological activity* จะหยุดทันที การสกัดด้วยไขมันร้อนสามารถ

สกัดได้น้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณมากกว่า และกลิ่นหอมมากกว่าการสกัดด้วยไขมันเย็น การสกัดด้วยไขมันร้อนทำได้โดยการแช่ดอกไม้ในน้ำมันหมูหรือน้ำมันอื่น ๆ แล้วอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส การกวนและการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยให้เซลล์ของน้ำมันหอมระเหยในดอกไม้แตกออก ใช้เวลาประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วทำให้เย็น น้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้จะละลายอยู่ในน้ำมัน อุ่นให้ร้อนอีกครั้งแล้วกรองดอกไม้ออกมา เปลี่ยนดอกไม้สดหลายครั้งจนไขมันอิ่มตัว ไขมันที่มีกลิ่นน้ำมันหอมระเหยนี้เรียกว่า ปอมเมต (pomades) ซึ่งจะถูกนำไปสกัดด้วยแอลกอฮอล์ น้ำมันหอมระเหยจะละลายอยู่ในแอลกอฮอล์ แล้วจึงนำไปแช่แข็ง น้ำมันจะแข็งตัวแยกออกจากแอลกอฮอล์ จากนั้นกรองสารละลายออกแล้วนำไปกลั่นภายใต้สุญญากาศเพื่อแยกแอลกอฮอล์ออก ส่วนที่เหลือเรียกว่า absolute วิธีนี้ใช้ไม่ได้กับสารที่ระเหยง่ายหรือไม่คงตัวเมื่อถูกความร้อน

4. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

วิธีนี้เป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งเป็น Volatile hydrocarbon เช่น hexane, benzene หรือ petroleum ether สกัดเอาสารหอมออกมาเรียกว่า concrete ซึ่งสารสกัดที่ได้มีส่วนประกอบของ essential oil, fats, waxes และ heavier oils จากนั้นทำการแยกน้ำมันหอมระเหยออกจาก fats, waxes และ heavier oils โดยนำ concrete มาละลายในแอลกอฮอล์ น้ำมันหอมระเหยและสารหอมจะละลายอยู่ในแอลกอฮอล์ เมื่อกรองสารและระเหยแอลกอฮอล์ภายใต้ความดัน จะได้น้ำมันหอมระเหยเรียกว่า absolute วิธีนี้จะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นคงเดิม เพราะไม่เกิดการสลายตัว เหมาะสำหรับพืชที่ทนความร้อนสูงไม่ได้ เช่น มะลิ ช่อนกลิ่น การสกัดด้วยตัวทำละลายมี 2 วิธีคือ

4.1 การสกัดเย็น (Maceration)

การสกัดเย็นเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้ คัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับน้ำมันหอมระเหยในพืช หมักพืชกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้างหรือขวดรูปชมพู่ ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก นำเอาสารที่สกัดได้ไปแยกเอาตัวทำละลายออกโดยการกลั่นหรือการระเหย

4.2 การสกัดร้อน

การสกัดร้อนทำได้โดยใช้เครื่อง Soxhlet extraction apparatus ซึ่งเครื่องมือนี้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ ส่วนล่างเป็นภาชนะบรรจุตัวทำละลาย ส่วนกลางเป็นอุปกรณ์ลักษณะพิเศษที่ของเหลวสามารถไหลกลับลงสู่ภาชนะส่วนล่างได้ ซึ่งส่วนนี้ใช้บรรจุสารที่ต้องการสกัด และส่วนบนสุดคือเครื่องควบแน่น (condenser) หลักการทำงานของเครื่อง Soxhlet extraction apparatus คือเมื่อให้ความร้อนแก่ภาชนะส่วนล่าง ตัวทำละลายจะระเหยเป็นไอผ่านท่อแก้วของอุปกรณ์ส่วนกลางผ่านไปยังเครื่องควบแน่นและควบแน่นกลับเป็นของเหลวลงสู่อุปกรณ์ส่วนกลางแล้วสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่

ต้องการสกัด เมื่อระดับของตัวทำละลายในอุปกรณ์ส่วนกลางสูงถึงขีดกำหนดตัวทำละลายจะไหลกลับลงมายังภาชนะส่วนล่าง พร้อมทั้งละลายเอาสารที่ต้องการสกัดออกมาด้วย ตัวทำละลายนี้จะระเหยเป็นไอไปเรื่อยๆจนกว่าการสกัดจะสิ้นสุด วิธีนี้ตัวทำละลายบริสุทธิ์เท่านั้นที่จะสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสกัดทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพดีและไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย หลังจากสิ้นสุดการสกัดนำเอาสารที่สกัดได้ไปแยกเอาตัวทำละลายออกโดยการกลั่นหรือการระเหย

หลักการเลือกตัวทำละลายในการสกัด (วันดี, 2536)

- ควรจะละลายสารที่ต้องการสกัด
- ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของสารผสมที่จะถูกสกัดนั้น
- ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ ควรแยกออกจากตัวถูกละลายได้ง่ายภายหลังที่สกัดแล้วเช่น การกลั่นระเหย
- ไม่ควรทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด

5. การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤตภายใต้ความดันสูง (Supercritical Carbon-dioxide Extraction)

วิธีนี้จะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นหอมมาก เพราะประสิทธิภาพการสกัดสูง วิธีสกัดทำโดยนำพืชที่ต้องการสกัดใส่ลงใน stainless steel tank แล้วผ่านก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้ความดันสูงไปใน stainless steel tank (ความดันก๊าซ 200 เท่าของความดันบรรยากาศและอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส) ก๊าซจะเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลวมีคุณสมบัติในการละลายสูง (solvent properties) ซึ่งจะสามารถสกัดสารหอมออกมาได้มาก เมื่อลดความดันลงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเปลี่ยนสถานะกลับมาเป็นก๊าซแยกตัวออกจากสารสกัด วิธีนี้มีข้อดีคือไม่ใช้ความร้อน ดังนั้นสารหอมต่าง ๆ จะไม่สลายตัว คงสภาพเหมือนในสภาวะธรรมชาติ และได้ปริมาณสารสกัดสูง ข้อเสียคือเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดมีราคาแพง

ปัจจัยในการเลือกวิธีสกัดสารหอม

แหล่งของสารให้กลิ่นไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ที่มีองค์ประกอบซับซ้อนจะไม่มีวิธีใดวิธีหนึ่งที่ใช้ในการสกัดได้ดีที่สุด แต่ข้อสำคัญคือวิธีที่ใช้จะต้องแสดงสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่สุดและได้กลิ่นที่มีอยู่จริงในวัตถุดิบให้กลิ่นนั้น โดยจะเลือกวิธีการใดในการสกัดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้ (มนิษา, 2546)

1. ความสามารถในการระเหยและจุดเดือดของสารให้กลิ่น
2. จุดประสงค์ของการวิเคราะห์ ว่าเป็นการวิเคราะห์ทางคุณภาพหรือปริมาณของสาร
3. ความมีขั้วของสาร (polarity) ที่ต้องการสกัดออกจากวัตถุดิบของสารให้กลิ่น

4. ความไม่เสถียรของสาร โดยสารประกอบหลายตัวที่ไม่คงตัวอาจเกิดการ oxidize กับอากาศ หรือเกิดการแตกตัวเมื่อสัมผัสความร้อนสูงหรือสัมผัสความเป็นกรด-ด่างสูง
5. ระดับความเข้มข้นและปริมาณวัตถุที่จะนำมาใช้ โดยทั่วไปสารที่ให้กลิ่นจะมีอยู่ในปริมาณต่ำ จึงต้องทำให้เข้มข้นก่อนนำไปใช้ตามจุดประสงค์ต่าง ๆ
6. ความซับซ้อนของกลิ่น องค์ประกอบที่ให้กลิ่นในวัตถุดิบจะมีความซับซ้อนมาก บางครั้งวัตถุดิบบางชนิดมีองค์ประกอบมากกว่า 100 ชนิด ซึ่งจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันหลายอย่างทั้งในด้านของความมีขี้ การละลาย และค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่า pH)
7. โครงสร้างของวัตถุดิบ (matrix) ส่วนใหญ่แล้วสารระเหยต่าง ๆ จะอยู่ภายในเซลล์ จึงต้องมีการทำลายโครงสร้างเซลล์เพื่อให้ปล่อยสารออกมา ทำให้สายพันธุ์มีสารที่ไม่ระเหยปะปนอยู่

สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือความเสถียรของสารระเหย เช่น ถ้าสลายตัวเมื่อถูกความร้อนก็ควรใช้อุณหภูมิต่ำหรือถ้าเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายก็ไม่ควรให้สัมผัสกับออกซิเจนมาก ส่วนมาตรฐานอื่นที่ใช้ตัดสินเลือกวิธีที่เหมาะสมได้แก่ การพิจารณาการทดลองว่าเป็นการวิเคราะห์เพื่อบ่งบอกชนิดของสารระเหยที่ยังไม่รู้จัก การวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้น หรือเป็นการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี

ประโยชน์ของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันเช่น ขับลม ฆ่าเชื้อ ด้านแบคทีเรียและต้านเชื้อรา บรรเทาอาการบวมหรืออักเสบ ป้องกันการชัก ช่วยระงับความกังวล ทำให้จิตใจเบิกบาน ทั้งนี้ขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด ด้วยคุณสมบัติต่าง ๆ ดังกล่าวน้ำมันหอมระเหยได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม และใช้ในตำรับยา (วันดี, 2536) ยกตัวอย่างเช่น

- เป็นส่วนประกอบของเครื่องบริโภค เช่น เครื่องดื่ม, ผลิตภัณฑ์นม, อาหารสำเร็จรูป, อาหารกึ่งสำเร็จรูป, ลูกอม และเครื่องปรุงรส เป็นต้น
- เป็นส่วนประกอบของเครื่องอุปโภค เช่น เครื่องสำอาง, ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด, น้ำหอม, ผงซักฟอก, ยาสีฟีน, ยาสระผม, ฐูป และเทียน เป็นต้น
- เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ยาทางการแพทย์ เช่น ยาคุม, ยาทา และ ยาอม เป็นต้น
- ใช้เป็นสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชหรือสัตว์
- ใช้ถนอมอาหาร
- ใช้เป็นเคมีภัณฑ์ในอุตสาหกรรม

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยและกลิ่นหอม

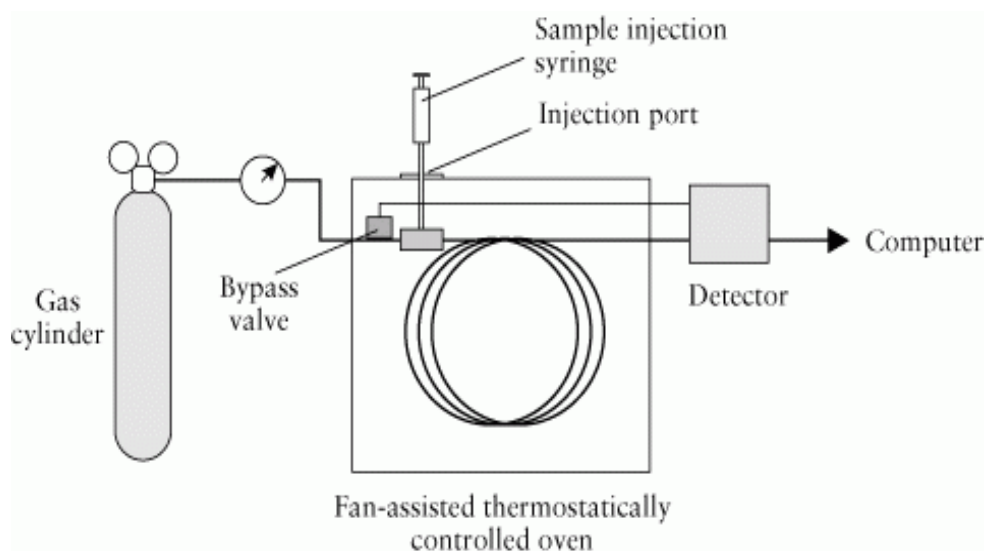
Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

GC-MS เป็นเทคนิคที่นำมาใช้สำหรับวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่าง ๆ ที่มีอยู่ในสารที่เราสนใจ เป็นวิธีที่สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้อย่างค่อนข้างแม่นยำโดยอาศัยการเปรียบเทียบ fingerprint ของเลขมวล (mass number) ของสารสายพันธุ์นั้น ๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ เทคนิคนี้สามารถใช้วิเคราะห์สารทั้งในเชิงปริมาณ (quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ได้อย่างถูกต้อง

เครื่อง GC-MS ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC (Gas chromatography) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในสายพันธุ์ให้ออกมาทีละองค์ประกอบก่อนที่จะเข้าสู่ detector และ อีกส่วนคือ เครื่อง MS (Mass spectrometry) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น detector ในการตรวจสอบว่าองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ผ่านออกมาจากเครื่อง GC นั้น มีเลขมวล (mass number) เป็นเท่าไร เพื่อที่จะสามารถทำนายได้ว่าสารที่เราสนใจอยู่นั้นมีองค์ประกอบชนิดใดบ้าง และมีปริมาณเท่าไร

คุณสมบัติของเครื่อง GC

GC เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ของสารที่เราสนใจซึ่งเทคนิคนี้เหมาะที่จะใช้กับสารที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถระเหยกลายเป็น gas ได้เมื่อถูกความร้อนและกลไกที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารสายพันธุ์จะอาศัยหลักของความชอบที่แตกต่างกันขององค์ประกอบในสายพันธุ์ที่มีต่อ phase 2 phase คือ stationary phase และ mobile phase เครื่อง GC สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนคือ Injector, Oven และ Detector (รูปที่ 1-3)



รูปที่ 1-3 ส่วนประกอบพื้นฐานของ GC

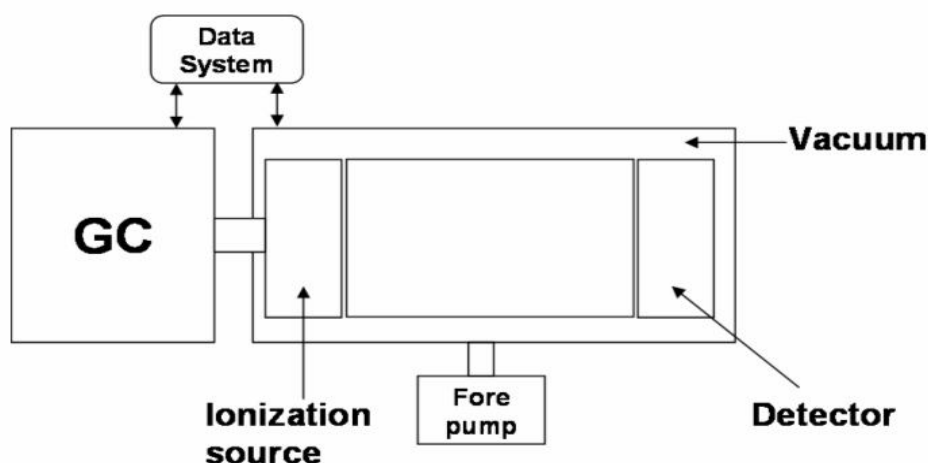
Injector คือ ส่วนที่สารสายพันธ์จะถูกฉีดเข้าสู่เครื่อง และระเหยเป็น gas พร้อมกับถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนที่จะเข้าสู่ column อุณหภูมิที่เหมาะสมของ injector ควรเป็นอุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้สารสายพันธ์สามารถระเหยได้แต่ต้องไม่ถูกทำให้สลายตัว (decompose)

Oven คือ ส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุ column เอาไว้ และเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของ column ให้เปลี่ยนไปตามความเหมาะสมกับสารที่ถูกฉีด ซึ่งอุณหภูมิของ oven นั้นจะสามารถปรับเปลี่ยนได้ 2 แบบคือ isocratic temperature และ gradient temperature แล้วแต่ความต้องการของผู้วิเคราะห์ ข้อดีของการทำ gradient temperature คือ สามารถใช้กับสารสายพันธ์ที่มีช่วงจุดเดือดกว้าง (wide boiling range) และยังช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์หลังได้อีกด้วย

Detector คือ ส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารสายพันธ์ คว้าสารที่สนใจนั้นมีปริมาณอยู่เท่าไร ซึ่งความสามารถของการตรวจวัดนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของ detector ที่เลือกใช้ ชนิดของ detector ที่ใช้กับเครื่อง GC นั้นมีอยู่หลายอย่าง เช่น Thermal Conductivity Detector, Flame Ionization Detector, Electron Capture Detector และ Mass Spectrometry

คุณสมบัติของ Mass Spectrometer (MS)

MS เป็น detector ที่ใช้ตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารสายพันธ์ (รูปที่ 1-4) โดยมีกลไกคือ โมเลกุลขององค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจากสารสายพันธ์โดยเครื่อง GC จะถูกไอออไนซ์ในสถานะสุญญากาศแล้วตรวจวัดออกมาเป็นเลขมวล (Mass number) เทียบกับฐานข้อมูลอ้างอิง จากนั้นจึงแปลผลออกมาเป็นชื่อขององค์ประกอบนั้น ๆ



รูปที่ 1-4 ส่วนประกอบพื้นฐานของ Mass Spectrometer

การทำงานของเครื่อง GC-MS

เมื่อเตรียมสายพันธุ์สารเสร็จเรียบร้อยแล้ว นำสายพันธุ์มาฉีดเข้าทาง injector ของเครื่อง GC จากนั้นสารจะถูกแยกออกเป็นองค์ประกอบต่าง ๆ เมื่อผ่านเข้าสู่ column ที่อยู่ใน oven องค์ประกอบใดที่ถูกแยกออกมาจาก column ก่อนก็จะผ่านเข้าไปในส่วน of เครื่อง MS ซึ่งมีสถานะเป็นสุญญากาศ จากนั้นเข้าไปในส่วน ionization source ซึ่งจะทำหน้าที่ ionize โมเลกุลที่ผ่านเข้ามาให้กลายเป็นประจุ ประจุเหล่านี้จะเดินทางผ่านเครื่องคัดแยกและแยกแยะขนาดของประจุ (mass analyzer) คว้าประจุเหล่านั้นประกอบไปด้วยขนาดมวลเท่าใดบ้าง ก่อนที่จะเดินทางเข้าสู่เครื่องตรวจวัดปริมาณประจุ (detector) เพื่อตรวจหาปริมาณของประจุแล้วแปลผลออกมาเป็นปริมาณขององค์ประกอบแต่ละตัวที่มีอยู่ในสารสายพันธุ์นั้น ๆ

ข้อดีของเครื่อง GC-MS

1. สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งแบบทั่วไปและแบบเฉพาะเจาะจง
2. ให้ sensitivity ที่สูง
3. สามารถบ่งชี้ถึงชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารสายพันธุ์ได้
4. สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

ข้อเสียของเครื่อง GC-MS

1. ราคาแพง
2. ค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาเครื่องสูง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Taroena and Zwaving (1991) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลในประเทศอินโดนีเซียซึ่งได้จากการกลั่นด้วยน้ำและการสกัดปิโตรเลียมอีเทอร์ จากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ GC-MS พบว่าสารสำคัญที่พบได้แก่ สาร sabinene และ terpinen-4-ol นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม phenylbutanoids ได้แก่ trans-1-(3, 4-dimethoxyphenyl) but-1-ene และ trans-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene หรือสาร DMPBD โดยสารในกลุ่ม phenylbutanoids จะพบมากในน้ำมันที่ได้จากการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ นอกจากนี้ยังพบสาร trans-4-(3,4-dimethoxyphenyl) but-3-ene-1-yl acetate

Pongprayoon *et al.*, (1996) และ Taroena and Zwaving (1991) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลพบว่าน้ำมันไพลมีสารประกอบกลุ่ม monoterpene เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งได้แก่ Sabinene และ Terpinen-4-ol และมีสารในกลุ่มของ Sesquiterpene ในปริมาณน้อย ได้แก่สาร Sesquiphellandrene นอกจากนี้สารในกลุ่ม terpene แล้วในน้ำมันไพลยังพบสารในกลุ่ม Phenylbutanoids ซึ่งน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำมีสารในกลุ่มนี้เป็นเป็นองค์ประกอบอยู่ 25% ในขณะที่

สารสกัดที่ได้จากปีโตรเลียมอีเทอร์มีสารในกลุ่ม Phenylbutanoids ประมาณ 46 % ซึ่งสารในกลุ่มนี้ได้แก่ *trans*-1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-1-ene, *trans*-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene และ *trans*-4-(3,4-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-yl acetate

Bhuiyan *et al.* (2008) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลที่สกัดจากส่วนใบและเหง้าโดยใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำ ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้ำมันจากเหง้าไพล คือ triquinacene 1,4-bis (methoxy) (26.47%), (Z)-ocimene (21.97 %) และ terpinen-4-ol (18.45 %)

Bua-in and Paisooksantivatana (2009) ศึกษาความผันแปรขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพล ที่ได้จากการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟ โดยตัวอย่างไพลแบ่งเป็นกลุ่มตามภูมิภาค ผลการทดลองพบว่า น้ำมันไพลจากเหง้าไพลที่เก็บจากภาคตะวันตกให้ปริมาณน้ำมันไพลสูงที่สุด โดยไพลที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรีให้ปริมาณน้ำมันสูงที่สุดคือ (21 mL/kg) จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC พบว่าสารสำคัญที่พบมากในน้ำมันไพลได้แก่ sabinene, terpinen-4-ol and DMPBD ((*E*)-1(3, 4-dimethylphenyl) butadiene) ซึ่งพบในทุกแหล่งเก็บ และพบว่าปริมาณสารสำคัญในน้ำมันไพลที่สกัดจากเหง้าไพลในภูมิภาคต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$)

อาภาพรรณ และคณะ (2009) ศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารหอมระเหยพืชวงศ์ Zingiberaceae ด้วยเทคนิค Head Space Gas Chromatography Mass Spectrometry พบว่าน้ำมันที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญได้แก่ α -terpinene (9.03 %), γ -terpinene (8.99 %), β -pinene (7.36 %), α -pinene (6.85 %) และ α -thujene (5.30 %)

Sabulal *et al.* (2007) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่สกัดได้จากเหง้าไพลในประเทศอินเดีย ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC และ GC-MS พบว่าสารสำคัญที่พบมากคือสารในกลุ่ม Phenylbutanoids ได้แก่ (*E*)-1-(3',4'-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) (31.1%) ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพด้านการอักเสบได้ดี และพบสารอื่น ๆ ได้แก่ (*E*)-1-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-1-ene (23.1 %) (*E*)- β -ocimene (12.7 %), β -pinene (7.4 %) และ linalool (4.0 %)

เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *in vitro* enzymatic amplification เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนหรือปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) เป็นบริเวณเล็ก ๆ ในสายดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากขึ้นเป็นล้านเท่าภายในหลอดทดลองโดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ปฏิกิริยาพีซีอาร์ค้นพบครั้งแรก

โดย Mullis *et al.*, (1986) โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติของการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต องค์ประกอบสำคัญของปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มากนัก แต่ต้องมีดีเอ็นเอใน ส่วนที่ต้องการรวมอยู่ด้วย
2. ไพริเมอร์ เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ ต้นแบบในบริเวณที่ต้องการบนดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย
3. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) มักเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงาน ในอุณหภูมิสูง ๆ ได้ เช่น เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus*
4. ดิวอกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dGTP, dTTP และ dCTP เพื่อใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพริเมอร์
5. แมกนีเซียมคลอไรด์ โดยแมกนีเซียมเป็นสิ่งสำคัญในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจาก พบว่าในการจำลองตัวเองของสิ่งมีชีวิตจะมีแมกนีเซียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลาย ๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพริเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม
3. ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพริเมอร์แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัย เอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลาย ๆ รอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุก รอบ ลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า (สมพร, 2546)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง ชนิดหนึ่ง โดยเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซม

(nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอ หรือเกิดพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ การตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอนับว่ามีประสิทธิภาพกว่าการตรวจสอบในระดับอื่น ๆ คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดของพืชก็ได้โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม การตรวจสอบสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีน และส่วนที่ไม่ใช่ยีน โดยการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอนี้อาศัยหลักการว่า โมเลกุลดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเองได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมไปสู่เซลล์ลูกและคงรูปที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งเนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแต่ละชนิดภายในสายดีเอ็นเอ หรือเปลี่ยนแปลงขนาดดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับของโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีบางส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มเข้ามา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม (rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือต่างโครโมโซม (transposition) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2545)

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของพืชและสัตว์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากการศึกษาลึกลงไปในระดับโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นตัวควบคุมให้เกิดลักษณะต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายชนิด ทั้งที่เป็นประเภท dominant markers ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygote กับ heterozygote ได้ เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอฟดี (Random Amplified Polymorphics DNA, RAPDs) และเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพีสามารถนำมาใช้ศึกษาได้เลยโดยไม่มีจำเป็นต้องรู้ข้อมูลของจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นมาก่อน และสามารถศึกษาได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (multilocus detection) เครื่องหมายดีเอ็นเออีกประเภทหนึ่งได้แก่ co-dominant markers ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง homozygote กับ heterozygote ได้ เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs) เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอสเอสอาร์หรือไมโครแซทเทลไลท์ [Simple Sequence Repeats (SSRs) หรือ Microsatellites (MS)] และเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอสเอสซีพี (Single Strand Conformational Polymorphisms, SSCP) การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี เอสเอสอาร์ และเอสเอสซีพี จำเป็นจะต้องมีข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้จะมีความจำเพาะกับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในจีโนม เครื่องหมายโมเลกุลได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้จะมีความจำเพาะในพันธุ์แต่ละพันธุ์

เอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่ง หลักการพื้นฐานของเอเอฟแอลพีคือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจาก การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่ขนาดสั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็จะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราวเดียวกันมีมากและไม่สามารถจะแยกจากกันหรือตรวจสอบได้โดยวิธีทั่วไป การสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำเอเอฟแอลพีจึงมีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่าเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้นเท่านั้น ซึ่งจะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วนและสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไป รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่ง เรียกว่า ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพีจึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล เรียกว่า เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker)

หลักการทำเอเอฟแอลพี

ขั้นแรก คือการนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส เรียกว่า rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส เรียกว่า frequent cutter แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นต่อไป การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะอาจใช้ชนิดที่เป็น rare cutter ทั้งสองชนิดก็ได้ แต่จะตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอจำนวนน้อย เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้มีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้คือเอนไซม์ *EcoRI* ร่วมกับ *MseI* เนื่องจาก *MseI* ตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ *EcoRI* มีราคาถูกและการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี โดยมีโอกาสพบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย

ขั้นที่สอง คือการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณ

ดีเอ็นเอบางชิ้น จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3' จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification

การทำปฏิกิริยา preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 ขั้นตอน นอกจากเป็นการประกันว่าการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไปอย่างถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ยังช่วยลด background ที่เป็นพื้นดำในลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย นอกจากนี้ยังอาจทำ preselective amplification ด้วยไพรเมอร์ที่ไม่มีเบสคัดเลือก (ไพรเมอร์ +0) ได้ในกรณีการวิเคราะห์จีโนมขนาดเล็กที่ต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกจำนวนน้อย เพื่อทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นและสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น

ขั้นสุดท้าย คือการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการแยกโดยวิธีนี้อยู่ในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใช้วิธีติดฉลากไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสี หลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสร็จแล้ว ตรวจสอบโดยการถ่ายภาพรังสีในตัว (autoradiograph) หรืออาจใช้วิธีติดฉลากด้วยสารเรืองแสงแล้วตรวจสอบโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติก็ได้ การที่ต้องตรวจสอบผลการทำเอเอฟแอลพีโดยใช้สารกัมมันตรังสีหรือใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ทำให้เกิดข้อจำกัดในห้องปฏิบัติการหลายอย่าง จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีตรวจสอบลายพิมพ์เอเอฟแอลพีด้วยการไฮบริดเชชัน โดยใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (non radioactive label) หรือวิธีย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3) ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางดีเอ็นเอทั่วไป

ที่มาของความแตกต่างของลายพิมพ์เอเอฟแอลพี

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือพอลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยน

แปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ผลที่เกิดขึ้นคือการมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพีจึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะเด่น (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพี แบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า (สุรินทร์, 2545)

เนื่องจากเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงนิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หรือใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง โดยเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันได้ เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ในถั่ว azuki (*Vigna angularis*) (Xu *et al.*, 2000), daylily (*Hemerocallis* spp.) (Tomkins *et al.*, 2001), ข้าวสาลี *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (Soleimani *et al.*, 2002), ถั่ว cowpea พันธุ์พื้นเมือง (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*) (Tosti and Negri, 2002) รวมถึงสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสกุลเดียวกัน แต่ต่างชนิดกัน เช่น การศึกษาใน Bermudagrass (*Cynodon* spp.) (Zhang *et al.*, 1999) และ อ้อย (*Saccharum* spp.) (Lima *et al.*, 2002) เป็นต้น

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

1. ศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยไพลที่เหมาะสม
2. ปลุกเพื่ออนุรักษ์และศึกษาลักษณะทางการเกษตร
3. จำแนกสายพันธุ์ไพลโดยใช้เทคนิคเอฟแอลพี

1. การศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันไพลที่เหมาะสม

การเตรียมวัตถุดิบ

นำเหง้าไพลสด 3 ตัวอย่าง มาล้างให้สะอาดแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาหั่นและ ปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด แยกไพลที่ได้เป็น 2 ส่วน เพื่อนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ และการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวิธีสกัดแต่ละวิธีมีขั้นตอนดังนี้

วิธีการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน

การสกัดทำโดยนำตัวอย่างเหง้าไพลสดแยกใส่ใน flask เติมตัวทำละลายเฮกเซนให้ท่วมตัวอย่าง แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน แยกสารละลายที่สกัดได้มากรอง ทำการสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนจนครบ 3 ครั้ง นำสารละลายที่สกัดได้ทั้ง 3 ครั้ง มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator จะได้สารสกัดด้วยเฮกเซน

วิธีการกลั่นด้วยน้ำ

นำเหง้าไพลใส่ในขวดแก้วก้นกลม เติมน้ำให้ท่วม จากนั้นนำไปต่อเข้ากับชุดกลั่น ทำการกลั่นเป็นเวลา 8 ชั่วโมง น้ำมันที่ได้จากการกลั่นจะแยกตัวจากชั้นน้ำเป็นของเหลว 2 ชั้น น้ำมันไพลซึ่งเบากว่าน้ำจะลอยตัวอยู่ส่วนบน นำน้ำมันที่ได้มาแยกเอาน้ำส่วนที่ปนอยู่ออกให้หมด โดยใช้สาร โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส วัดปริมาตรของน้ำมันที่ได้เพื่อใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำมันที่ได้เทียบกับน้ำหนักเหง้าไพลที่ใช้กลั่น

การตรวจวัดคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันหอมระเหย

หลังจากสกัดน้ำมันไพลตามวิธีการที่ทำการทดสอบแล้ว ตรวจวัดคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันหอมระเหยไพลจากตัวอย่างทั้งหมด โดยตรวจวัดค่า Refractive index, ค่า Optical rotation และค่า Specific gravity จากนั้นเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานที่สำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.)

ได้กำหนดไว้ โดยกำหนดให้ค่า Refractive index ควรมีค่าอยู่ในช่วง 0.880-0.925, ค่า Optical rotation มีค่าอยู่ในช่วง (-34.5)-(-25.5) และค่า specific gravity อยู่ในช่วง 0.880-0.925

การตรวจวัดคุณสมบัติทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพล โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC-MS) เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลที่สกัดได้กับค่ามาตรฐานของน้ำมันไพลที่กำหนดโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และ สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) ค่ามาตรฐานดังกล่าวมีรายละเอียดดังตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1-3 มาตรฐานน้ำมันไพล

สารสำคัญ	มาตรฐาน วว.*	มาตรฐาน สมอ.*
α -Pinene	0.90-4.16	1.00-3.00
Sabinene	25.70-40.31	31.00-48.00
α -Terpinene	6.26-16.50	3.00-8.00
γ -Terpinene	2.00-12.66	8.00-10.00
Terpinen-4-ol	25.40-41.50	19.00-36.00
DMPBD	0.50-5.88	-

*หมายเหตุ วว. คือ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2552)

สมอ. คือ สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2541)

2. การปลูกเพื่ออนุรักษ์และศึกษาลักษณะทางการเกษตร

ปลูกไพลที่รวบรวมมาจากแหล่งต่าง ๆ จำนวนทั้งสิ้น 132 ตัวอย่าง ในแปลงรวบรวมพันธุ์กรรมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา โดยใช้ระยะห่างระหว่างแถว และระยะห่างระหว่างต้น 75 เซนติเมตร โดยปลูกตัวอย่างละ 2 แถว แถวละ 5 ต้น คัดเลือกท่อนพันธุ์ไพลที่มีความสมบูรณ์ไม่มีการเข้าทำลายของโรค หรือแมลง ชุบสารเคมีป้องกันเชื้อราก่อนปลูก ชุบหลุมปลูก และใส่ปุ๋ยมูลสัตว์รองก้นหลุมก่อนปลูก ให้น้ำโดยใช้ระบบมินิสปริงเกอร์ และให้ตามร่อง

เนื่องจากไพลเป็นพืชสมุนไพรที่ทางคณะผู้วิจัยได้รวบรวมพันธุ์กรรมมาอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2547 ซึ่งประสบปัญหาเรื่องการเข้าทำลายของโรคเหี่ยวจากเชื้อแบคทีเรีย ทำให้มีความจำเป็นต้องย้ายแปลงปลูกเพื่อรักษาพันธุ์กรรมไพลที่ได้รวบรวมมา ในปีงบประมาณนี้จึงปลูกรวบรวมพันธุ์กรรมในแปลงรวบรวมพันธุ์เพื่อรักษาพันธุ์กรรมดังกล่าวไว้ เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การเติบโต การให้ผลผลิต ปริมาณน้ำมันหอมระเหยและองค์ประกอบทางเคมี

3. จำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคเอฟแอลพี

จัดกลุ่มตัวอย่างโพลที่ทำการศึกษาเป็น 2 กลุ่มคือ

โพลกลุ่มที่ 1 จากแปลงรวบรวมพันธุ์กรรม ของศูนย์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช ซึ่งเก็บรวบรวมตั้งแต่ปี 2547 ที่มีอายุการปลูกเท่ากันคือ 32 เดือน (2 ปี 8 เดือน) ทำให้ทราบผลผลิตไรโซมได้ทันที หลังทำการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคเอฟแอลพีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นำไรโซมไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันและองค์ประกอบทางเคมีเปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้ำมันโพลตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต และปริมาณน้ำมันอยู่ในเกณฑ์ที่ดี รวมทั้งมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ ซึ่งในโพลกลุ่มที่ 1 นี้มีจำนวนตัวอย่างสิ้น 21 ตัวอย่าง

โพลกลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างที่ทำการศึกษาปลูกในปี 2552 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาผลผลิต ปริมาณน้ำมัน และองค์ประกอบทางเคมี ในขณะเดียวกันได้ทำการศึกษจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์โพลด้วยเทคนิคเอฟแอลพี โดยโพลกลุ่มที่ 2 นี้มีจำนวนตัวอย่างสิ้น 132 ตัวอย่าง

ขั้นตอนการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอฟแอลพีมีดังต่อไปนี้

1. การสกัดแยกดีเอ็นเอ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.*, (1992) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.1 นำใบอ่อนของตัวอย่างโพลมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่ง เติมนิโตรเจนเหลวให้ท่วม บดให้ละเอียด จากนั้นจึงถ่ายผงโบลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี 2XCTAB buffer (2 % hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 10 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris HCl, pH 8.0) 5 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 100 ไมโครลิตร

1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก ๆ 10 นาที

1.3 นำหลอดมาไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลง แล้วเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24: 1) 5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและคลอโรฟอร์มออกจากกัน

1.5 ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่เติม linear polyacrylamide 100 ไมโครลิตร และเติมไอโซโพรพานอล 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.7 เทส่วนสารละลายออกให้หมด แล้วล้างตะกอนด้วย washing buffer 500 ไมโครลิตร (10 mM sodium acetate, 70 % ethanol) เคาะข้างหลอดเบา ๆ เพื่อละลายเกลือออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ

- 1.8 นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- 1.9 เทสารละลายออกให้หมด คั่วหลอดบนกระดาษซับให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย RNase buffer 500 ไมโครลิตร (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM NaCl)
- 1.10 เติม RNase A (10 mg/ml) 2 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน
- 1.11 สกัดเอนไซม์ RNase A และโปรตีนที่อาจหลงเหลืออยู่ด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (25 : 24 : 1) 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
- 1.12 นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 1.13 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วนำมาสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) 500 ไมโครลิตร
- 1.14 นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 1.15 ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม linear polyacrylamide 20 ไมโครลิตร, โซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2 ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายที่ดูมา และเติมเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูมา
- 1.16 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 1.17 นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 1.18 เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 %
- 1.19 นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
- 1.20 เทสารละลายทิ้ง คั่วหลอดบนกระดาษซับให้แห้ง
- 1.21 ละลายตะกอนใน TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

2.1 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีการวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์

2.1.1 เตรียมเจลอะกาโรส 0.8 % โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม เติม TAE buffer 100 มิลลิลิตร (4.84 g Tris-base, 1.15 ml glacial acetic acid, 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0) นำไปต้มจนเดือด เพื่อให้ผงอะกาโรสละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน

2.1.2 ปลอ่ยให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในแม่พิมพ์ ให้เจลหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ตรวจสอบดูว่าไม่มีฟองอากาศบนแผ่นเจลแล้ว จึงเสียบหัวลงที่ปลายด้านบนของแม่พิมพ์

2.1.3 ทิ้งให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

2.1.4 คิงหิวออกจากแผ่นเจลจะได้ช่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอ นำเจลออกจากถาดแม่พิมพ์ใส่ลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส โดยให้ด้านที่มีช่องหยอดตัวอย่างดีเอ็นเออยู่ด้านข้างลบ เติม TAE buffer ให้ท่วมแผ่นเจล ผิวเจลควรอยู่ที่สารละลายบัฟเฟอร์ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร

2.1.5 ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6x loading buffer (0.25 % bromphenol blue, 0.25 % xylene cyanol, 30 % glycerol) ในอัตราส่วน ดีเอ็นเอ: Loading buffer เท่ากับ 5: 1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยไมโครปิเปตก่อนจะหยอดลงในช่องบนอะกาโรสเจล

2.1.6 เมื่อหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอจนครบแล้ว ต้องหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb plus DNA ladder marker) ที่ทราบขนาดและความเข้มข้น เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาด และความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอ

2.1.7 ปิดฝาเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิสและเปิดเครื่อง กระแสไฟฟ้าจะวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ประมาณ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30 - 40 นาที หรือ จนกระทั่งสีของ Loading buffer เคลื่อนที่ได้ระยะทางประมาณ 2 ใน 3 ของแผ่นเจลจึงปิดเครื่อง

2.1.8 นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide 0.5 µg /ml) ประมาณ 10 นาที นำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำประปาที่กำลังไหลประมาณ 5 นาที

2.1.9 นำแผ่นเจลไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV transilluminator เปรียบเทียบความเข้มข้นของการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer วิธีนี้เป็นการตรวจสอบความบริสุทธิ์และวัดปริมาณดีเอ็นเอจากการวัดค่า Optical Density (OD) ซึ่งเป็นค่าการดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร หรือ OD260 โดยสามารถหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้จากสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$$

วัดค่าการดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร หรือ OD280 เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยค่า OD260/OD280 มีค่าระหว่าง 1.7 - 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปนอยู่ และถ้าค่าที่ได้ต่ำ แสดงว่ามีการเจือปนของโปรตีนหรือฟีนอล

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

3.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *EcoRI* และ *MseI* ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา มีดังนี้

1. สารละลายดีเอ็นเอ (50 ng/μl)	5.0	ไมโครลิตร
2. 10x Reaction buffer	2.50	ไมโครลิตร
3. <i>Eco</i> RI (20 U/μl)	0.125	ไมโครลิตร
4. <i>Mse</i> I (10 U/μl)	0.25	ไมโครลิตร
5. น้ำกลั่น	17.10	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.00	ไมโครลิตร

3.1.2 นำมาป่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (1x reaction buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate)

3.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาเติมสารต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter โดยลำดับเบสของ adapter แต่ละชนิดมีดังนี้

<i>Eco</i> RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>Mse</i> I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG -3'
	3'-TACTCAGGACTCAT -5'

ปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter มีดังนี้

1. สารละลายดีเอ็นเอ	25.0	ไมโครลิตร
2. <i>Eco</i> RI adapter (5 pmole/μl)	4.0	ไมโครลิตร
3. <i>Mse</i> I adapter (12.5 pmole/μl)	4.0	ไมโครลิตร
4. 10x T4 ligase buffer	5.0	ไมโครลิตร
5. T4 DNA ligase (1 U/μl)	1.0	ไมโครลิตร
6. น้ำกลั่น	11.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50.0	ไมโครลิตร

นำไปป่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปป่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ Preselective amplification และ Selective amplification

3.3.1 การทำ Preselective amplification ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ มีดังนี้

EcoRI primer +1 (E – A) 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

MseI primer +1 (M – C) 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC -3'

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ preselective amplification ใช้ปริมาณสารต่าง ๆ ดังนี้

1. สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 3.2	2.0	ไมโครลิตร
2. primer E-A (5 pmole/ μ l)	1.0	ไมโครลิตร
3. primer M-C (5 pmole/ μ l)	1.0	ไมโครลิตร
4. dNTP mix (2 mM)	2.5	ไมโครลิตร
5. 10x PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
6. MgCl ₂ (50 mM)	0.75	ไมโครลิตร
7. <i>Taq</i> polymerase (5 U/ μ l)	0.1	ไมโครลิตร
8. น้ำกลั่น	15.15	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.0	ไมโครลิตร

เตรียมและผสมสารละลายสำหรับทำพีซีอาร์ ให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

ตรวจสอบผลการทำ Preselective amplification โดยแบ่งผลผลิตพีซีอาร์มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้อมเจลด้วยสารละลายเอซีดีเอ็ม โบรไมด์จะพบรอยยาว (smear) ในช่วงขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่เหลือมาทำให้เจือจาง 20 เท่าด้วยสารละลาย TE เพื่อนำไปใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้น Selective amplification ต่อไป

3.3.2 การทำ Selective amplification เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

1. สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 3.3.1	5.0	ไมโครลิตร
2. primer E-ANN (5 pmole/ μ l)	1.0	ไมโครลิตร
3. primer M-CNN (5 pmole/ μ l)	1.0	ไมโครลิตร

4. dNTP mix (2 mM)	2.0	ไมโครลิตร
5. 10x PCR buffer	2.0	ไมโครลิตร
6. MgCl ₂ (50 mM)	0.6	ไมโครลิตร
7. <i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/μl)	0.1	ไมโครลิตร
8. น้ำกลั่น	8.3	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.00	ไมโครลิตร

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนนี้จะใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ เพื่อให้เกิดการคัดเลือก การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยคู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด (ชนิดละ 8 แบบ) รวม 64 คู่ไพรเมอร์ ดังนี้

ไพรเมอร์ชนิด *EcoRI* 8 แบบ

5'-GACTGCGTACCAATTCAAC- 3'	(E-AAC)
5'-GACTGCGTACCAATTCAAG- 3'	(E-AAG)
5'-GACTGCGTACCAATTCACA- 3'	(E-ACA)
5'-GACTGCGTACCAATTCACT- 3'	(E-ACT)
5'-GACTGCGTACCAATTCACC- 3'	(E-ACC)
5'-GACTGCGTACCAATTCACG- 3'	(E-ACG)
5'-GACTGCGTACCAATTCAGC- 3'	(E-AGC)
5'-GACTGCGTACCAATTCAGG- 3'	(E-AGG)

ไพรเมอร์ชนิด *MseI* 8 แบบ

5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'	(M-CAA)
5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'	(M-CAC)
5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'	(M-CAG)
5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'	(M-CAT)
5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'	(M-CTA)
5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'	(M-CTC)
5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'	(M-CTG)
5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'	(M-CTT)

เตรียมและผสมสารละลายสำหรับทำพีซีอาร์ให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์โดยใช้โปรแกรม Touch down ซึ่งใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 1 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

โดยในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) จะลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และทำปฏิกิริยาต่อ ดังนี้

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 23 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

3.4 การแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel

3.4.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

3.4.1.1 นำกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด ปล่อยให้กระจกแห้ง แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น โดยกระจกแผ่นหน้าจะมีลักษณะเป็นหูกระต่าย ส่วนกระจกแผ่นหลังเป็นกระจกสี่เหลี่ยมตรงขนาด 15x17 เซนติเมตร

3.4.1.2 เช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silane ให้ทั่วทั้งแผ่น เพื่อไม่ให้เจลติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

3.4.1.3 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร, เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก

3.4.1.4 นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยหันด้านที่ทาด้วย bind silane และ repel silane เข้าหากัน และวาง spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง จากนั้นใช้เทปกาวติดกระจกทั้ง 3 ด้านเพื่อกันไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา ใช้คลิปหนีบเพื่อยึดให้กระจกและ spacer อยู่คงที่

3.4.2 การเตรียม polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide : bisacrylamide เท่ากับ 29:1) ที่มียูเรีย (urea) เข้มข้น 7.5 โมลาร์ โดยมีส่วนผสมดังนี้

1. 30% acrylamide (29:1)	3.0	มิลลิลิตร
2. 5x TBE buffer	3.0	มิลลิลิตร
3. ยูเรีย	6.75	กรัม
4. น้ำกลั่น	3.75	มิลลิลิตร
5. 10 % APS	150	ไมโครลิตร
6. TEMED	8	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15	มิลลิลิตร

TBE = 89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA

APS = Ammonium persulfate

TEMED = N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine

3.4.2.1 ชั่งยูเรียใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น และ TBE buffer ปิดบีกเกอร์ด้วยแผ่นใสห่ออาหาร เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ซึ่งจะส่งผลให้ความเข้มข้นของสารละลายเปลี่ยนไป

3.4.2.2 นำไปอุ่นที่อ่างน้ำอุ่น อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เมื่อยูเรียละลายหมดแล้วรอนกระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณเท่ากับอุณหภูมิห้อง

3.4.2.3 เติม acrylamide, TEMED และ 10 % APS (ammonium persulfate) เขย่าเบา ๆ เพื่อผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

3.4.2.4 เทเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจก เลียบหัวลงไปด้านบน เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งตัวใช้เวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

3.4.3 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.4.3.1 เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วให้ล้างเจลที่ติดอยู่ด้านบนออกให้สะอาดด้วยน้ำประปา ดึงหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เติม 1x TBE ลงในช่องด้านบนและด้านล่างของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.4.3.2 เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 300 โวลต์ เพื่อทำการ pre-run ใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที

3.4.3.3 ปิดเครื่อง ล้างยูเรียที่ค้างอยู่ในช่องหัวในแต่ละช่องให้หมด โดยใช้เข็มฉีดยาคูดับฟเฟอร์ และฉีดยาคูดับฟเฟอร์ลงในช่องหัว

3.4.3.4 เตรียมตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอผสมกับ loading buffer (loading buffer; 10 ml formamide, 10 mg xylene cyanol, 10 mg bromphenol blue, 200 μ l 0.5 M EDTA pH 8.0) ในอัตราส่วนสารละลายดีเอ็นเอ 7.0 ไมโครลิตร ต่อ Loading buffer 2.0 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว และทำลาย secondary structure ของดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที

3.4.3.5 หยอดตัวอย่างสารละลายผสมของดีเอ็นเอในข้อ 3.4.3.4 ลงในช่องแต่ละช่องด้วยไมโครปิเปต และหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder marker ของ Fermentas) ที่ทราบขนาดเพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ

3.4.3.6 เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 300 โวลต์ เป็นเวลา 160 นาที เมื่อครบเวลาจึงปิดเครื่อง

3.4.3.7 ดูคัมพเฟอร์ออกจากช่องด้านบน นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้ง 2 ออกจากกัน ซึ่งเจลจะติดกับกระจกแผ่นหลังที่ทาด้วย bind silane นำเจลไปเชื่อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

3.4.4 การเชื่อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (Benbouza *et al.*, 2006)

3.4.4.1 นำกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่ในสารละลาย fixative (10 % absolute ethanol, 0.5 % acetic acid) นาน 5 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า ที่มีความเร็วคงที่ 100 รอบต่อนาที โดยวางกระจกให้ด้านที่มีเจลอยู่ด้านบน

3.4.4.2 ย้ายกระจกมาแช่ในถาดที่มีสารละลายซิลเวอร์ (0.15 % ซิลเวอร์ไนเตรท, 0.55% formaldehyde) นาน 6-7 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา

3.4.4.3 นำแผ่นกระจกมาล้างในน้ำกลั่น 1 วินาที จากนั้นย้ายกระจกลงในถาดที่มีสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่ ๆ (developer: 1.5 % sodium hydroxide, 0.74 % formaldehyde) เขย่าตลอดเวลาประมาณ 5-20 นาที

3.4.4.4 หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่กระจกในสารละลาย stop (10% absolute ethanol, 0.5 % acetic acid) นาน 2 นาที แล้วจึงผึ่งเจลให้แห้งในอากาศ

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีมาวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง ถ้ามีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์ “1” ถ้าไม่มีแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.20k คำนวณหาค่าความเหมือนทางพันธุกรรมโดยใช้วิธีของ Jaccard (Jaccard, 1908) จากนั้นวิเคราะห์จัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี unweighted pair group method of average (UPGMA) ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจะแสดงในรูปแบบของแผนภูมิทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

ผลการวิจัย

1. ปลูกรวบรวมพันธุ์กรรมไฟล

ปลูกไฟลที่รวบรวมมาจากแหล่งต่าง ๆ จำนวนทั้งสิ้น 132 ตัวอย่าง ในแปลงรวบรวมพันธุ์กรรมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา โดยใช้ระยะห่างระหว่างแถว และระยะห่างระหว่างต้น 75 เซนติเมตร โดยปลูกตัวอย่างละ 2 แถว แถวละ 5 ต้น กัดเลือกท่อนพันธุ์ไฟลที่มีความสมบูรณ์ไม่มีการเข้าทำลายของโรค หรือแมลง ชุบสารเคมีป้องกันเชื้อราก่อนปลูก ชุบหลุมปลูก และใส่ปุ๋ยมูลสัตว์รองกันหลุมก่อนปลูก ให้น้ำโดยใช้ระบบมินิสปริงเกอร์ และให้ตามร่อง

2. การศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันไฟลที่เหมาะสม

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไฟลโดยวิธีการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน และการสกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำของตัวอย่างไฟลสดจำนวน 3 ตัวอย่าง (PS1, PS2 และ PS3) พบว่าวิธีการสกัดมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำมันหอมระเหย โดยการสกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำจะให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำมีค่าเฉลี่ยน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 1.322 % ในขณะที่วิธีการสกัดเย็นด้วยเฮกเซนให้ปริมาณน้ำมันน้อยกว่า โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันหอมระเหยเพียง 0.885 % ในขณะที่ค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันของตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันคือ อยู่ในช่วง 1.0541-1.1510 % (ตารางที่ 1-4)

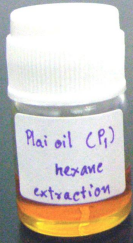
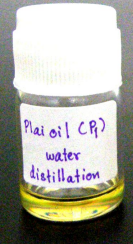
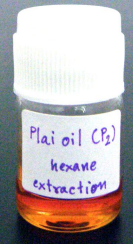
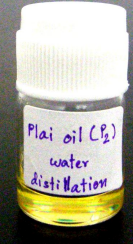
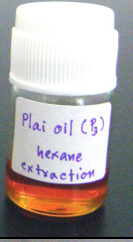

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของน้ำมันไฟลที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และการกลั่นด้วยน้ำพบว่า น้ำมันไฟลที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนจากไฟลทั้ง 3 ตัวอย่างมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองส้มอ่อน-เหลืองส้มเข้ม มีความขุ่นหนืด มีกลิ่นฉุนของไฟล ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำของไฟลทั้ง 3 ตัวอย่าง มีลักษณะคล้ายกันคือเป็นน้ำมันใสสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่นฉุน (ตารางที่ 1-5)

ผลจากการทดลองสกัดน้ำมันหอมระเหยไฟลด้วยวิธีการสกัดเย็น โดยใช้เฮกเซนและการสกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำ พบว่าพันธุ์ไฟลที่ใช้ในการสกัด และวิธีการที่ใช้ในการสกัด มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ได้ เมื่อเปรียบเทียบค่าคุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำมันหอมระเหยไฟลที่ได้กับค่ามาตรฐานของน้ำมันไฟลของสำนักมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) พบว่าค่า Specific gravity และ Refractive index และ Optical rotation ของน้ำมันไฟลทุกตัวอย่างที่ได้จากวิธีการสกัดทั้งสองวิธีมีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐาน สมอ. ยกเว้นน้ำมันหอมระเหยของไฟลของตัวอย่าง PS3 ที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำเท่านั้นที่มีค่า Optical rotation อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (ตารางที่ 1-6)

ตารางที่ 1-4 ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพลด้วยวิธีการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน และวิธีการกลั่นด้วยน้ำ

ตัวอย่างไพล	ปริมาณน้ำมัน (% v/w)		ค่าเฉลี่ย
	สกัดเย็นด้วยเฮกเซน	สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ	
PS1	0.941 ^c (0.125)	1.167 ^b (0.153)	1.0541 (0.176)
PS2	0.878 ^c (0.106)	1.333 ^{ab} (0.058)	1.1058 (0.261)
PS3	0.836 ^c (0.034)	1.467 ^a (0.115)	1.1510 (0.354)
ค่าเฉลี่ย	0.885 ^B (0.095)	1.322 ^A (0.1640)	

ตารางที่ 1-5 ลักษณะปรากฏของน้ำมันไพลจากการสกัดเย็นด้วยเฮกเซนและวิธีการกลั่นด้วยน้ำ

ตัวอย่างไพล	วิธีการสกัด	ลักษณะปรากฏของน้ำมันหอมระเหย	
PS1	สกัดเย็นด้วยเฮกเซน		สีเหลืองส้ม น้ำมันมีความหนืดสูง
	สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ		สีเหลืองใส น้ำมันมีความหนืดเล็กน้อย
PS2	สกัดเย็นด้วยเฮกเซน		สีเหลืองส้มเข้ม น้ำมันมีความหนืดปานกลาง
	สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ		สีเหลืองใส น้ำมันมีความหนืดเล็กน้อย
PS3	สกัดเย็นด้วยเฮกเซน		สีเหลืองส้มเข้ม น้ำมันมีความข้นหนืดปานกลาง
	สกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ		สีเหลืองใส น้ำมันมีความหนืดเล็กน้อย

ตารางที่ 1-6 ค่าคุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำมันหอมระเหยจากไพลด้วยวิธีการสกัดเย็นด้วยเฮกเซนและวิธีการกลั่นด้วยน้ำ

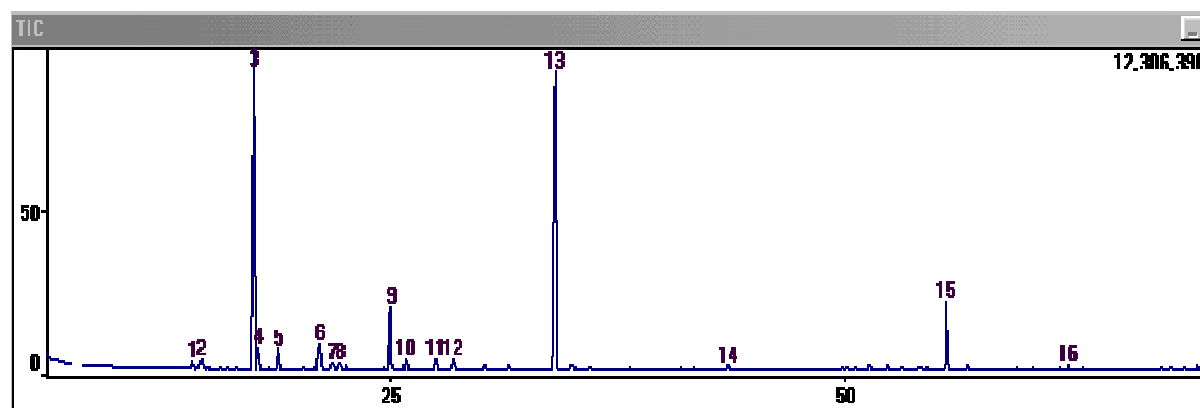
ค่าคุณภาพทาง กายภาพ/ มาตรฐาน สมอ.	ตัวอย่างไพล	สกัดเย็นด้วย เฮกเซน	สกัดด้วยการกลั่น ด้วยน้ำ	ค่าเฉลี่ย
Specific gravity 0.880-0.925	PS1	1.0450 ^a (0.0000)	0.9743 ^c (0.0006)	1.0097 ^A (0.0387)
	PS2	1.0243 ^b (0.0006)	0.9463 ^d (0.0006)	0.9853 ^B (0.0427)
	PS3	1.0253 ^b (0.0006)	0.9360 ^e (0.0010)	0.9807 ^C (0.0489)
	ค่าเฉลี่ย	1.0316 ^A (0.0101)	0.9522 ^B (0.0172)	
Refractive index 1.477-1.509	PS1	1.5567 ^a (0.0005)	1.5386 ^c (0.0006)	1.5476 ^A (0.0093)
	PS2	1.5506 ^b (0.0014)	1.5226 ^d (0.0036)	1.5366 ^B (0.0155)
	PS3	1.5477 ^b (0.0007)	1.5169 ^e (0.0002)	1.5323 ^C (0.0151)
	ค่าเฉลี่ย	1.5516 ^A (0.0040)	1.5260 ^B (0.0099)	
Optical rotation (-34.5)-(-25.5)	PS1	-11.7833 ^c (0.3819)	-21.5333 ^d (0.1041)	-16.6583 ^A (5.3462)
	PS2	-10.3833 ^b (0.2082)	-25.1167 ^e (0.2021)	-17.7500 ^B (8.0719)
	PS3	-9.6833 ^a (0.6171)	-27.5500 ^f (0.1323)	-18.6167 ^C (9.7941)
	ค่าเฉลี่ย	10.6167 ^A (1.0000)	-24.7333 ^B (2.6244)	

ปริมาณน้ำมันหอมระเหยและองค์ประกอบทางเคมี

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างไพลด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1-5 - 1-10 และตารางที่ 1-7 - 1-11

จากการเปรียบเทียบชนิด องค์ประกอบทางเคมี และปริมาณสารชนิดต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง GC-MS ของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากวิธีการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน และวิธีการกลั่นด้วยน้ำ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตัวอย่างไพลทั้ง 3 ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด และมียังองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ α -Pinene, Sabinene, α -Terpinene, γ -Terpinene, Terpinen-4-ol และ DMPBD ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานน้ำมันไพลของ สมอ. และ วว. (ตารางที่ 1-13) โดยสารที่พบมากที่สุดคือน้ำมันหอมระเหยคือ Sabinene เป็นสารมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันไพลที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำ มีปริมาณ Sabinene มากกว่าน้ำมันไพลที่ได้จากการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน ส่วนองค์ประกอบทางเคมีที่พบรองลงมาคือ Terinen-4-ol ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการลดการอักเสบและมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ จากผลการทดลองพบปริมาณ Terinen-4-ol ในน้ำมันไพลที่สกัดด้วยวิธีสกัดเย็นด้วยเฮกเซนมากกว่าในน้ำมันที่ได้จากวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (ตารางที่ 1-14)

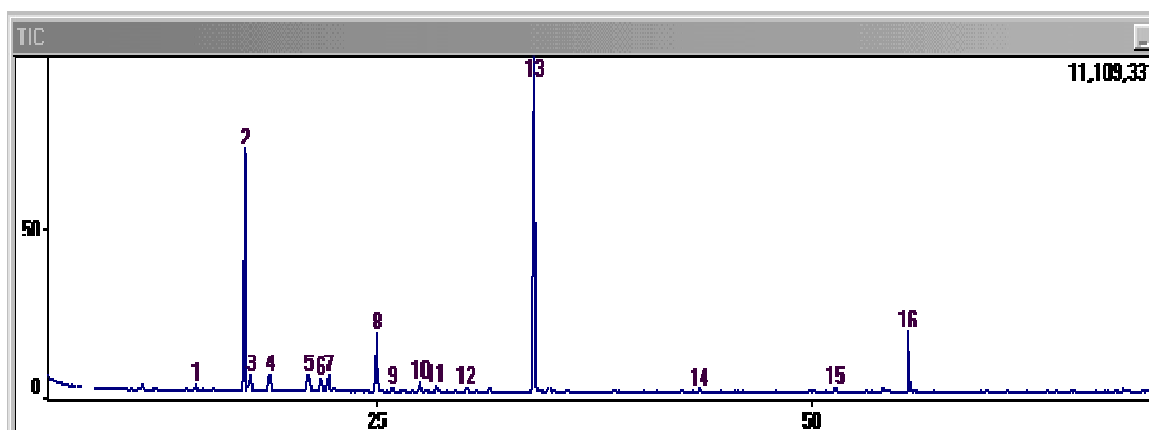
เมื่อพิจารณาเฉพาะปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ พบว่าวิธีสกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยพบว่าน้ำมันไพลที่ได้จากวิธีสกัดโดยการกลั่นด้วยน้ำมีองค์ประกอบทางเคมีอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ สมอ. และ วว. นอกจากนี้ยังมีค่าคุณภาพทางฟิสิกส์ใกล้เคียงกับมาตรฐาน ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันในตัวอย่างไพลต่อไป



รูปที่ 1-5 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของสารที่พบในน้ำมันที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS1 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ตัวเลขที่กำกับในแต่ละพีค (peak) คือชนิดของสารที่ปรากฏในตารางที่ 1-7

ตารางที่ 1-7 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันไพลที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS1 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

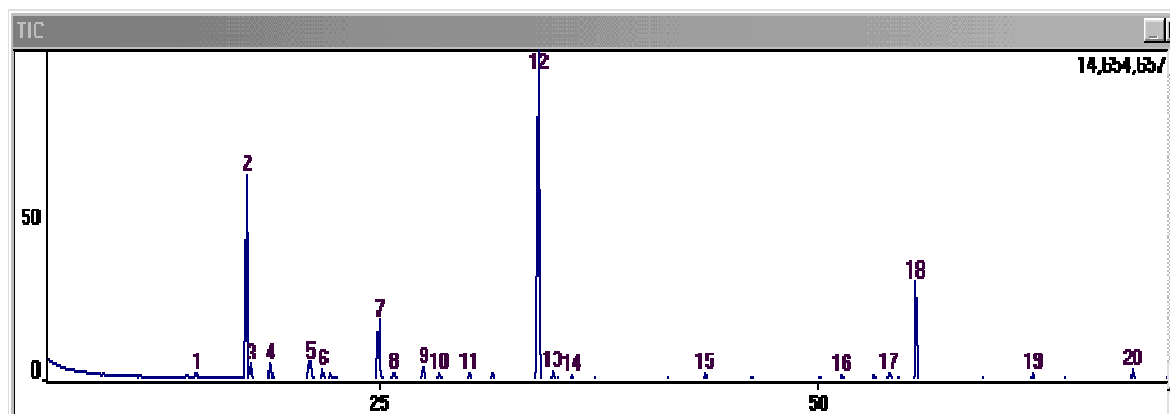
Peak number	% Total	Possible Compound
1	0.70	α -Thujene
2	0.58	α -Pinene
3	39.11	Sabinene
4	2.43	β -Pinene
5	2.13	β -Myrcene
6	3.18	α -Terpinene
7	0.87	p-cymene
8	0.84	β -phellandrene
9	7.54	γ -Terpinene
10	1.25	β -trans-ocimene
11	1.11	Terpinolene
12	1.07	(Z)-Sabinene hydrate
13	33.11	Terpinen-4-ol
14	0.21	β -Terpinyl acetate
15	5.52	DMPBD
16	0.34	4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene



รูปที่ 1-6 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของสารที่พบในน้ำมันที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS2 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ตัวเลขที่กำกับในแต่ละพีก (peak) คือชนิดของสารที่ปรากฏในตารางที่ 1-8

ตารางที่ 1-8 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันไพลที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS2 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

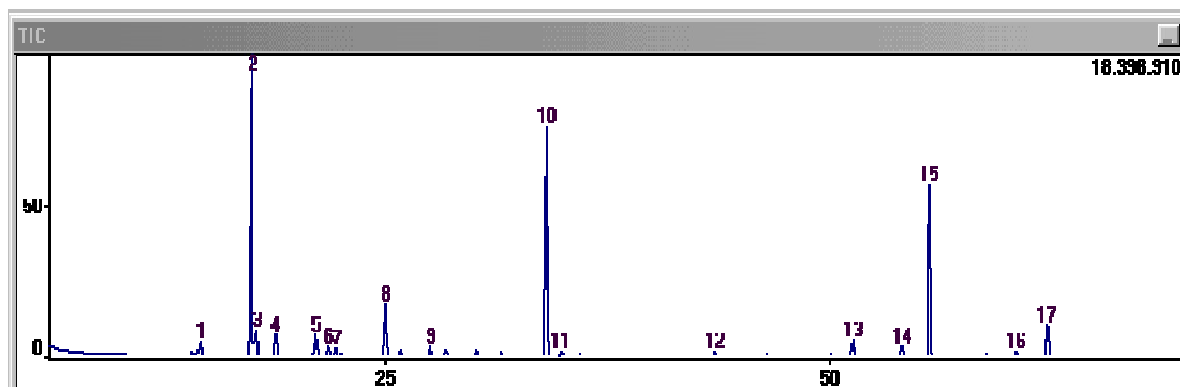
Peak number	% Total	Possible Compound
1	0.69	α -Pinene
2	30.39	Sabinene
3	1.96	β -Pinene
4	2.03	β -Myrcene
5	2.16	α -Terpinene
6	1.66	p-cymene
7	2.34	β -phellandrene
8	7.74	γ -Terpinene
9	0.67	β -trans-ocimene
10	0.87	Terpinolene
11	0.56	(Z)-Sabinene hydrate
12	0.54	(E)-Sabinene hydrate
13	42.23	Terpinen-4-ol
14	0.31	β -Terpinyl acetate
15	0.53	α -Zingiberene
16	5.31	DMPBD



รูปที่ 1-7 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของสารที่พบในน้ำมันที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS3 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ตัวเลขที่กำกับในแต่ละพีค (peak) คือชนิดของสารที่ปรากฏในตารางที่ 1-9

ตารางที่ 1-9 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันไพลที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS3 ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

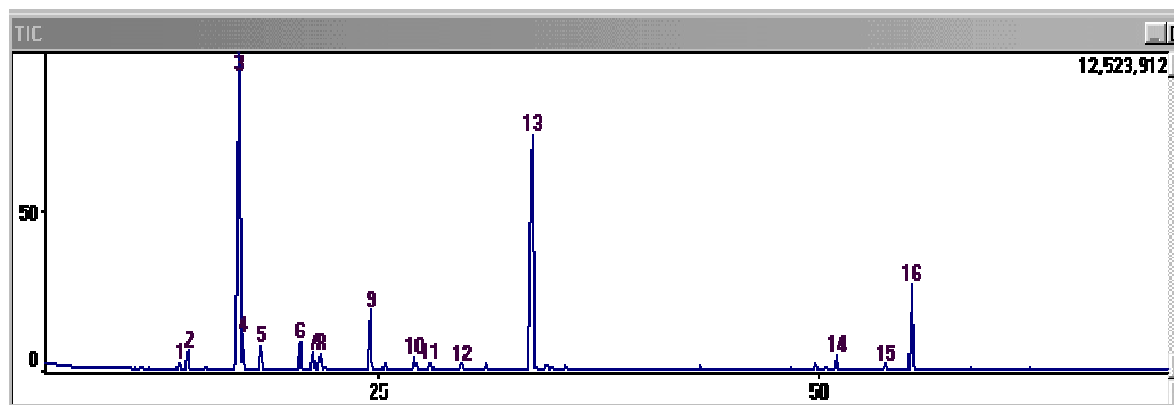
Peak number	% Total	Possible Compound
1	0.34	α -Pinene
2	24.05	Sabinene
3	1.36	β -Pinene
4	1.63	β -Myrcene
5	1.83	α -Terpinene
6	0.77	p-cymene
7	6.68	γ -Terpinene
8	0.61	β -trans-ocimene
9	1.00	Terpinolene
10	0.54	(Z)-Sabinene hydrate
11	0.62	(E)-Sabinene hydrate
12	49.36	Terpinen-4-ol
13	0.76	α -Terpineol
14	0.27	(E)-Geraniol
15	0.46	β -Terpinyl acetate
16	0.27	α -Zingiberene
17	0.26	Unknown ¹
18	8.28	DMPBD
19	0.28	4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene
20	0.64	Unknown ²



รูปที่ 1-8 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของสารที่พบในน้ำมันที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS1 ด้วยการกลั่นด้วยน้ำ ตัวเลขที่กำกับในแต่ละพีก (peak) คือชนิดของสารที่ปรากฏในตารางที่ 1-10

ตารางที่ 1-10 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันไพลที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS1 ด้วยการกลั่นด้วยน้ำ

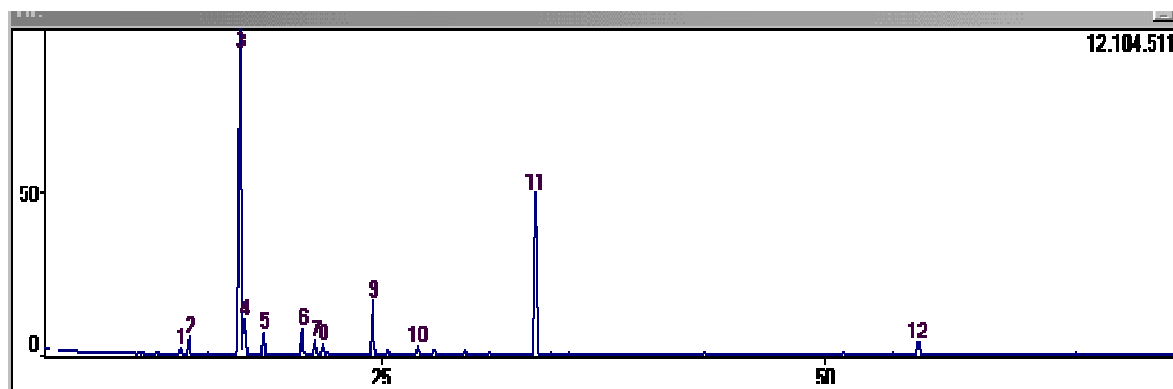
Peak number	% Total	Possible Compound
1	1.15	α -Pinene
2	36.71	Sabinene
3	2.25	β -Pinene
4	1.83	β -Myrcene
5	2.04	α -Terpinene
6	0.74	p-Cymene
7	0.74	β -phellandrene
8	5.27	γ -Terpinene
9	0.84	Terpinolene
10	27.00	Terpinen-4-ol
11	0.29	α -Terpineol
12	0.29	β -Terpinyl acetate
13	1.03	α -Zingiberene
14	0.54	Unknown ¹
15	16.16	DMPBD
16	0.21	Unknown ²
17	1.91	4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene



รูปที่ 1-9 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของสารที่พบในน้ำมันที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS2 ด้วยการกลั่นด้วยน้ำ ตัวเลขที่กำกับในแต่ละพีค (peak) คือชนิดของสารที่ปรากฏในตารางที่ 1-11

ตารางที่ 1-11 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันไพลที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS2 ด้วยการกลั่นด้วยน้ำ

Peak number	% Total	Possible Compound
1	0.44	α -Thujene
2	1.53	α -Pinene
3	41.39	Sabinene
4	2.77	β -Pinene
5	2.15	β -Myrcene
6	2.60	α -Terpinene
7	1.63	p-Cymene
8	1.69	β -phellandrene
9	6.31	γ -Terpinene
10	0.94	Terpinolene
11	0.49	(Z)- Sabinene hydrate
12	0.41	(E)- Sabinene hydrate
13	29.96	Terpinen-4-ol
14	0.83	α -Zingiberene
15	0.32	Unknown ¹
16	6.54	DMPBD



รูปที่ 1-10 โครมาโตแกรมแสดงองค์ประกอบของสารที่พบในน้ำมันที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS3 ด้วยการกลั่นด้วยน้ำ ตัวเลขที่กำกับในแต่ละพีค (peak) คือชนิดของสารที่ปรากฏในตารางที่ 1-12

ตารางที่ 1-12 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันไพลที่สกัดจากไพลสดตัวอย่าง PS3 ด้วยการกลั่นด้วยน้ำ

Peak number	% Total	Possible Compound
1	0.60	α -Thujene
2	2.00	α -Pinene
3	53.50	Sabinene
4	3.78	β -Pinene
5	2.65	β -Myrcene
6	3.39	α -Terpinene
7	1.71	p-Cymene
8	1.24	β -phellandrene
9	7.25	γ -Terpinene
10	1.09	Terpinolene
11	21.85	Terpinen-4-ol
12	0.95	DMPBD

ตารางที่ 1-13 มาตรฐานน้ำมันไพล

สารสำคัญ	มาตรฐาน วว.*	มาตรฐาน สมอ.*
α -Pinene	0.90-4.16	1.00-3.00
Sabinene	25.70-40.31	31.00-48.00
α -Terpinene	6.26-16.50	3.00-8.00
γ -Terpinene	2.00-12.66	8.00-10.00
Terpinen-4-ol	25.40-41.50	19.00-36.00
DMPBD	0.50-5.88	-

*หมายเหตุ วว. คือ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ สมอ. คือ สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ตารางที่ 1-14 องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างไพลที่สกัดโดยใช้วิธีสกัดต่างกัน

Possible Compound	% peak area					
	สกัดด้วยเฮกเซน			กลั่นด้วยน้ำ		
	PS1	PS2	PS3	PS1	PS2	PS3
α -Thujene	0.70	-	-	-	0.44	0.60
α -Pinene	0.58	0.69	0.34	1.15	1.53	2.00
Sabinene	39.11	30.39	24.05	36.71	41.39	53.50
β -Pinene	2.43	1.96	1.36	2.25	2.77	3.78
β -Myrcene	2.13	2.03	1.63	1.83	2.15	2.65
α -Terpinene	3.18	2.16	1.83	2.04	2.60	3.39
p-cymene	0.87	1.66	0.77	0.74	1.63	1.71
β -phellandrene	0.84	2.34	-	0.74	1.69	1.24
γ -Terpinene	7.54	7.74	6.68	5.27	6.31	7.25
β -trans-ocimene	1.25	0.67	0.61	-	-	-
Terpinolene	1.11	0.87	1.00	0.84	0.94	1.09
(Z)-Sabinene hydrate	1.07	0.56	0.54	-	0.49	-
(E)-Sabinene hydrate	-	0.54	0.62	-	0.41	-
Terpinen-4-ol	33.11	42.23	49.36	27.00	29.96	21.85
α -Terpineol	-	-	0.76	0.29	-	-
(E)-Geraniol	-	-	0.27	-	-	-

ตารางที่ 1-14 (ต่อ)

Possible Compound	% peak area					
	สกัดด้วยเฮกเซน			กลั่นด้วยน้ำ		
	PS1	PS2	PS3	PS1	PS2	PS3
β -Terpinyl acetate	0.21	0.31	0.46	0.29	-	-
α -Zingiberene	-	0.53	0.27	1.03	0.83	-
Unknown ¹	-		0.26	0.54	0.32	-
DMPBD	5.52	5.31	8.28	16.16	6.54	0.95
4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene	0.34	-	0.28	0.21	-	-
Unknown ²	-		0.64	1.91	-	-

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1. ไพลกลุ่มที่ 1

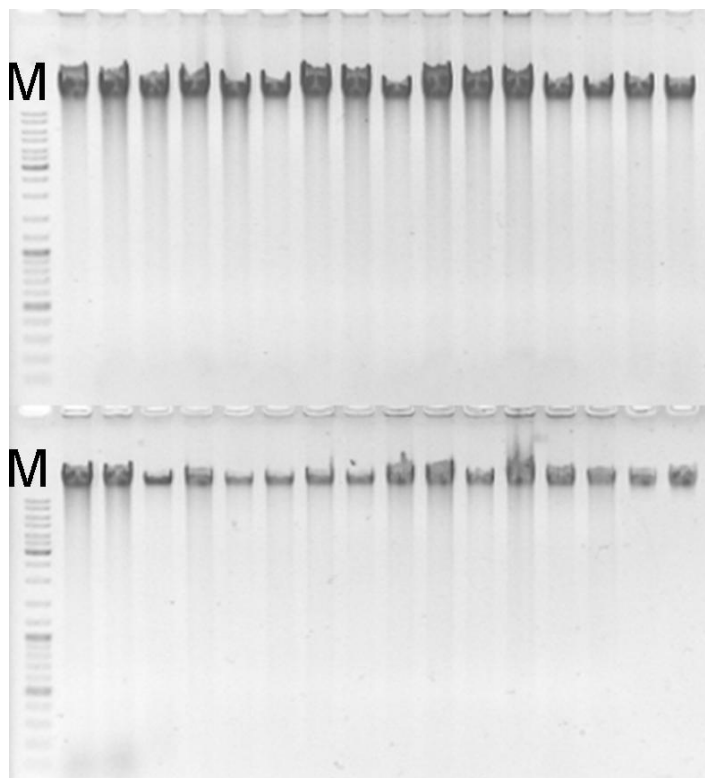
ไพลกลุ่มนี้เป็นกลุ่มสายพันธุ์ที่มีอายุปลูก 32 เดือน (2 ปี 8 เดือน) จำนวน 21 ตัวอย่าง (S1-S21) ซึ่งพิจารณาจากลักษณะภายนอกที่พบว่ามีความแตกต่างกันเช่น สีของช่อดอก รูปร่างช่อดอก รูปร่างทรงต้น และสีของแผ่นใบ (รูปที่ 1-11) นำตัวอย่างดังกล่าวไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตามขั้นตอนและวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว

1.1 การสกัดแยกดีเอ็นเอ

เมื่อนำใบอ่อนของไพลทั้ง 21 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเออย่างคร่าว ๆ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล และย้อมเจดด้วย Ethidium bromide พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี (รูปที่ 1-12) เมื่อวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (OD260) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm (OD260/OD280) พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีสัดส่วน OD260/OD280 ประมาณ 1.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ เจือจางให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 50 ng/ μ l เพื่อใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีต่อไป



รูปที่ 1-11 ลักษณะต้นและดอกของไพล 21 ตัวอย่างจากกลุ่มที่ 1



รูปที่ 1-12 ตัวอย่างดีเอ็นเอของไพล จากการทำอิเล็กโทรโฟริซิสในอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ และย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Standard 100 bp DNA marker)

1.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ เพื่อให้เกิดการคัดเลือกทั้งหมด 64 คู่ คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจนจำนวน 12 คู่ (ตารางที่ 1-15) มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลและพืชที่อยู่ในสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันรวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง

จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนและเข้มปานกลางที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีอยู่ในช่วง 17-31 แถบหรือ markers ต่อคู่ไพรเมอร์ (รูปที่ 1-13 และ 1-14) รวมแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจำนวน 307 แถบ เฉลี่ย 25.58 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด ได้แก่ E-ACC/M-CAC และคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด ได้แก่ E-AGG/M-CAC จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (polymorphic bands) มีจำนวนทั้งสิ้น 189 แถบ คิดเป็น 61.56 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด โดยไพรเมอร์ที่ให้เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands มากที่สุด ได้แก่ไพรเมอร์ E-AGC/M-CTG (ตารางที่ 1-16)

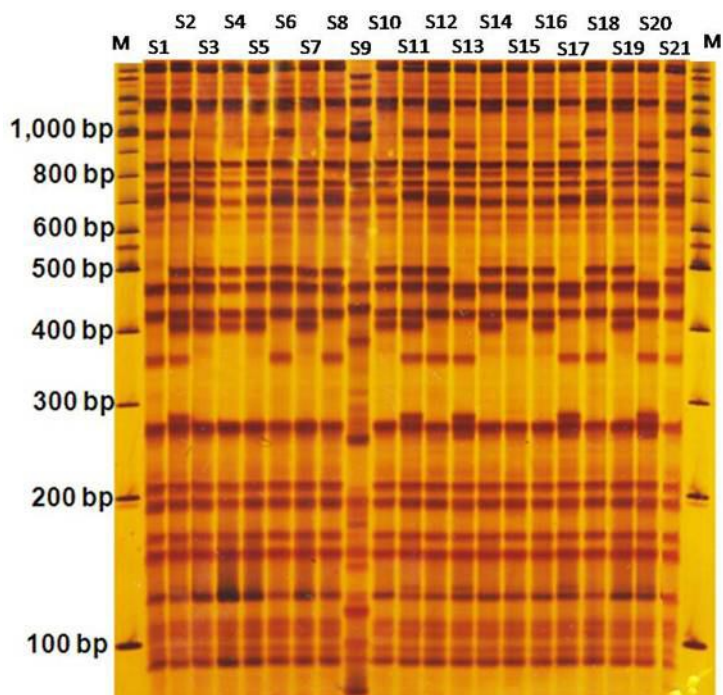
ตารางที่ 1-15 คู่มือไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไฟลด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

คู่มือไพรเมอร์	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC							x	
E-AAG								
E-ACA								
E-ACC		x			x	x		x
E-ACG		x		x		x		
E-ACT								
E-AGC							x	x
E-AGG		x					x	

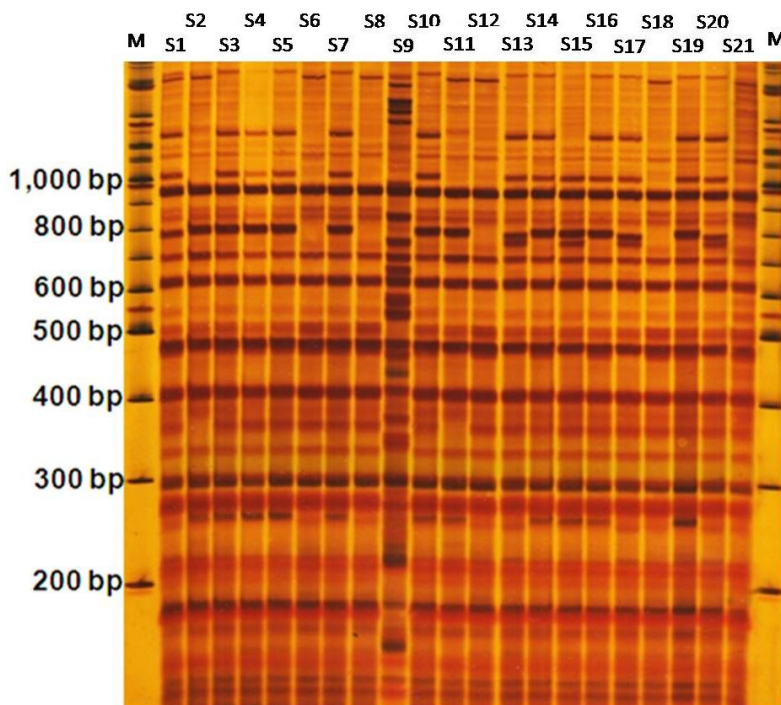
x = ไพรเมอร์ที่เลือกมาใช้ในการทดลองเนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน

ตารางที่ 1-16 คู่มือไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคเอเอฟแอลพี จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไฟลกลุ่มที่ 1

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	จำนวน polymorphic band	% polymorphic band
E-AAC/M-CTG	27	15	55.56
E-ACC/M-CAC	31	22	70.97
E-ACC/M-CTA	26	13	50.00
E-ACC/M-CTC	22	10	45.45
E-ACC/M-CTT	28	14	50.00
E-ACG/M-CAC	29	17	58.62
E-ACG/M-CAT	26	17	65.38
E-ACG/M-CTC	24	18	75.00
E-AGC/M-CTG	25	20	80.00
E-AGC/M-CTT	26	15	57.69
E-AGG/M-CAC	17	11	64.71
E-AGG/M-CTG	26	17	65.38
เฉลี่ย	25.58	15.75	61.56



รูปที่ 1-13 รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอตัวอย่างไพลกลุ่มที่ 1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้คู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CAC (ตัวเลขที่กำกับแสดงหมายเลขตัวอย่าง และ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)



รูปที่ 1-14 รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอตัวอย่างไพลกลุ่มที่ 1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้คู่ไพรเมอร์ E-ACG/M-CAT (ตัวเลขที่กำกับแสดงหมายเลขตัวอย่าง และ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

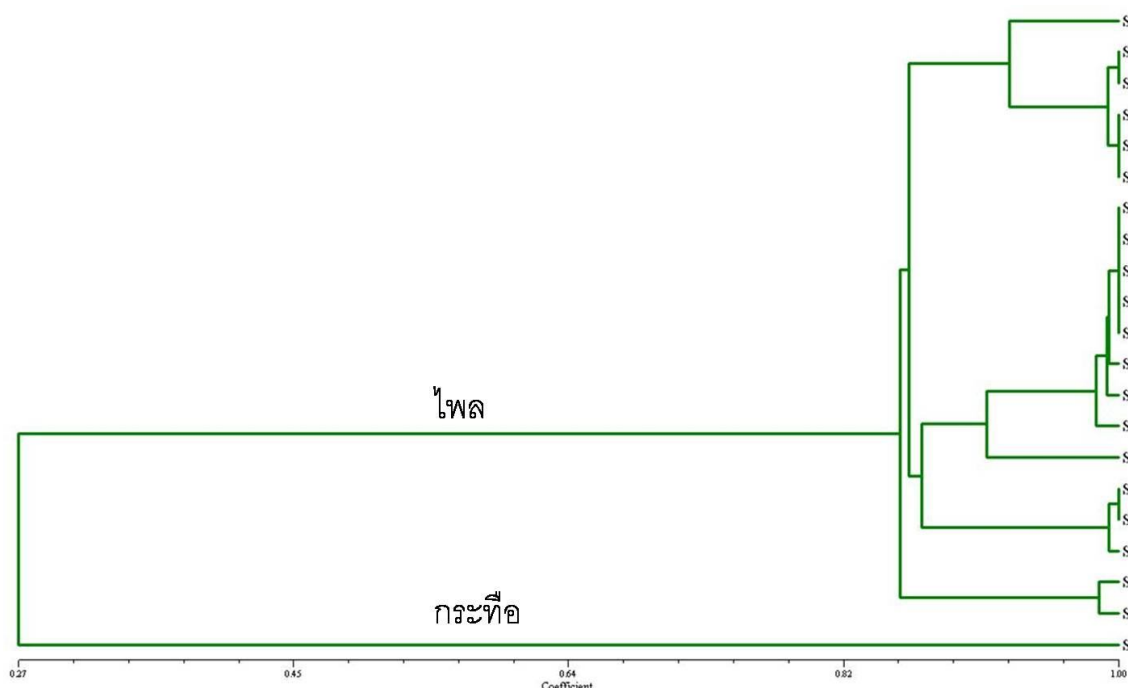
จากผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอฟแอลพี สามารถนำมาวิเคราะห์ค่า polymorphic information contents (PICs) ซึ่งเป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสองตัวอย่างเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่งนั้น ๆ จากการทดลองครั้งนี้พบว่าค่า PIC ของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบมีค่าอยู่ในช่วง 0.0000-0.5000 ค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.0979 ซึ่งค่าที่ได้ค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่าไพลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่มากนัก และเมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard (1908) พบว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้อยู่ในช่วง 0.0562-1.00 จากนั้นนำค่าความเหมือนทางพันธุกรรมมาวิเคราะห์การจัดกลุ่มและสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc-2.20k พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ ที่ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.27 (รูปที่ 1-15) กลุ่มที่ 1 คือตัวอย่างไพล กลุ่มที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างที่เป็นกระทือ (ตัวอย่างหมายเลข S9) เฉพาะตัวอย่างไพลพบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมสูงคือมีค่าอยู่ในช่วง 0.7479-1.00 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.8478 จากผลการทดลองสามารถแบ่งไพลเป็นกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่มที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.86 (รูปที่ 1-14)

ไพลกลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข S1, S6, S8, S21 และ S18

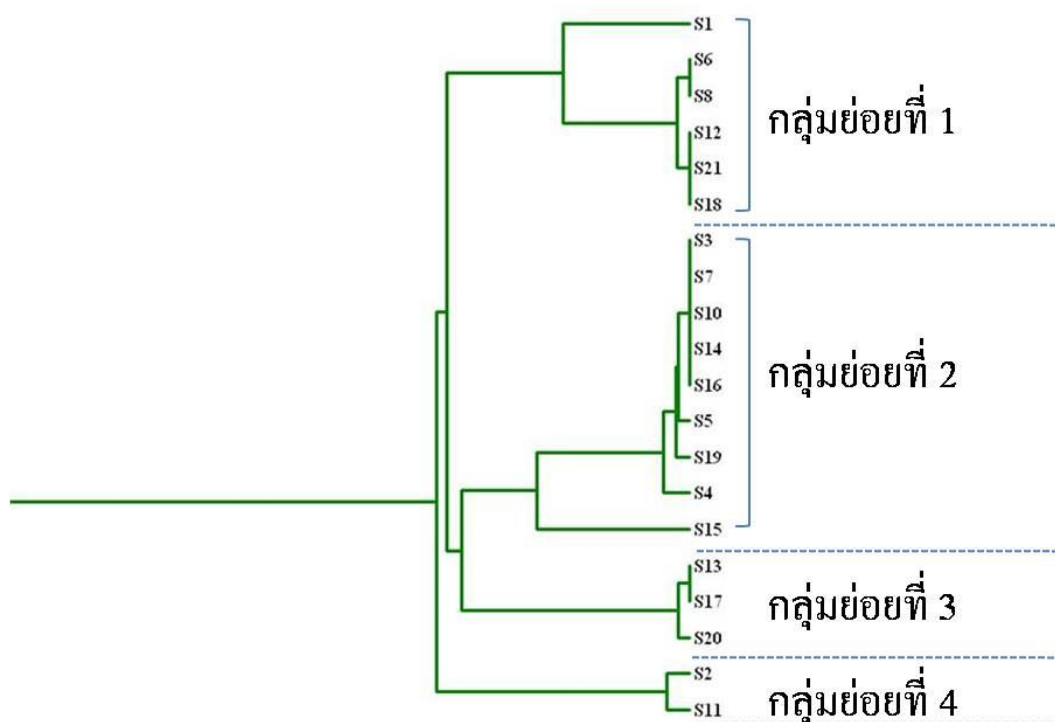
ไพลกลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข S3, S7, S10, S14, S16, S5, S19, S4 และ S15

ไพลกลุ่มย่อยที่ 3 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข S13, S17 และ S20

ไพลกลุ่มย่อยที่ 4 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข S2 และ S11



รูปที่ 1-15 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไพลทั้งหมด 21 ตัวอย่าง สร้างโดยอาศัยข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิคเอฟแอลพี



รูปที่ 1-16 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงการจัดแบ่งเป็นกลุ่มย่อยของตัวอย่างไพลกลุ่มที่ 1

เมื่อพิจารณาจากค่าความเหมือนทางพันธุกรรม ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มย่อยที่มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมมากกว่า 95 % ถือว่ามีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากจนสามารถจัดให้เป็นสายพันธุ์เดียวกันได้ จากผลการทดลองจึงสามารถจำแนกสายพันธุ์ไพลในกลุ่มที่ 1 จำนวน 21 ตัวอย่าง ได้เป็น 6 กลุ่มสายพันธุ์คือ

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 ได้แก่ตัวอย่าง S1

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 2 ได้แก่ตัวอย่าง S6, S8, S12, S21 และ S18

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 ได้แก่ตัวอย่าง S3, S7, S10, S14, S16, S5, S19 และ S4

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 4 ได้แก่ตัวอย่าง S15

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 5 ได้แก่ตัวอย่าง S13, S17 และ S20

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 6 ได้แก่ตัวอย่าง S2 และ S11

1.3 ปริมาณผลผลิตโรโซมและน้ำมันหอมระเหย

เมื่อพิจารณาปริมาณผลผลิตโรโซม 5 อันดับแรกที่ทำให้ผลผลิตสูงจากไพลจำนวน 21 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างไพล S13, S19, S9, S20 และ S7 ให้ผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 6,227.7, 5,651.7, 3,094.8, 3,690.3 และ 3,548.8 กรัมต่อต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 1-17)

ตารางที่ 1-17 ปริมาณผลผลิตโรโซม และปริมาณน้ำมันไพลที่สกัดได้ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำของตัวอย่างไพลในกลุ่มที่ 1

หมายเลขตัวอย่าง	ผลผลิตโรโซม (กรัม/กอ)	volatile oil (% v/w)
S1	2,952.6	2.143 b
S2	3,416.6	1.636 defg
S3	2,195.2	1.771 cde
S4	1,443.7	1.643 defg
S5	3,367.3	1.907 bcd
S6	3,776.5	1.250 h
S7	3,548.8	2.883 a
S8	2,154.3	1.619 defg
S9	3,094.8	0.229 l
S10	1,341.1	1.361 gh
S11	1,585.3	1.433 fgh
S12	2,595.7	1.813 cde
S13	6,227.7	1.766 cde
S14	930.9	1.528 efg
S15	2,200.4	1.967 bc
S16	3,434.2	1.800 cde
S17	3,485.4	2.000 bc
S18	3,461.4	2.133 b
S19	5,651.7	1.824 cde
S20	3,690.3	2.152 b
S21	3,305.9	1.748 cde

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย \pm SD ที่ตามด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพลทั้ง 21 ตัวอย่างโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ พบว่าตัวอย่างไพลที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าหรือเท่ากับ 2 % ตามที่สถาบันการแพทย์แผนไทยรายงานว่าเป็นปริมาณน้ำมันที่ได้มาตรฐาน คือสายพันธุ์ S7, S20, S1, S18 และ S17 โดยมีปริมาณน้ำมันหอมระเหย 2.883, 2.152, 2.143, 2.133 และ 2.000 %v/w ตามลำดับ และจากการประเมินผลผลิตน้ำมันหอมระเหยต่อกอ พบว่าตัวอย่าง S13, S19, S7, S20 และ S18 เป็น 5 อันดับแรกที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยต่อกอมากที่สุด ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ที่ 5, 3, 3, 5 และ 2 ตามลำดับ (ตารางที่ 1-17)

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยเป็นระดับกลุ่มสายพันธุ์พบว่า กลุ่มสายพันธุ์ที่ 5 มีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันหอมระเหยต่อดันมากที่สุด รองลงมาได้แก่กลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 กลุ่มสายพันธุ์ที่ 2 กลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 กลุ่มสายพันธุ์ที่ 4 และ กลุ่มสายพันธุ์ที่ 6 ตามลำดับ (ตารางที่ 1-18)

เมื่อเปรียบเทียบค่าคุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำมันหอมระเหยไพลทั้ง 21 ตัวอย่างกับค่ามาตรฐานของน้ำมันไพลของ สมอ. ได้แก่ค่า Specific gravity ค่า Refractive index และค่า Optical rotation จากการเปรียบเทียบพบว่ามีเพียง S16 สายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่มีค่าคุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำมันหอมระเหยเป็นไปตามมาตรฐาน จากการพิจารณาค่า Specific gravity พบเพียงสายพันธุ์ S16 ที่มีค่าคุณภาพทางฟิสิกส์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ส่วนสายพันธุ์อื่น ๆ มีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐาน จากการตรวจวัดค่า Refractive index ของน้ำมันหอมระเหยพบว่า มีตัวอย่าง S3, S5, S9, S16 และ S19 ที่มีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ ในขณะที่ค่า Optical rotation นั้นพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ในการทดลองมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ยกเว้น S2, S8, S9, S10, S11, S12 และ S17 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐาน (ตารางที่ 1-19)

ตารางที่ 1-18 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโร โชม เปรอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำมันหอมระเหย และปริมาณน้ำมันหอมระเหยต่อกอของแต่ละกลุ่มสายพันธุ์

กลุ่มสายพันธุ์	ผลผลิต โร โชม (กรัม/ ตัน)	ปริมาณน้ำมัน (%v/w)	ปริมาณน้ำมันหอม ระเหยต่อกอ (มิลลิลิตร)
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 1	2,952.6	2.143	63.3
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 2	3,058.8	1.713	52.4
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 3	2,739.1	1.840	50.4
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 4	2,200.4	1.967	43.3
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 5	4,467.8	1.973	88.1
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 6	2,501.0	1.535	38.4

ตารางที่ 1-19 ค่าคุณภาพทางฟิสิกส์ของน้ำมันหอมระเหยจากไพล 21 ตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ

สายพันธุ์	Specific gravity	Refractive index	Optical rotation
มาตรฐาน สมอ.	0.880-0.925	1.477-1.509	(-34.5)-(-25.5)
S1	0.942±0.000 ⁱ	1.5192±0.000 ^k	-27.87±0.03 ^h
S2	0.960±0.001 ^b	1.5315±0.000 ^b	-22.72± 0.03 ^b
S3	0.932±0.001 ⁿ	1.5093±0.000 ^o	-28.33±0.08 ⁱ
S4	0.950±0.000 ^d	1.5236±0.000 ^c	-29.10±0.09 ^j
S5	0.931±0.000 ^o	1.5094±0.000 ^o	-28.33±0.03 ⁱ
S6	0.949±0.000 ^e	1.5237±0.003 ^f	-24.40±0.00 ^c
S7	0.928±0.000 ^p	1.5140±0.001 ⁿ	-34.23±0.03 ^p
S8	0.946±0.000 ^{lh}	1.5205±0.000 ⁱ	-24.77±0.03 ^d
S9	-	1.5081±0.000 ^q	-
S10	0.952±0.000 ^c	1.5276±0.003 ^c	-24.98±0.03 ^{de}
S11	0.985±0.000 ^a	1.5421±0.002 ^a	-17.37±0.08 ^a
S12	0.947±0.000 ^g	1.5213±0.000 ^h	-24.30±0.05 ^c
S13	0.933±0.006 ^m	1.5150±0.000 ^m	-30.73±0.03 ^l
S14	0.944±0.006 ^j	1.51676±0.000 ^l	-25.60±0.00 ^f
S15	0.945±0.000 ⁱ	1.5225±0.000 ^{7g}	-31.10±0.05 ^m
S16	0.925±0.000 ^q	1.5089±0.000 ^p	-32.23±0.03 ^o
S17	0.947±0.000 ^g	1.5202±0.000 ^{lj}	-25.07±0.13 ^c
S18	0.945±0.000 ⁱ	1.5227±0.000 ^g	-27.43±0.16 ^g
S19	0.928±0.000 ^p	1.5087±0.000 ^p	-31.43±0.10 ⁿ
S20	0.948±0.000 ^f	1.5250±0.000 ^d	-30.38±0.03 ^k
S21	0.943±0.000 ^k	1.5205±0.000 ^{3ij}	-27.77±0.03 ^h

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD ที่ตามด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

- คือ ไม่สามารถวัดค่าได้เนื่องจากปริมาณน้ำมันมีน้อยเกินไป

จากการพิจารณาการจัดกลุ่มสายพันธุ์โดยใช้แผนภูมิทางพันธุกรรมของไหล พบว่าสามารถแยกตัวอย่างไหลได้เป็น 6 กลุ่มสายพันธุ์ จึงคัดเลือกตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไหล โดยเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มสายพันธุ์นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เครื่อง GC ตัวอย่างที่ถูกเลือกเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มสายพันธุ์มีดังนี้

- S1 เป็นตัวแทนกลุ่มสายพันธุ์ที่ 1
- S2 เป็นตัวแทนกลุ่มสายพันธุ์ที่ 2
- S4 เป็นตัวแทนกลุ่มสายพันธุ์ที่ 3
- S4 เป็นตัวแทนกลุ่มสายพันธุ์ที่ 4
- S4 เป็นตัวแทนกลุ่มสายพันธุ์ที่ 5
- S4 เป็นตัวแทนกลุ่มสายพันธุ์ที่ 6
- S19 เป็นตัวแทนของสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง (5,651.70 กรัมต่อต้น) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ที่ 3

จากตารางที่ 1-20 แสดงผลการเปรียบเทียบขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไหลจำนวน 7 ตัวอย่างดังกล่าวโดยใช้เครื่อง GC ซึ่งทำให้ทราบปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีได้อย่างแม่นยำ ซึ่งจากการวิเคราะห์พบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไหลจำนวน 15 ชนิดคือ α -Pinene, Sabinene, β -Myrcene, α -Terpinene, m-Cymene, γ -Terpinene, (Z)-Sabinene hydrate, Terpinolene, (E)-Sabinene hydrate, Terpinen-1-ol, Terpinen-4-ol, Terpinyl acetate, β -Sesquiphellandrene, DMPBD และ 4-(2',4',5'-Trimethoxyphenyl)but-1,3-diene โดยน้ำมันไหลทั้ง 7 ตัวอย่างที่ทำกรวิเคราะห์มีองค์ประกอบของ Sabinene สูงที่สุด (27.14-41.93 %) รองลงมาได้แก่สาร (E)-1-(3-4-dimethoxyphenyl)butadiene (DMPBD) (29.57-15.63 %) และสาร terpinen-4-ol 1 (6.09-24.47 %) ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ รุ่งฤดี (2550) และ Bua-in and Paisooksantivatana (2009) ซึ่งพบว่าสารสำคัญที่พบในน้ำมันไหลที่ได้จากการกลั่นด้วยไมโครเวฟ คือสาร Sabinene, Terpinen-4-ol และ DMPBD

จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไหลทั้ง 7 ตัวอย่าง กับมาตรฐานน้ำมันไหลของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่าตัวอย่างน้ำมันไหลมีองค์ประกอบตรงตามมาตรฐาน แต่ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดยังไม่ตรงตามมาตรฐาน จากผลการวิเคราะห์พบว่าน้ำมันทุกตัวอย่างมีปริมาณ α -Pinene, Sabinene และ γ -Terpinene ตรงตามเกณฑ์มาตรฐาน แต่มี α -Terpinene และ Terpinen-4-ol ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ส่วนปริมาณ DMPBD พบว่ามีสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ 1-20 ปริมาณสารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในไพล 7 สายพันธุ์จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

RT ²	องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ ¹								มาตรฐาน ว.	มาตรฐาน สมอ.
		S1	S2	S4	S12	S13	S15	S19			
6.62	α -Pinene	1.28	1.07	0.93	1.58	1.41	1.01	1.16	0.90-4.16	1.00-3.00	
9.17	Sabinene	34.50	27.14	37.66	28.91	38.50	41.93	39.25	25.70-40.31	31.00-48.00	
10.35	β -Myrcene	1.31	1.10	1.30	1.29	1.37	1.33	1.44	-	-	
11.86	α -Terpinene	1.64	1.45	1.34	1.62	1.71	1.28	1.35	6.26-16.50	3.00-8.00	
12.39	m-Cymene	1.45	1.76	1.24	2.43	1.51	1.10	2.67	-	-	
14.52	γ -Terpinene	4.07	3.48	3.25	3.84	3.77	2.92	3.36	2.00-12.66	8.00-10.00	
14.89	(Z)-Sabinene hydrate	0.70	0.66	0.74	0.48	0.76	0.65	0.59	-	-	
15.96	Terpinolene	0.75	0.66	0.61	0.73	0.71	0.55	0.67	-	-	
16.48	(E)-Sabinene hydrate	0.76	0.70	0.80	0.54	0.82	0.65	0.65	-	-	
18.51	Terpinen-1-ol	0.34	0.35	0.34	0.44	0.37	0.25	0.44	-	-	
20.40	Terpinen-4-ol	22.59	20.83	19.22	24.47	20.31	16.09	24.16	25.40-41.50	19.00-36.00	
26.50	Terpinyl acetate	0.32	0.28	0.35	0.29	0.32	0.28	0.38	-	-	
31.97	β -Sesquiphellandrene	1.06	1.82	0.80	1.55	1.18	1.02	0.93	-	-	
35.56	DMPBD ³	23.30	29.57	23.09	23.21	20.62	22.08	15.63	0.50-5.88	-	
40.18	4-(2',4',5'-Trimethoxy phenyl)but-1,3-diene	1.48	1.25	3.65	0.99	2.25	4.22	2.25	-	-	

¹ หมายถึง ร้อยละขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันไพล

² หมายถึง Retention time

³ หมายถึง (E)-1-(3-4-dimethoxyphenyl) butadiene

ว. หมายถึง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

สมอ. หมายถึง สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) พบว่า น้ำมันไพลทั้ง 7 สายพันธุ์มีสารองค์ประกอบ α -Pinene อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน โดยส่วนใหญ่มีปริมาณสาร Sabinene และสาร Terpinen-4-ol อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน สมอ. ยกเว้นน้ำมันไพลจากตัวอย่าง S2 และ S12 มีปริมาณสาร Sabinene ต่ำกว่ามาตรฐาน ส่วนน้ำมันไพลจากตัวอย่าง S15 มีปริมาณสาร Terpinen-4-ol ต่ำกว่ามาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสาร α -Terpinene และ γ -Terpinene ในน้ำมันทั้ง 7 ชนิดต่ำกว่ามาตรฐานกำหนดของ สมอ.

ตารางที่ 1-21 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันจากโพลทั้ง 21 ตัวอย่างที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

Compound	% peak area																			
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21
α -Thujene	0.72	0.82	0.85	0.59	0.70	0.66	0.51	0.79	0.27	0.46	0.53	0.85	0.41	0.44	0.60	0.69	0.79	0.70	0.53	0.59
α -Pinene	1.76	2.24	1.76	1.57	1.62	2.00	1.63	2.17	1.42	1.56	1.68	1.76	1.35	1.52	1.56	1.35	2.17	1.57	1.63	1.77
Camphene	-	-	-	-	-	-	-	0.41	-	-	-	-	-	-	-	-	0.41	-	-	-
Sabinene	55.43	48.26	49.49	58.95	47.46	50.18	63.87	49.20	67.42	32.22	39.10	49.49	30.99	35.39	41.10	31.69	49.12	42.50	47.99	40.15
β -Pinene	3.57	3.48	3.45	3.38	3.50	3.54	3.49	3.60	3.38	2.75	2.88	3.45	2.60	3.68	2.91	2.60	3.59	2.98	2.92	2.78
β -Myrcene	2.47	2.39	2.51	2.42	2.26	2.53	2.34	2.57	2.49	1.81	2.07	2.51	2.02	2.24	2.29	1.90	2.56	2.19	2.28	2.22
α -Terpinene	3.17	3.00	3.21	2.51	3.45	3.14	2.41	3.37	1.83	2.77	2.68	3.21	2.91	2.21	2.75	2.99	3.51	2.56	2.19	2.34
m-cymene	1.27	1.92	1.99	1.00	1.92	1.81	0.68	1.91	-	1.89	2.04	1.99	1.27	0.68	1.07	1.64	-	1.62	1.01	1.50
p-cymene	-	-	-	-	-	-	-	-	0.58	-	-	-	-	-	-	-	1.91	-	-	-
Limonene	0.95	-	0.85	0.84	0.96	-	0.77	-	0.86	-	-	0.85	0.75	0.79	0.80	-	-	0.70	0.78	-
β -Phellandrene	-	3.03	-	-	-	2.70	-	1.76	-	2.45	2.23	-	-	-	-	-	1.76	-	-	2.28
1,8-Cineole	-	0.14	0.21	0.23	0.27	-	0.29	-	0.21	-	-	0.21	-	-	-	-	0.15	-	0.28	-
γ -Terpinene	6.64	6.69	7.12	5.63	7.44	7.13	4.80	6.81	4.47	6.52	6.09	7.12	6.56	4.65	6.01	6.17	6.80	5.44	4.34	5.30
(Z)-Sabinene hydrate	0.66	0.75	0.56	0.72	0.50	0.61	0.70	0.42	0.66	0.38	0.46	0.56	0.37	0.70	0.70	0.59	0.42	0.57	0.81	0.68
Terpinolene	1.07	1.08	1.18	0.85	1.08	1.11	0.76	1.05	0.73	0.93	0.87	1.18	1.06	0.77	1.02	1.04	1.05	0.86	0.73	0.86
(E)-Sabinene hydrate	0.60	0.68	0.52	0.68	0.46	0.57	0.62	0.45	0.55	0.38	0.47	0.52	0.38	0.71	0.64	0.62	0.45	0.52	0.79	0.67
(Z)-p-menth-2-en-1-ol	0.36	0.38	0.44	0.32	0.43	0.31	0.29	0.35	-	0.41	0.39	0.44	0.52	0.36	0.51	0.55	0.35	0.47	0.36	0.46
Terpinen-1-ol	0.21	0.28	0.27	0.17	0.31	-	-	0.22	-	0.28	0.30	0.27	0.30	-	0.37	0.36	0.22	0.34	-	0.30
Terpinen-4-ol	19.74	22.51	23.89	19.05	26.71	22.92	15.72	21.94	14.70	30.37	31.15	23.89	28.64	19.15	24.31	28.07	21.91	25.94	17.81	23.48
α -Terpineol	0.21	-	0.26	-	0.30	0.21	-	0.24	-	0.29	0.30	0.26	0.44	0.25	0.36	0.35	0.24	0.35	-	0.29
Myrtenol	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	0.19	-	-	0.30	-	-	0.22	-	0.23	-	-
β -Terpinyl acetate	-	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-	0.20	-	0.30	0.28	0.31	0.30	-	0.33	0.30	0.27
α -Curcumene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.21	-	-	-	-	-	-	-	-	0.43

ตารางที่ 1-21 (ต่อ)

Compound	% peak area																			
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21
Zingiberene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Sesquiphellandrene	-	0.36	0.08	-	-	0.17		0.36		0.67	0.69	0.08	0.96	0.93	0.55	1.03	0.36	0.70	1.01	1.51
(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22	-	-	0.72	0.75	0.55	0.92	-	0.34	0.56	0.62
DMPBD	1.17	1.99	1.36	1.09	0.48	0.41	0.93	2.38	0.43	13.45	5.66	1.36	15.47	13.76	11.27	15.71	2.37	8.96	13.24	11.50
Unknown	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-	-	-	-	-
4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.34	1.27	0.32	0.40	-	0.13	2.89	-

2. ไพลกลุ่มที่ 2

ปลูกไพลในแปลงรวบรวมพันธุ์กรรมที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา โดยใช้ท่อนพันธุ์ไพลที่ได้รับรวบรวมมาจากแหล่งที่มาต่าง ๆ จำนวนทั้งสิ้น 132 แหล่งที่มา ปลูกตัวอย่างละ 10 ต้น เก็บตัวอย่างใบอ่อนไพลจากแปลงเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ขั้นตอนการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอใช้วิธีการดังที่ได้กล่าวไปแล้วในการวิเคราะห์ข้อมูลไพลในกลุ่มที่ 1

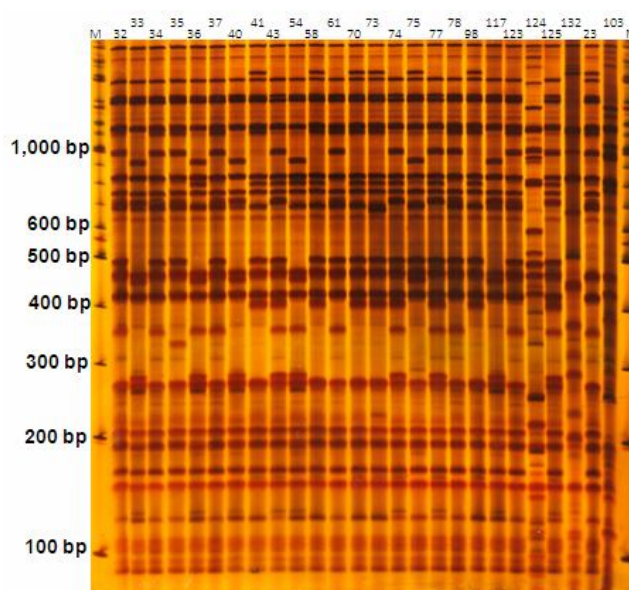
2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบไพล

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของไพลทั้ง 132 ตัวอย่าง ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วในไพลกลุ่มที่ 1

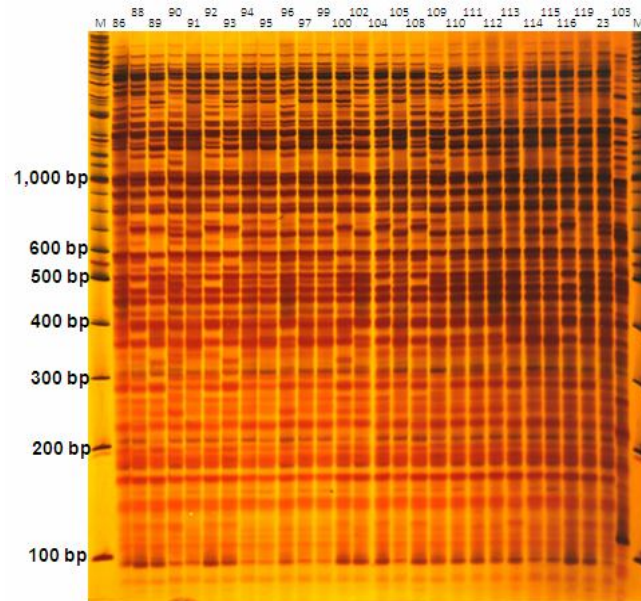
2.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

ไพรเมอร์และวิธีการทดลองที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไพลกลุ่มที่ 2 เป็นวิธีเดียวกันกับที่ได้กล่าวไปแล้วในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพลกลุ่มที่ 1

จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนและเข้มปานกลางที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีอยู่ในช่วง 17-31 แถบหรือ markers ต่อคู่ไพรเมอร์ (รูปที่ 1-17 และ 1-18) รวมแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจำนวน 309 แถบ เฉลี่ย 25.75 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดได้แก่ E-ACC/M-CAC และไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดได้แก่ E-AGG/M-CAC จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (polymorphic bands) มีจำนวนทั้งสิ้น 242 แถบ คิดเป็น 78.32 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด โดยไพรเมอร์ที่ให้เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands มากที่สุดได้แก่ไพรเมอร์ E-AGC/M-CTG (ตารางที่ 1-22)



รูปที่ 1-17 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไพลกลุ่มที่ 2 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CAC (ตัวเลขที่กำกับแสดงหมายเลขตัวอย่าง และ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)



รูปที่ 1-18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างไพลกลุ่มที่ 2 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้คู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTG (ตัวเลขที่กำกับแสดงหมายเลขตัวอย่าง และ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

ตารางที่ 1-22 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคเอเอฟแอลพี จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในตัวอย่างไพลกลุ่มที่ 2

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	จำนวน polymorphic band	% polymorphic band
E-AAC/M-CTG	27	20	74.07
E-ACC/M-CAC	31	24	77.42
E-ACC/M-CTA	26	18	69.23
E-ACC/M-CTC	22	14	63.64
E-ACC/M-CTT	28	20	71.43
E-ACG/M-CAC	30	25	83.33
E-ACG/M-CAT	26	20	76.92
E-ACG/M-CTC	24	23	95.83
E-AGC/M-CTG	25	24	96.00
E-AGC/M-CTT	26	19	73.08
E-AGG/M-CAC	17	11	64.71
E-AGG/M-CTG	27	24	88.89
เฉลี่ย	25.75	20.16	77.88

จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาคำนวณค่า polymorphic information contents (PICs) ซึ่งเป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างสองตัวอย่างเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่งนั้น ๆ โดยจากการทดลองพบว่าค่า PIC ของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบมีค่าอยู่ในช่วง 0.0000-0.4999 ค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.0903 ซึ่งค่าที่ได้ค่อนข้างต่ำและใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของไพลกลุ่มที่ 1 แสดงให้เห็นว่าไพลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่มากนัก และเมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard (1908) พบว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้อยู่ในช่วง 0.2457-1.00 จากนั้นนำค่าความเหมือนทางพันธุกรรมมาวิเคราะห์การจัดกลุ่มและสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc-2.20k พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ ที่ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.29 กลุ่มที่ 1 คือตัวอย่างไพล กลุ่มที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างที่เป็นกระทือและไพลป่า เฉพาะตัวอย่างไพลพบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมสูงคือมีค่าอยู่ในช่วง 0.7644-1.00 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.879 จากผลการทดลองสามารถแบ่งไพลเป็นกลุ่มย่อยได้ 5 กลุ่มที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.86 (รูปที่ 1-19) และเปรียบเทียบลักษณะดอกของแต่ละกลุ่ม (รูปที่ 1-24)

ไพลกลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 1, 7, 23, 25, 29, 32, 34, 35, 37, 42, 46, 50, 56, 57, 61, 65, 71, 78, 81, 83, 87, 88, 90, 92, 105, 110, 118, 120, 126 และ 132 โดยตัวอย่างส่วนใหญ่ในกลุ่มออกดอกช้ากว่าไพลกลุ่มอื่น ๆ ดอกมีรูปร่างค่อนข้างยาว ปลายช่อดอกเรียวยาวแหลม บางตัวอย่างมีกลีบประดับสีเขียว (รูปที่ 1-20)

ไพลกลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 2, 4, 8, 10, 13, 15, 19, 22, 27, 43, 48, 59, 74, 77, 79, 85, 89, 93, 100, 125, 128 และ 129 ตัวอย่างส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้มีลำต้นสูง ดอกมีรูปร่างสั้นกว่ากลุ่มย่อยที่ 1 ปลายดอกมีลักษณะแหลม (รูปที่ 1-21)

ไพลกลุ่มย่อยที่ 3 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 3, 6, 9, 11, 12, 14, 21, 24, 26, 28, 30, 38, 39, 41, 44, 45, 47, 49, 58, 60, 62, 63, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 82, 84, 91, 94, 95, 97, 98, 99, 102, 106, 107, 109, 111, 116, 117, 122, 124, 130, 131, 133 และ 134 ตัวอย่างไพลเครื่องและตัวอย่างไพลส่วนใหญ่ที่ไม่มีใบลายขีดหรือเป็นริ้วคล้ายไพลเครื่องจัดอยู่ในกลุ่มนี้ รูปร่างดอกคล้ายกับไพลกลุ่มย่อยที่ 2 แต่ปลายดอกมนกว่า (รูปที่ 1-22)

ไพลกลุ่มย่อยที่ 4 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 5, 16, 17, 18, 20, 31, 33, 36, 40, 51, 53, 54, 55, 64, 80, 86, 96, 103, 112, 113, 114, 115, 119 และ 121 ตัวอย่างส่วนใหญ่มีลำต้นเตี้ยกว่ากลุ่มอื่น ๆ และดอกมีกลีบประดับสีเขียว (รูปที่ 1-23)

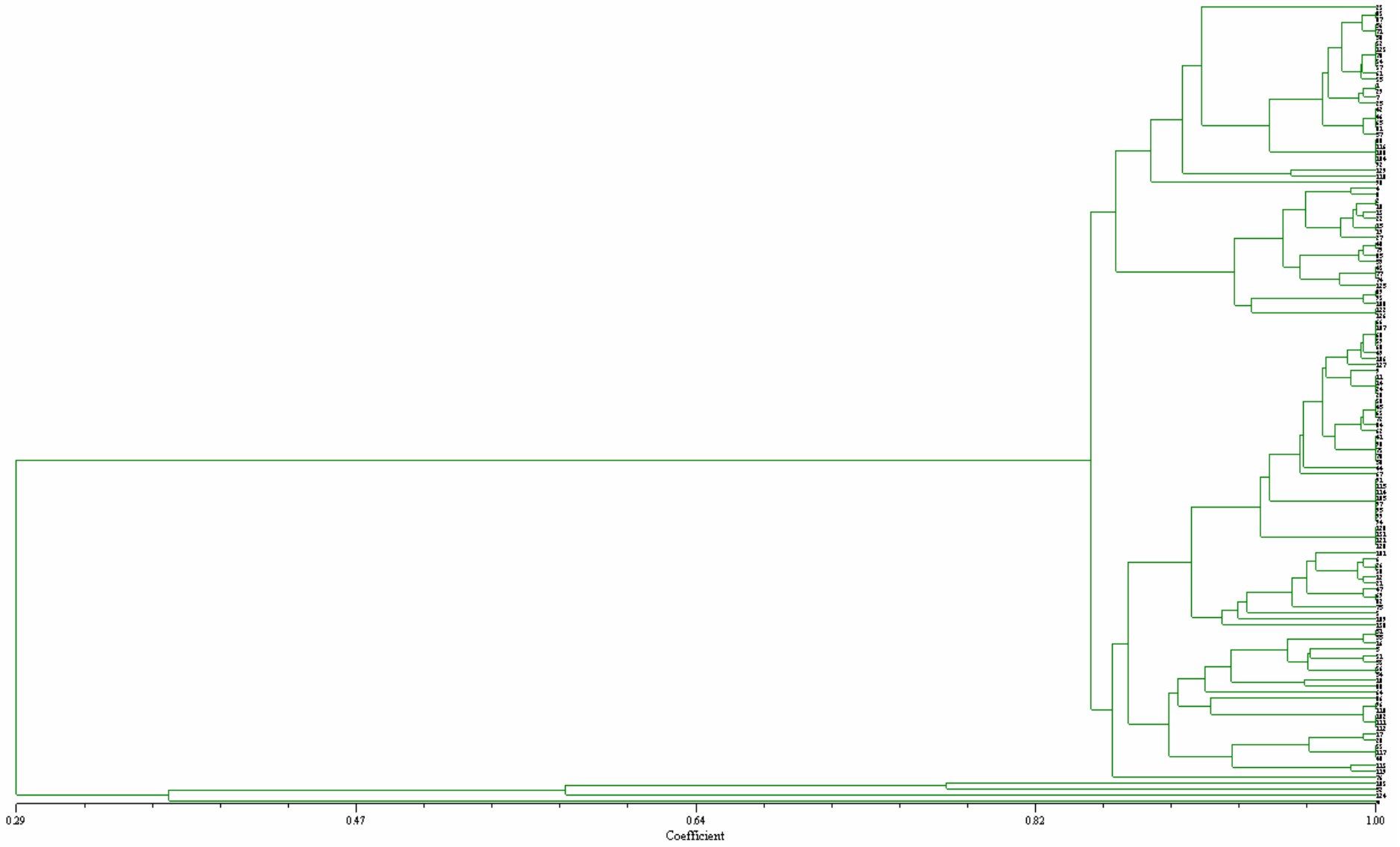
ไพลกลุ่มย่อยที่ 5 ได้แก่ตัวอย่างที่ 76

จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างไพลมีความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่มากนัก การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพีตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งไพลเป็นกลุ่มย่อยได้ 5 กลุ่ม โดยตัวอย่างส่วนใหญ่ในแต่ละกลุ่ม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างร่วมกัน จากข้อมูลลายพิมพ์ ดีเอ็นเอพบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไพลและกระทือมีค่าต่ำ (ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.29) สนับสนุนการจำแนกพืชทั้งสองชนิดว่าอยู่คนละสปีชีส์ นอกจากนี้การตรวจสอบลายพิมพ์ ดีเอ็นเอยังสามารถ

ลดจำนวนเชื้อพันธุกรรมที่มีความเหมือนกันออกไปได้ เฉพาะตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 รวมตัวอย่างกระทือและไพลป่า เริ่มต้นมีจำนวนทั้งสิ้น 132 ตัวอย่าง เมื่อตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่ามียางตัวอย่างที่มีพันธุกรรมเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันมาก ทำให้จำนวนสายพันธุ์ที่แท้จริงมีจำนวน 49 กลุ่มสายพันธุ์ดังนี้

- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 23
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 50, 56, 71, 83 และ 87
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 32, 34, 35, 37, 61, 78 และ 123
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 4 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 1, 7, 25 และ 29
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 5 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 42, 45, 46, 57 และ 81
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 6 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 88, 92, 105, 108 และ 116
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 7 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 132
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 8 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 118
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 9 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 90
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 10 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 4 และ 8
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 11 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 2, 10, 13, 15, 19 และ 22
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 12 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 27
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 13 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 48, 59, 79 และ 85
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 14 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 43, 74 และ 77
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 15 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 125
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 16 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 89, 93 และ 100
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 17 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 122 และ 126
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 18 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 39, 49, 60, 66, 68, 106, 107 และ 127
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 19 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 9, 11, 14, 24 และ 28
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 20 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 38, 45, 62, 63, 72 และ 84
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 21 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 41, 58, 70, 73 และ 98
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 22 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 44
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 23 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 67
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 24 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 91, 94, 95, 97, 99, 105, 114 และ 115
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 25 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 120, 121, 128 และ 131
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 26 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 101
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 27 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 6, 12, 21, 26 และ 30
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 28 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 47, 69 และ 82
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 29 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 75
- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 30 ได้แก่ตัวอย่างหมายเลข 3

- กลุ่มสายพันธุ์ที่ 31 ได้แก่วอย่างหมายเลข 109
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 32 ได้แก่วอย่างหมายเลข 130
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 33 ได้แก่วอย่างหมายเลข 16, 51 และ 55
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 34 ได้แก่วอย่างหมายเลข 5
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 35 ได้แก่วอย่างหมายเลข 31 และ 53
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 36 ได้แก่วอย่างหมายเลข 36 และ 54
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 37 ได้แก่วอย่างหมายเลข 18
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 38 ได้แก่วอย่างหมายเลข 80
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 39 ได้แก่วอย่างหมายเลข 64
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 40 ได้แก่วอย่างหมายเลข 86
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 41 ได้แก่วอย่างหมายเลข 96, 102, 110, 111 และ 112
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 42 ได้แก่วอย่างหมายเลข 17 และ 20
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 43 ได้แก่วอย่างหมายเลข 33, 40 และ 117
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 44 ได้แก่วอย่างหมายเลข 113 และ 119
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 45 ได้แก่วอย่างหมายเลข 76
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 46 ได้แก่วอย่างหมายเลข 103 (กระทือ)
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 47 ได้แก่วอย่างหมายเลข 52 (กระทือ)
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 48 ได้แก่วอย่างหมายเลข 124 (กระทือ)
กลุ่มสายพันธุ์ที่ 49 ได้แก่วอย่างหมายเลข 132 (ไพลป่า)



รูปที่ 1-19 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไพลและพืชสายพันธุ์ใกล้เคียงทั้งหมด 132 ตัวอย่าง สร้างโดยอาศัยข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี



รูปที่ 1-20 ตัวอย่างลักษณะไหลกลุ่มที่ 1 คือช่อดอกยาว ปลายช่อดอกเรียว และปลายกลีบประดับในบางตัวอย่างมีสีเขียว



รูปที่ 1-21 ตัวอย่างลักษณะไหลกลุ่มที่ 2 คือต้นสูง รูปร่างดอกสั้น



รูปที่ 1-22 ตัวอย่างลักษณะใบของไพลกลุ่มที่ 3 ที่มีลาย หรือเป็นริ้ว



รูปที่ 1-23 ตัวอย่างลักษณะไพลกลุ่มที่ 4 คือ ต้นเตี้ย กลีบประดับของช่อดอกเป็นสีเขียว



รูปที่ 1-24 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะดอกของไพลแต่ละกลุ่ม: (A) ไพลกลุ่มที่ 1, (B) ไพลกลุ่มที่ 2, (C) ไพลกลุ่มที่ 3, (D) ไพลกลุ่มที่ 4, (E) ไพลกลุ่มที่ 5, (F) ไพลป่า และ (G) กระเทียม

อภิปรายและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่เหมาะสม

จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง PS1, PS2 และ PS3 ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและการกลั่นด้วยน้ำ พบว่าการกลั่นน้ำจะให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยพันธุ์ไพล PS3 และ PS2 ที่สกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูง คือ 1.467 และ 1.333 %v/w ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากไพลที่สกัดด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำมีค่าคุณภาพทางฟิสิกส์ใกล้เคียงกับค่าตามมาตรฐานที่กำหนดโดย สมอ. มากที่สุด

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพลด้วยเครื่อง GC-MS พบว่าสารองค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันไพลทั้ง 3 สายพันธุ์ที่สกัดด้วยเฮกเซน และสกัดโดยกลั่นด้วยน้ำมีสารองค์ประกอบหลักที่เหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่สารองค์ประกอบย่อย ซึ่งสารสำคัญที่พบในน้ำมันไพลที่สกัดด้วยเฮกเซน คือ Sabinene (24.05-39.11 %), γ -Terpinene (6.68-7.74 %), Terpinen-4-ol (33.11-49.36 %) และ DMPBD (5.31-8.28 %) สารสำคัญที่พบในน้ำมันไพลที่สกัดด้วยน้ำ คือ Sabinene (36.71-53.50 %), γ -Terpinene (5.27-7.25 %), Terpinen-4-ol (21.85-29.96 %) และ DMPBD (0.95-16.16 %)

2. การทดลองในไพลกลุ่มที่ 1

2.1 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพล

จากผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่าสามารถจัดจำแนกไพลตามแผนภูมิทางพันธุกรรมได้เป็น 4 กลุ่ม ส่วนกระเทือ (ตัวอย่าง S9) แยกออกมาจากกลุ่มไพลอย่างชัดเจน ในกลุ่มไพลจำนวน 4 กลุ่มนั้นสามารถจำแนกย่อยได้เป็น 6 กลุ่มสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาจากกลุ่มสายพันธุ์ไพลร่วมกับผลผลิตโรโซม พบว่ากลุ่มสายพันธุ์ที่ 5 เป็นกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันไพลต่อกอมากที่สุด และมีผลผลิตโรโซมต่อต้านมากที่สุดเช่นกัน ในขณะที่กลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุดคือ 2.143 %

2.2 ผลผลิตโรโซมและปริมาณน้ำมันหอมระเหยของน้ำมันไพล

จากการประเมินผลผลิตน้ำมันหอมระเหย พบว่าตัวอย่าง S13, S19, S7, S20 และ S18 เป็น 5 อันดับแรกที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยต่อกอมากที่สุด ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ที่ 5, 3, 3, 5 และ 2 ตามลำดับ ดังนั้นกลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 และ 5 อาจเป็นกลุ่มสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตน้ำมันหอมระเหยต่อพื้นที่สูง จึงควรเลือกใช้สายพันธุ์ในสองกลุ่มนี้ในการทดสอบสายพันธุ์ต่อไป โดยเฉพาะตัวอย่าง S13 และ S19 ซึ่งเป็นตัวแทนสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลที่เก็บรวบรวมจากการปลูกทดลองในสถานที่เดียว หากมีการปลูกในหลายสถานที่ และมีการทดลองซ้ำจะทำให้ข้อมูลมีความเที่ยงตรงมากขึ้น

2.3 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันไพล 21 ตัวอย่าง

น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนจากไพลทั้ง 21 ตัวอย่าง พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ α -Thujene, α -Pinene, Sabinene, β -Pinene, β -Myrcene, α -Terpinene, γ -Terpinene, (Z)-Sabinene hydrate, Terpinolene, (E)-Sabinene hydrate, Terpinen-4-ol และสาร DMPBD ซึ่งพบในน้ำมันไพลทุกสายพันธุ์ ยกเว้นน้ำมันจากตัวอย่าง S9 (ตารางที่ 1-38) โดยสารที่พบมากที่สุดคือน้ำมันหอมระเหยไพลคือ Sabinene ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ องค์ประกอบที่พบรองลงมาได้แก่สาร Terpinen -4-ol ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการลดการอักเสบ มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ (Wanauppathamkul, 2003)

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS ของตัวอย่างไพล 21 ตัวอย่าง พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีสอดคล้องกับการรายงานของ Taroeno *et al.* (1991) ; Pongprayoon *et al.*, (1996) ; สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2552) นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์ยังพบสาร (E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl) but-1-ene ในน้ำมันไพลที่สกัดจากตัวอย่าง S11, S14, S15, S16, S17, S19, S20 และ S21 ซึ่งสารนี้เป็นสารในกลุ่ม phenylbutanoids ที่มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ ผ่อนคลายกล้ามเนื้อเรียบ ผ่อนคลายการบีบตัวของมดลูก (Wanauppathamkul, 2003) และสาร 4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene ในน้ำมันไพลที่สกัดจากตัวอย่าง S14 S15 S16 S17 S19 และ S20 สารนี้เป็นสารในกลุ่ม phenylbutanoids ที่ค่อนข้างพบได้น้อยในน้ำมันไพล และยังไม่มียางานถึงประสิทธิภาพของสารชนิดนี้

จากการทดลองวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันจากสายพันธุ์ S9 พบว่าตัวอย่างนี้อาจจะเป็นกระเทียม (*Zingiber zerumbet* Smith) เนื่องจากมีสารองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากน้ำมันไพลสายพันธุ์อื่น ๆ โดยสารสำคัญที่พบในน้ำมันจากสายพันธุ์ S9 คือ Humulen, Camphene, Zerumbone และ Camphor ซึ่งจากรายงานการวิจัยพบว่าสาร Zerumbone เป็นสารที่พบมากในกระเทียม โดยสารชนิดนี้สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งที่ลำไส้ใหญ่ และปอดได้ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง เหนี่ยวนำให้เซลล์มีการตายแบบ อะพอพโทซิส (apoptosis) และลดการทำงานของโปรตีน Nuclear Factor (NF) Kappa B ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบของตับ (Kim *et al.*, 2009)

3. การทดลองในไพลกลุ่มที่ 2

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพล

จากผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไพลกลุ่มที่ 2 จำนวน 132 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจัดจำแนกกลุ่มตามแผนภูมิทางพันธุกรรมได้ 5 กลุ่ม ซึ่งในไพลกลุ่มที่ 1 จัดจำแนกได้เพียง 4 กลุ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น ทำให้เพิ่มโอกาสที่จะตรวจพบไพลที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมากยิ่งขึ้น เมื่อพิจารณาผลการจัดกลุ่มด้วยแผนภูมิทางพันธุกรรมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ พบว่าค่อนข้างมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งอาจใช้เป็นเกณฑ์ในการแบ่งสายพันธุ์ไพลได้ในเบื้องต้น จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีนักวิจัยหลายท่านพยายามจำแนกสายพันธุ์ไพลโดยใช้ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ แต่เนื่องจากพืชตระกูลนี้มีความคล้ายคลึงกันอย่างมาก และการใช้เกณฑ์ดังกล่าวมีข้อจำกัดคืออาจได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อม ซึ่งส่งผลทำให้

เกิดความผิดพลาดในการจำแนกสายพันธุ์ไพล จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพีทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างละเอียด นอกจากนี้ผลที่ได้ยังมีความแม่นยำน่าเชื่อถือเนื่องจากไม่มีผลกระทบจากระยะการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อม

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. วิธีการสกัดน้ำมันไพล

การสกัดน้ำมันหอมระเหยไพลด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำเป็นวิธีที่เหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากการสกัดด้วยวิธีดังกล่าวให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน รวมทั้งคุณสมบัติทางฟิสิกส์และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่สกัดได้ใกล้เคียงกับมาตรฐานมากที่สุด เนื่องจากการกลั่นด้วยน้ำมีการใช้ความร้อนร่วมในการสกัดด้วย จึงทำให้สกัดน้ำมันหอมระเหยออกจากเซลล์ของตัวอย่างไพลได้มากกว่า จึงควรใช้วิธีการกลั่นด้วยน้ำในการสกัดน้ำมันหอมระเหยไพลในโครงการนี้ต่อไป

2. การจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ไพลกลุ่มที่ 1

จากผลการทดลองสามารถจำแนกตัวอย่างไพลได้เป็น 6 กลุ่มสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาพร้อมกับข้อมูลผลผลิตไรโซม ปริมาณน้ำมันหอมระเหย และผลผลิตน้ำมันหอมระเหยต่อพื้นที่ปลูกแล้วพบว่า กลุ่มสายพันธุ์ที่ 5 มีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันหอมระเหยต่อกอมากที่สุด จากผลการวิจัยอาจกล่าวได้ว่ากลุ่มสายพันธุ์ที่ 5 น่าจะเป็นกลุ่มสายพันธุ์ที่ดีที่สามารถให้ผลผลิตน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด และรองลงมาคือกลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 ทางคณะผู้วิจัยเห็นว่าควรทำการทดลองเพื่อทดสอบสายพันธุ์ไพล โดยศึกษาการเจริญเติบโต ระยะการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตของตัวอย่างไพลในกลุ่มที่ 1 ทั้ง 21 ตัวอย่างนี้อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการวิจัยในครั้งต่อไป

3. การจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ไพลกลุ่มที่ 2

จากผลการทดลองสามารถจำแนกกลุ่มไพลได้เป็น 5 กลุ่ม แต่ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างไพลในกลุ่มนี้ยังไม่ได้มีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทางผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไพลในกลุ่มที่ 2 เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มสายพันธุ์ รวมทั้งมีการทดสอบการให้ผลผลิตและปริมาณน้ำมันหอมระเหยไพลต่อไปในอนาคต และคณะผู้วิจัยยังมีความเห็นว่าการศึกษาด้านอนุกรมวิธานน่าจะช่วยให้การจัดจำแนกกลุ่มสายพันธุ์มีความชัดเจนมากขึ้น

บรรณานุกรม

- กณิกา ภิรมย์รัตน์, มนตรี ตู้อินดา, ศิริกุล เกตุสมนึก, เรณู โกยสุโข และ มาลี บรรจบ. 2550. ฤทธิ์ต้านฮิสตามีนของไพลในผู้ป่วยเด็กโรคหืดทดสอบโดยการฉีดฮิสตามีนเข้าผิวหนัง. ใน **รวมบทความงานวิจัยด้านการแพทย์แผนไทยและสมุนไพร**. กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก สถาบันการแพทย์แผนไทย กลุ่มงานวิจัยทางคลินิกด้านการแพทย์แผนไทยและสมุนไพร. หน้า 66.
- จุฬารัตน์ ติมวัฒนานนท์, ชนรรจ์ รัตนโชติพานิช, อาริวรรณ เชี่ยวชาญวัฒนา, อรอนงค์ วลีขจรเลิศ, รัตนศิริ จิวานนท์, เจริญ ชุณหากัญจน์, บั๋งอร ศรีพานิชกุลชัย และ สุมนต์ สกลไชย. 2551. ประสิทธิภาพทางคลินิกของเจลไพลที่ทำจากน้ำมันไพลปริมาณ 1% ในการรักษาผิวหนังเด็กน้อยถึงปานกลาง. **วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน**. 4: 121- 133.
- ทวีศักดิ์ สุนทรชนศาสตร์, เตือนตา เสมาทอง, ฉันทรา พูนศิริ, เพ็ญใจ ประสานสี, อรรคชัย ตันตราวงศ์, ศิรินันท์ ทับทิมเทศ และ สายสุรางค์ โชติพานิช. 2541. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของไพลเจล ใน **ไพลเจลด้านอาการอักเสบจากสมุนไพรไทย**. กรุงเทพฯ. 32-40.
- นันทวัน บุญยะประภัสร์ และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2542. **สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (3)**. บริษัท ประชาชน จำกัด. 823 หน้า.
- นัชดา เกียรติยิ่งอังคสุลี, มนต์ หวังหมัด และ กมล สวัสดิ์มงคล. 2522. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสำคัญจากไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.). **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 21(1):13-24.
- ประคอง พันธุ์อุไร. 2521. ไพลกันยุง. **วารสารมาลาเรีย** 13 (6): 11-13.
- ประคอง พันธุ์อุไร และคณะ. 2522. การศึกษาสารสกัดจากไพลใช้ทาผิวหนังกันยุงกัด. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์**. 21(1): 21-23.
- มนิษา เส็งประชา. 2546 .**การเปรียบเทียบกระบวนการสกัดกลิ่นหอมจากดอกกุหลาบมอญ** .วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รุ่งฤดี พรสกุลเลิศชัย. 2550. **การศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพลโดยใช้วิธีไมโครเวฟ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิเชียร กิรตินิจกาล, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และ สรัญญา วัชรโรทัย. 2548. การใช้เทคนิค DNA microsatellite ในการหา marker เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์สมุนไพร. ใน **รายงานการวิจัย การรวบรวมการคัดเลือกพันธุ์และศึกษาการเขตกรรมพืชสมุนไพร**. งบประมาณบูรณาการนำร่องปีงบประมาณ 2547. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- วันดี กลุณพันธ์. 2536. **เภสัชวินิจฉัยและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม1**. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- วัลภา อนันตสานต์ และ ศักดิ์ชัย อัญญคุณ. 2518. การศึกษาผลของน้ำมันไพลในการออกฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่. **เชียงใหม่เวชสาร** 14(3): 249-57.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2552. **ไพล**. แหล่งที่มา :

http://www.tistr.or.th/essentialoils/plant_%E0%B9%84%E0%B8%9E%E0%B8%A5.htm. 5 เมษายน 2553.

สมพร ประเสริฐสังกุล. 2546. **พันธุศาสตร์โมเลกุล**. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
วิทยาเขตปัตตานี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมพิศ ไม้เรียง และ เพ็ญศรี นันทสมสรอายุ. 2548. **พืชสมุนไพรในแผนยศาสตร์ของชาติ**. นสพ. กสิกร. 78(6):
72-82.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน สถาบันการแพทย์แผนไทย และศูนย์ฝึกอบรมและพัฒนาการ
สาธารณสุข. 2547. **ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน**. กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2541. **น้ำมันไพล**. มอก .1679-2541

อาภาพรรณ ชัญไพศาล, ณัฐฐา เลาทกุลจิตต์ และ อรพิน เกิดชูชื่น. 2552. **การวิเคราะห์องค์ประกอบสารหอมระเหย
พืชวงศ์ Zingiberaceae ด้วยเทคนิค Head Space Gas Chromatography Mass Spectrometry**.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 40:1 (พิเศษ): 125-128.

องค์การเภสัชกรรม .2549. **ไพล**. ฐานข้อมูลสมุนไพร .แหล่งที่มา :

<http://www.medplant.mahidol.ac.th/doi/rpt3.asp?b=0035&n=ไพล> ,10 กรกฎาคม 2551.

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves.
Biotech. Biodiv. Let. 2: 19-24.

Ar-Reum H, Moon-Sun K, Yeon H J. 2005. Cyclooxygenase-2 inhibitory phenylbutenoids form the rhizomes of
Zingiber cassumunar. **Chem. Pharm. Bull.** 53(11): 1466-68.

Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and
sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. **Biotechnol. Agron. Soc.
Environ.** 10: 77-81.

Bhuiyan MNI, Chowdhury JU, Begum J. 2008. Volatile constituents of essential oils isolated from leaf and
rhizome of *Zingiber cassumunar* Roxb. **Bangladesh J. Pharmacol.** (3) 69-73.

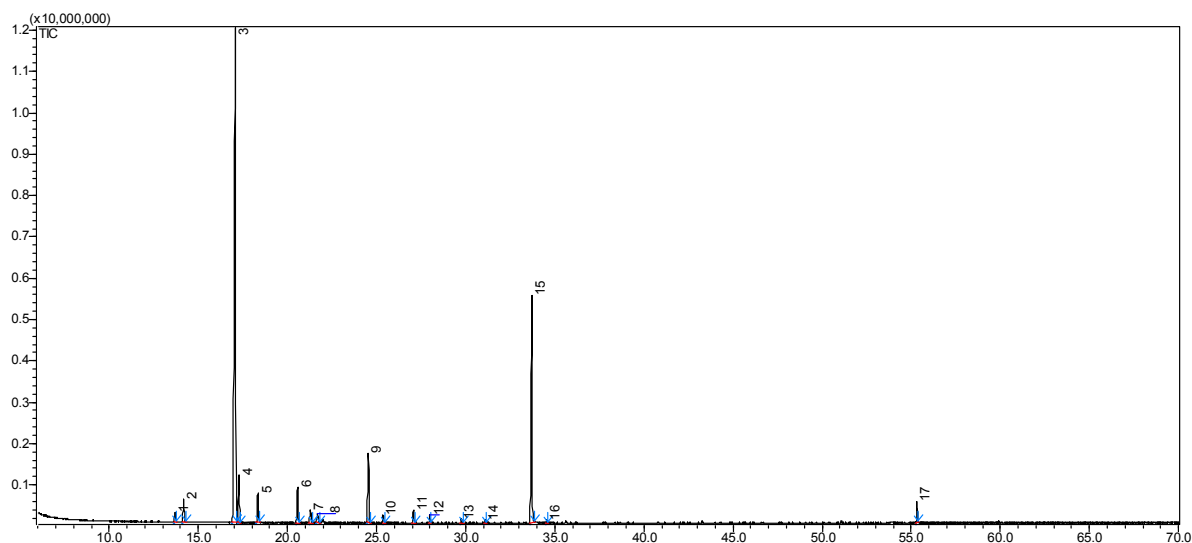
Bua-in, S. and Y. Paisooksantivatana. 2009. Essential Oil and Antioxidant Activity of Cassumunar Ginger
(Zingiberaceae: *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) Collected from Various Parts of Thailand.
Kasetsart J. (Nat. Sci.). 43: 467 - 475.

Chandra R, Desai AR, Govind S and Gupta P.N. 1997. Metroglyph analysis in turmeric (*C. longa* L.)
germplasm in India. **Scientia Horticulturae.** 70: 211–233.

- Chandra R, Govind S and Desai A.R. 1999. Growth, yield and quality performance of turmeric (*C. longa* L.) genotypes in mid altitudes of Meghalaya. **Journal of Applied Horticulture**. 1: 142–144.
- Giwanon, R., S. Thubthimthed, U. Rerkam, and T.Sunthorntanasart. 2000. Antimicrobial activity of terpinen-4-ol and sabinene. **Thai J. Pharm. Sci.** 24(Suppl): 27.
- Habsah, M., M. Amran and M.M. Mackeen. 2000. Scening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **J. Ethnopharmacol.** 72: 403-10.
- Hazra P, Roy A. and Bandhopadyay A. 2000. Growth characters as rhizome yield components of turmeric. **Crop Research**. 19: 235–246.
- Jacard, P. 1908. Nouvelles recherché sur la distribution florale. **Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.** 44: 223-270.
- Jeenapongsa, R., K. Yoovathaworn, KM. Sriwatanakul, U. Pongprayoon and K. Sriwatanakul. 2003. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. **J. Ethnopharmacol.** 87:143–148.
- Kim, M., S. Miyamoto, Y. Tasui, T.Oyama, A.Murakami and T. Tanaka. 2009. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, inhibits colon and lung carcinogenesis in mice. **Int. J. Cancer.** 124; 264-271.
- Laupattarakasem, W., W. Kowsuwon, P. Laupattarakasem, et al. 1993. Efficacy of *Zingiber cassumunar* Roxb. (Plygesal) in the Treatment of Ankle Sprain. **Srinagarind Med. J.** 8(3): 159-164.
- Lima, M.L.A., A.A.F. Garcia, K.M. Oliveira, S. Matsuoka, H. Arizono, C.L. de Souza Jr. and A.P. de Souza. 2002. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Theor. Appl. Genet.** 104: 30-38.
- Lynrah P.G., Barua P.K. and Chakrabarti B.K. 1998. Pattern of genetic variability in a collection of turmeric genotypes. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**. 28: 201–207.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 51, 263–273.
- Nirmal Babu K., Sasikumar B., Ratnambal M.J., Johnson K.G. and Ravindran P.N. 1993. Genetic variability in turmeric (*C. longa* L.). **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**. 53: 91–93.
- Panthong, A., D. Kanjanapothi, V. Niwatananum, P. Tuntiwachwuttikul and V. Reutrakul. 1990. Antiinflammatory activity of compounds isolated from *Zingiber cassumunar*. **Planta Med.** 56: 60.
- Panthong, A., Kanjanapothi D., Niwatananant W., et al. Anti-inflammatory activity of compound D {(E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-2-ol} isolated from *Zingiber cassumunar*. 1997. **Phytomedicine** 4(3): 207-212.
- Pithayanukul P., J. Tubprasert and M. Wuthi-Udomlert. 2007. *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Zingiber cassumunar* (Plai) Oil and a 5 % Plai Oil Gel. **Phytother. Res.** 21; 164–169.

- Pongprayoon U., Tuchinda P. and Claeson P. 1997. Topical antiinflammatory activity of the major lipophilic constituent of the rhizome of *Zingiber cassumunar*, Part 2, Hexane extractives. **Phytomedicine**. 3(4) : 323-26.
- Sabulal, B., M. Dan, A. J. J, R. Kurup, S. P. Chandrika and V. George. 2007. Phenylbutanoid- rich rhizome oil of *Zingiber neesatum* from Western Ghats, southern India. **Flavour Fragrance J.** 22: 521–524.
- Soleimani, V.D., B.R. Baum and D.A. Johnson. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.]. **Theor. Appl. Genet.** 104: 350-357.
- Taroeno, J., J.Brophy and J.H.Zwaving. 1991. Analysis of the Essential Oil of *Zingiber Cassumunar* Roxb. from Indonesia. **Flavour Fragrance J.** 6: 161-163.
- Tomkins, J.P., T.C. Wood, L.S. Barnes, A. Westman and R.A. Wing. 2001. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Hemerocallis* spp.) using AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 102: 489-496.
- Tosti, N. and V. Negri. 2002. Efficiency of three PCR-based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) landraces. **Genome** 45:268–275.
- Wanauppathamkul S. 2003. **Platanoids**. 1 edition. The Innovation Development Fund, National Science and Technology Development Agency, Ministry of Science and Technology, Bannkok.
- Wasuwat S., Soonthornsaratoon P., Rojanapothi W., et al. 1990. Spermicidal activity of medicinal plants. **Science and Technology.** 6(1): 4-17.
- Xu, R., N. Tomooka and D.A. Vaughan. 2000. Plant genetic resource: AFLP markers for characterizing the Azuki bean complex. **Crop Sci.** 40: 808-815.
- Zhang, L.H., P. Ozias-Akins, G. Kochert, S. Kresovich, R. Dean and W. Hanna. 1999. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. **Theor. Appl. Genet.** 98: 895-902.

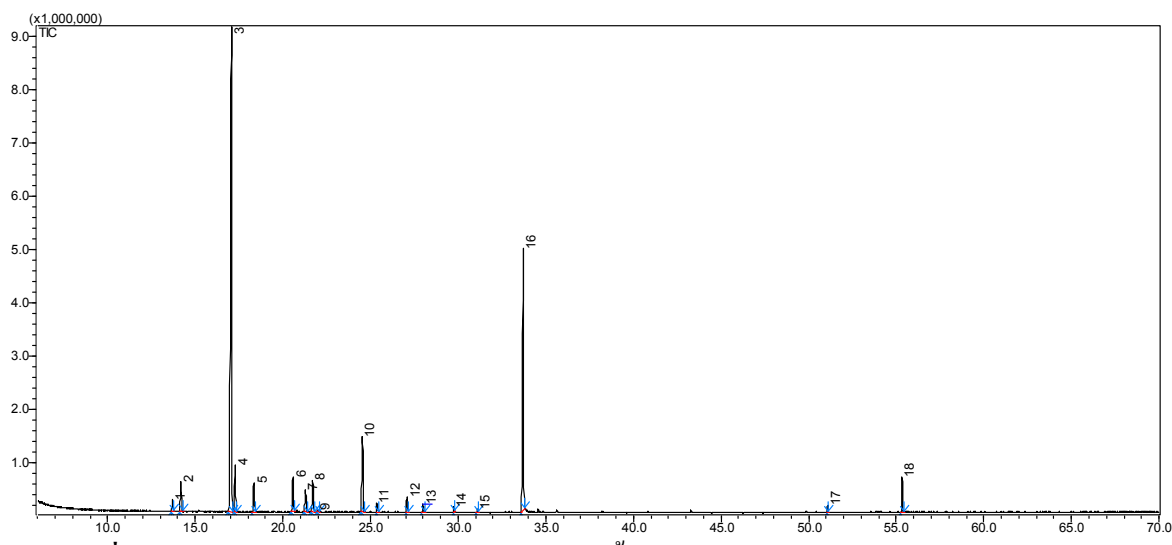
ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1-1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S1

ตารางผนวกที่ 1-1 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S1 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

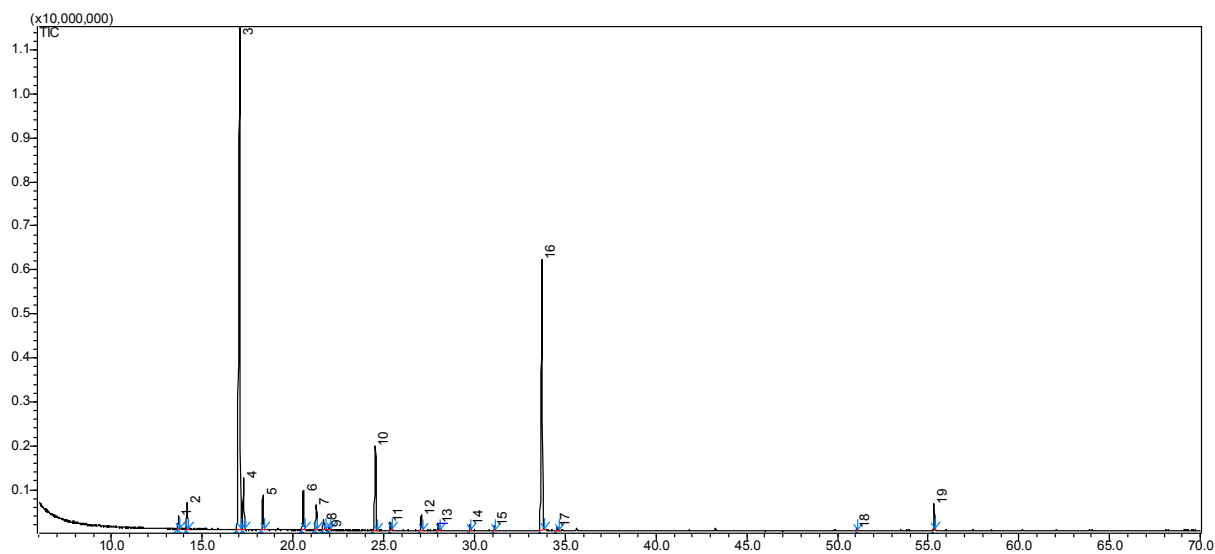
Peak No.	KI	% peak area	Compound
1	931	0.72	α -Thujene
2	939	1.76	α -Pinene
3	976	55.43	Sabinene
4	980	3.57	β -Pinene
5	991	2.47	β -Myrcene
6	1018	3.17	α -Terpinene
7	1023	1.27	m-Cymene
8	1031	0.95	Limonene
9	1062	6.64	γ -Terpinene
10	1068	0.66	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	1.07	Terpinolene
12	1097	0.60	(E)- Sabinene hydrate
13	1122	0.36	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1137	0.21	Terpinen-1-ol
15	1177	19.74	Terpinen-4-ol
16	1189	0.21	α -Terpineol
17	1662	1.17	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S2

ตารางผนวกที่ 1-2 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S2 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

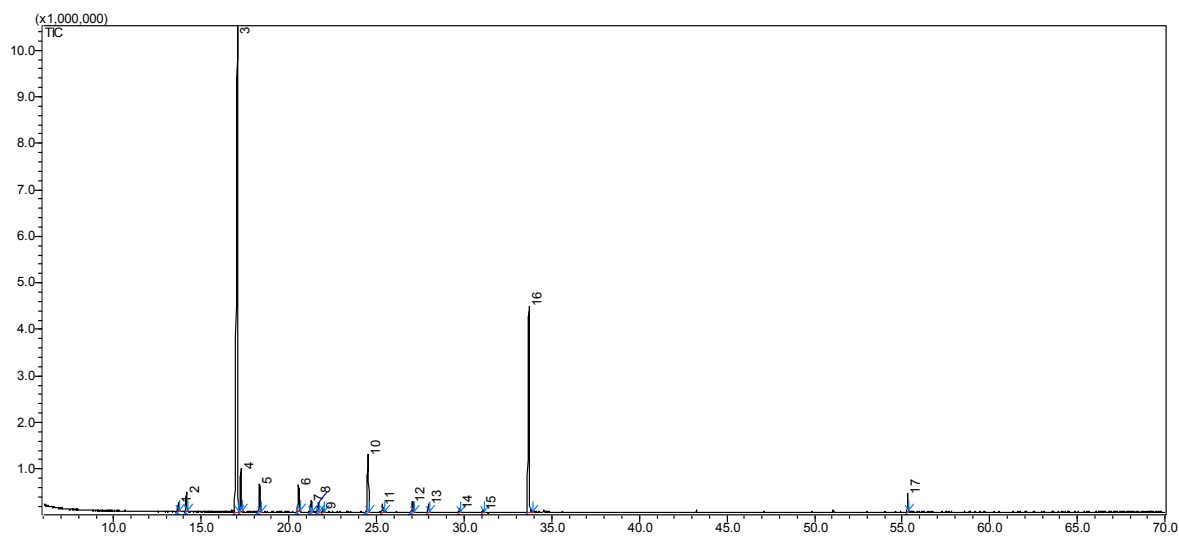
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.82	α -Thujene
2	939	2.24	α -Pinene
3	976	48.26	Sabinene
4	980	3.48	β -Pinene
5	991	2.39	β -Myrcene
6	1018	3.00	α -Terpinene
7	1023	1.92	m-Cymene
8	1031	3.03	β -Phellandrene
9	1033	0.14	1,8-Cineole
10	1062	6.69	γ -Terpinene
11	1068	0.75	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	1.08	Terpinolene
13	1097	0.68	(E)-Sabinene hydrate
14	1122	0.38	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
15	1137	0.28	Terpinen-1-ol
16	1177	22.51	Terpinen-4-ol
17	1523	0.36	β -Sesquiphellandrene
18	1662	1.99	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลด์ตัวอย่าง S3

ตารางผนวกที่ 1-3 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลด์ตัวอย่าง S3 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

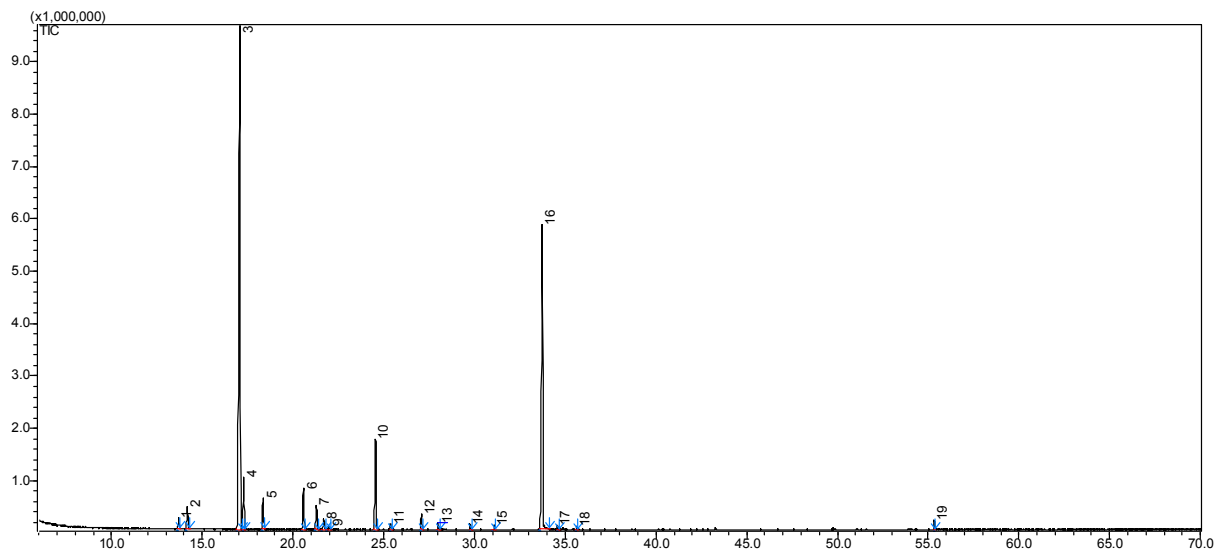
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.85	α -Thujene
2	939	1.76	α -Pinene
3	976	49.49	Sabinene
4	980	3.45	β -Pinene
5	991	2.51	β -Myrcene
6	1018	3.21	α -Terpinene
7	1023	1.99	m-Cymene
8	1031	0.85	Limonene
9	1033	0.21	1,8-Cineole
10	1062	7.12	γ -Terpinene
11	1068	0.56	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	1.18	Terpinolene
13	1097	0.52	(E)- Sabinene hydrate
14	1122	0.44	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
15	1137	0.27	Terpinen-1-ol
16	1177	23.89	Terpinen-4-ol
17	1189	0.26	α -Terpineol
18	1523	0.08	β -Sesquiphellandrene
19	1662	1.36	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S4

ตารางผนวกที่ 1-4 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S4 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

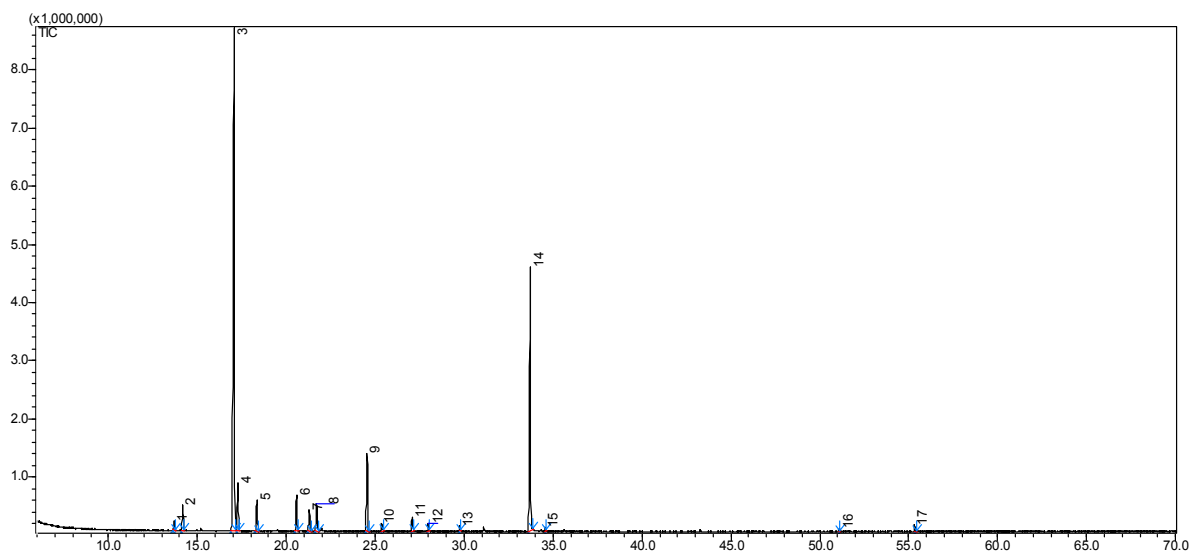
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.59	α -Thujene
2	939	1.57	α -Pinene
3	976	58.95	Sabinene
4	980	3.38	β -Pinene
5	991	2.42	β -Myrcene
6	1018	2.51	α -Terpinene
7	1023	1.00	m-Cymene
8	1031	0.84	Limonene
9	1033	0.23	1,8-Cineole
10	1062	5.63	γ -Terpinene
11	1068	0.72	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	0.85	Terpinolene
13	1097	0.68	(E)-Sabinene hydrate
14	1122	0.32	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
15	1137	0.17	Terpinen-1-ol
16	1177	19.05	Terpinen-4-ol
17	1662	1.09	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลด์ตัวอย่าง S5

ตารางผนวกที่ 1-5 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลด์ตัวอย่าง S5 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

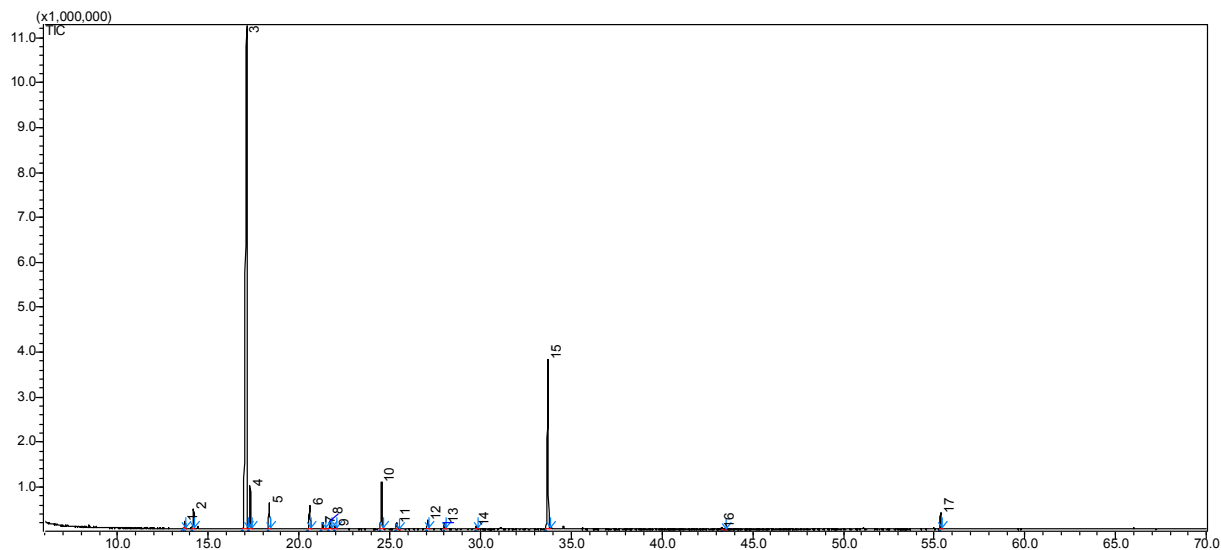
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.70	α -Thujene
2	939	1.62	α -Pinene
3	976	47.46	Sabinene
4	980	3.50	β -Pinene
5	991	2.26	β -Myrcene
6	1018	3.45	α -Terpinen
7	1023	1.92	m-Cymene
8	1031	0.96	Limonene
9	1033	0.27	1,8-Cineole
10	1062	7.44	γ -Terpinen
11	1068	0.50	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	1.08	Terpinolene
13	1097	0.46	(E)-Sabinene hydrate
14	1122	0.43	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
15	1137	0.31	Terpinen-1-ol
16	1177	26.71	Terpinen-4-ol
17	1192	0.30	α -Terpineol
18	1194	0.15	Myrtenol
19	1662	0.48	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-6 การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S6

ตารางผนวกที่ 1-6 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S6 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

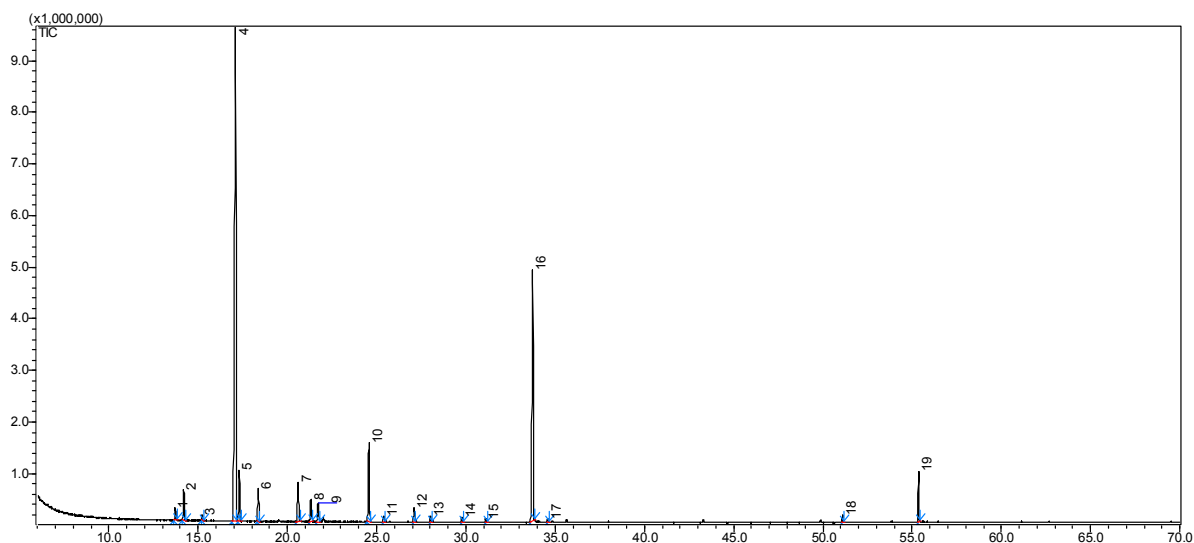
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.66	α -Thujene
2	939	2.00	α -Pinene
3	976	50.18	Sabinene
4	980	3.54	β -Pinene
5	991	2.53	β -Myrcene
6	1018	3.14	α -Terpinene
7	1023	1.81	m-Cymene
8	1031	2.70	β -Phellandrene
9	1062	7.13	γ -Terpinene
10	1068	0.61	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	1.11	Terpinolene
12	1097	0.57	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.31	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1177	22.92	Terpinene-4-ol
15	1189	0.21	α -Terpineol
16	1523	0.17	β -Sesquiphellandrene
17	1662	0.41	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-7 การวิเคราะห์ห้องค้ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S7

ตารางผนวกที่ 1-7 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S7 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

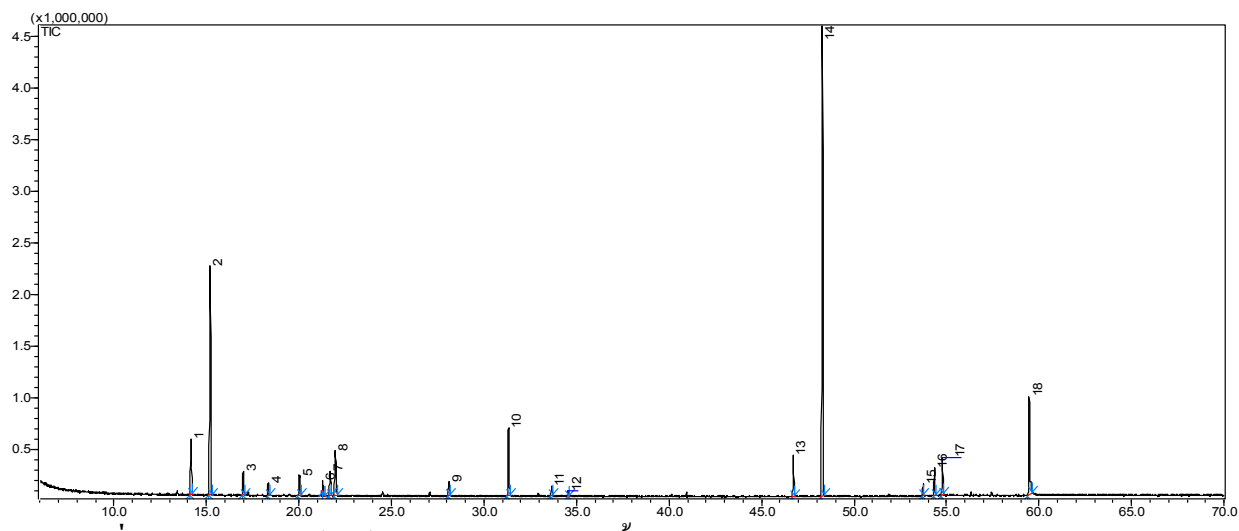
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.51	α -Thujene
2	939	1.63	α -Pinene
3	976	63.87	Sabinene
4	980	3.49	β -Pinene
5	991	2.34	β -Myrcene
6	1018	2.41	α -Terpinene
7	1023	0.68	m-Cymene
8	1031	0.77	Limonene
9	1033	0.29	1,8-Cineole
10	1062	4.80	γ -Terpinene
11	1068	0.70	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	0.76	Terpinolene
13	1097	0.62	(E)-Sabinene hydrate
14	1122	0.29	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
15	1177	15.72	Terpinene-4-ol
16	1352	0.19	β -Terpinyl acetate
17	1662	0.93	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-8 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S8

ตารางผนวกที่ 1-8 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S8 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

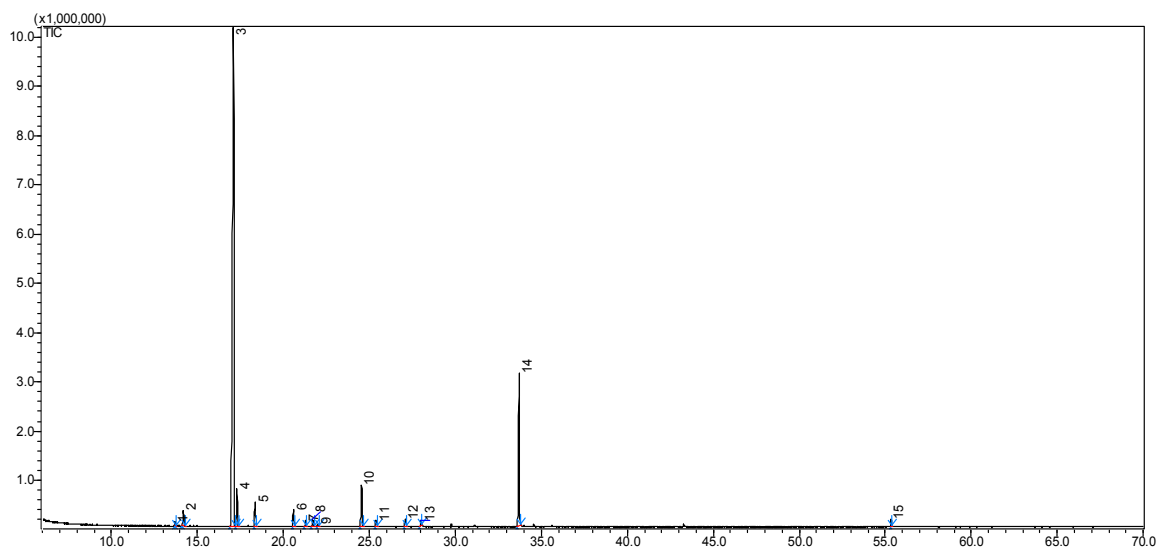
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.79	α -Thujene
2	939	2.17	α -Pinene
3	953	0.41	Camphene
4	976	49.20	Sabinene
5	980	3.60	β -Pinene
6	991	2.57	β -Myrcene
7	1018	3.37	α -Terpinene
8	1023	1.91	m-Cymene
9	1031	1.76	β -Phellandrene
10	1062	6.81	γ -Terpinene
11	1068	0.42	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	1.05	Terpinolene
13	1097	0.45	(E)-Sabinene hydrate
14	1122	0.35	(Z)--p-menth-2-en-1-ol
15	1137	0.22	Terpinene-1-ol
16	1177	21.94	Terpinene-4-ol
17	1189	0.24	α -Terpineol
18	1523	0.36	β -Sesquiphellandrene
19	1662	2.38	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S9

ตารางผนวกที่ 1-9 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S9 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

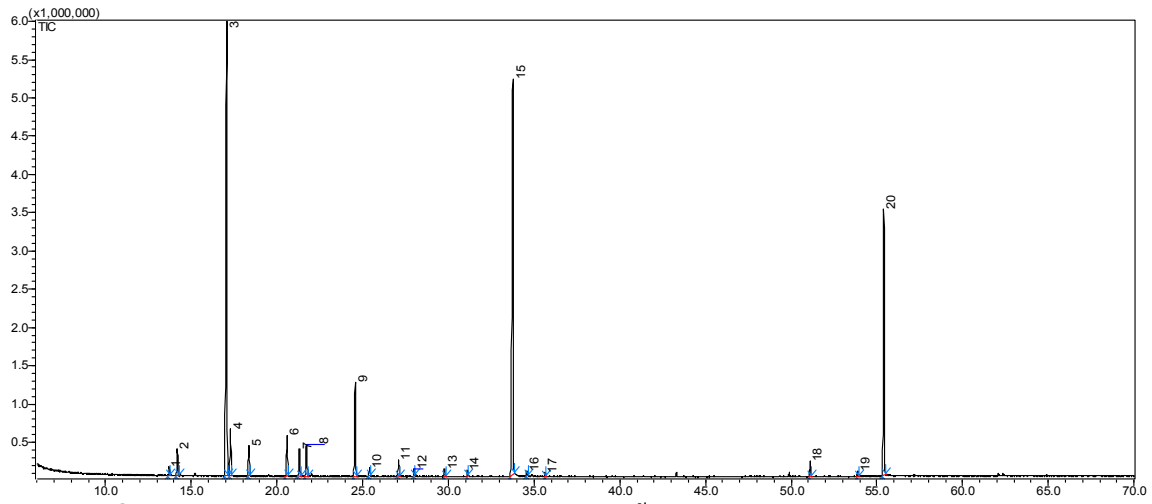
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	939	4.83	α -Pinene
2	953	20.78	Camphene
3	976	2.16	Sabinene
4	991	1.06	β -Myrcene
5	1011	2.19	3-Carene
6	1023	0.90	m-Cymene
7	1031	2.70	Limonene
8	1033	4.77	1,8-Cineole
9	1098	1.26	Linalool
10	1143	6.05	Camphor
11	1177	0.72	Terpinene-4-ol
12	1189	0.33	α -Terpineol
13	1418	2.76	Caryophyllene
14	1454	36.02	Humulene
15	1508	0.68	α -Farnesene
16	1581	1.78	Caryophyllene oxide
17	-	2.66	(Z)- α -Bisabolene epoxide
18	1731	8.35	Zerumbone



ภาพผนวกที่ 1-10 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S10

ตารางผนวกที่ 1-10 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S10 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

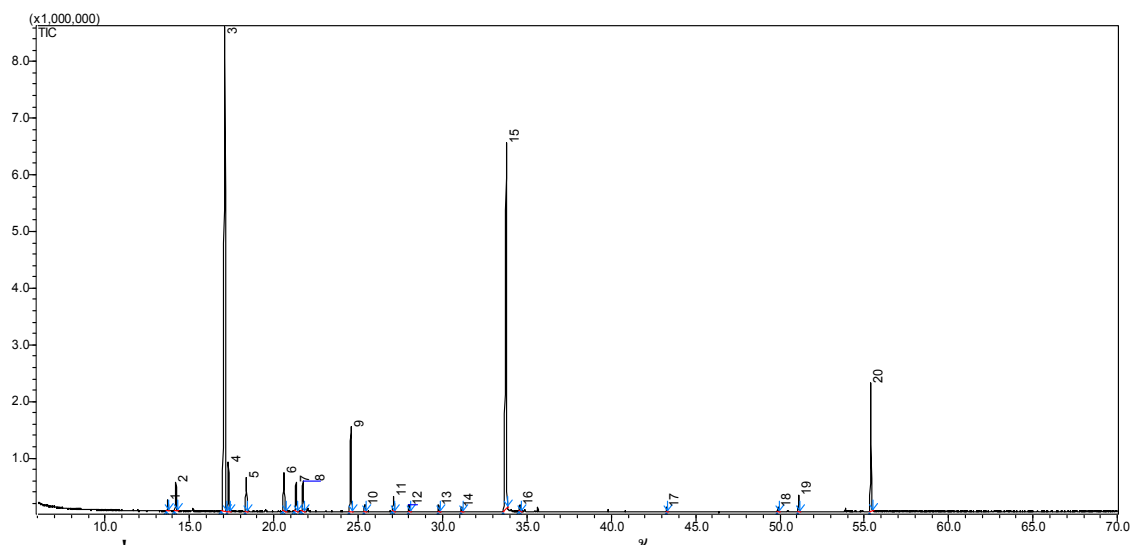
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.27	α -Thujene
2	939	1.42	α -Pinene
3	976	67.42	Sabinene
4	980	3.38	β -Pinene
5	991	2.49	β -Myrcene
6	1018	1.83	α -Terpinene
7	1026	0.58	p-cymene
8	1031	0.86	Limonene
9	1033	0.21	1,8-Cineole
10	1062	4.47	γ -Terpinene
11	1068	0.66	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	0.73	Terpinolene
13	1097	0.55	(E)-Sabinene hydrate
14	1177	14.70	Terpinene-4-ol
15	1662	0.43	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-11 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S11

ตารางผนวกที่ 1-11 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S11 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

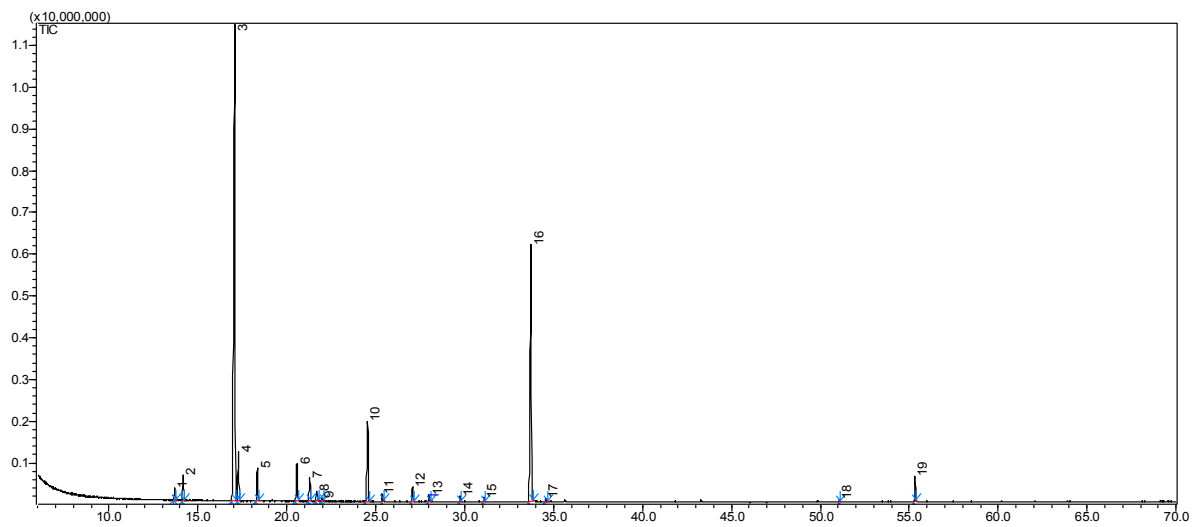
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.46	α -Thujene
2	939	1.56	α -Pinene
3	976	32.22	Sabinene
4	980	2.75	β -Pinene
5	991	1.81	β -Myrcene
6	1018	2.77	α -Terpinene
7	1023	1.89	m-Cymene
8	1031	2.45	β -Phellandrene
9	1062	6.52	γ -Terpinene
10	1068	0.38	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	0.93	Terpinolene
12	1097	0.38	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.41	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1137	0.28	Terpinene-1-ol
15	1177	30.37	Terpinene-4-ol
16	1189	0.29	α -Terpineol
17	1194	0.19	Myrtenol
18	1523	0.67	β -Sesquiphellandrene
19	1612	0.22	(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene
20	1662	13.45	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-12 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S12

ตารางผนวกที่ 1-12 ตารางองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S12 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

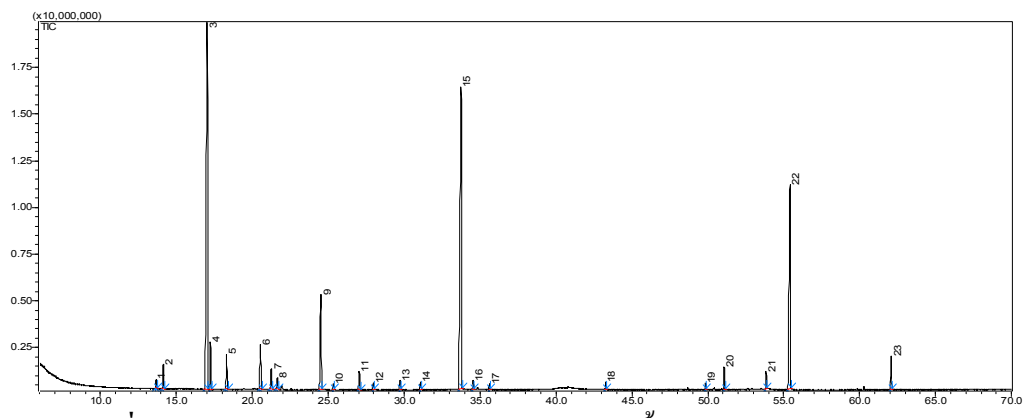
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.53	α -Thujene
2	939	1.68	α -Pinene
3	976	39.10	Sabinene
4	980	2.88	β -Pinene
5	991	2.07	β -Myrcene
6	1018	2.68	α -Terpinene
7	1023	2.04	m-Cymene
8	1031	2.23	β -Phellandrene
9	1062	6.09	γ -Terpinene
10	1068	0.46	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	0.87	Terpinolene
12	1097	0.47	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.39	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1137	0.30	Terpinene-1-ol
15	1177	31.15	Terpinene-4-ol
16	1189	0.30	α -Terpineol
17	1352	0.20	β -Terpinyl acetate
18	1483	0.21	α -Curcumene
19	1523	0.69	β -Sesquiphellandrene
20	1662	5.66	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-13 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S13

ตารางผนวกที่ 1-13 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S13 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

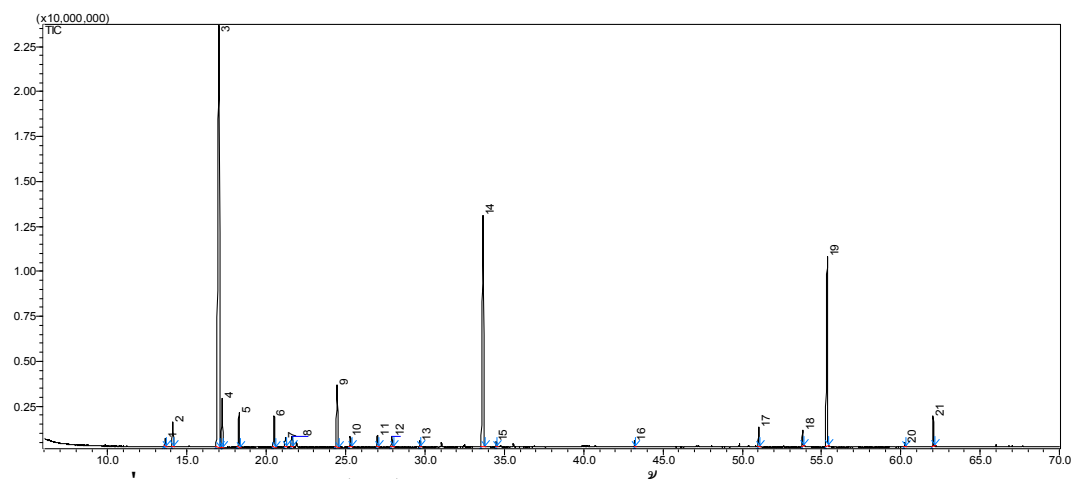
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.85	α -Thujene
2	939	1.76	α -Pinene
3	976	49.49	Sabinene
4	980	3.45	β -Pinene
5	991	2.51	β -Myrcene
6	1018	3.21	α -Terpinene
7	1023	1.99	m-Cymene
8	1031	0.85	Limonene
9	1033	0.21	1,8-Cineole
10	1062	7.12	γ -Terpinene
11	1068	0.56	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	1.18	Terpinolene
13	1097	0.52	(E)-Sabinene hydrate
14	1122	0.44	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
15	1137	0.27	Terpinene-1-ol
16	1177	23.89	Terpinene-4-ol
17	1189	0.26	α -Terpineol
18	1523	0.08	β -Sesquiphellandrene
19	1662	1.36	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-14 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S14

ตารางผนวกที่ 1-14 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S14 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

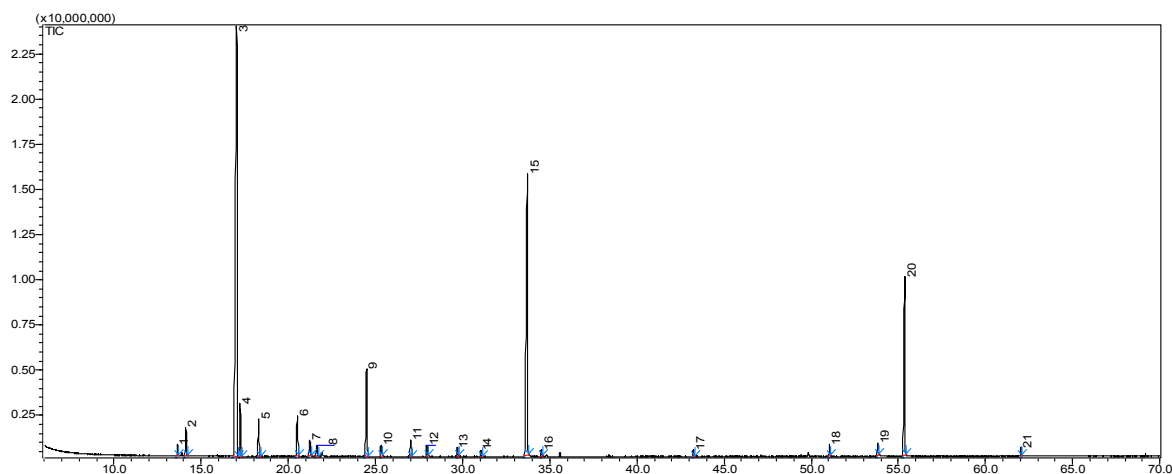
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.41	α -Thujene
2	939	1.35	α -Pinene
3	976	30.99	Sabinene
4	980	2.60	β -Pinene
5	991	2.02	β -Myrcene
6	1018	2.91	α -Terpinene
7	1023	1.27	m-Cymene
8	1031	0.75	Limonene
9	1062	6.56	γ -Terpinene
10	1068	0.37	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	1.06	Terpinolene
12	1097	0.38	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.52	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1137	0.30	Terpinene-1-ol
15	1177	28.64	Terpinene-4-ol
16	1189	0.44	α -Terpineol
17	1194	0.30	Myrtenol
18	1352	0.30	β -Terpinyl acetate
19	1495	0.23	Zingiberene
20	1523	0.96	β -Sesquiphellandrene
21	1612	0.72	(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene
22	1662	15.47	DMPBD
23	-	1.34	4-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)but-1,3-diene



ภาพผนวกที่ 1-15 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S15

ตารางผนวกที่ 1-15 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S15 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

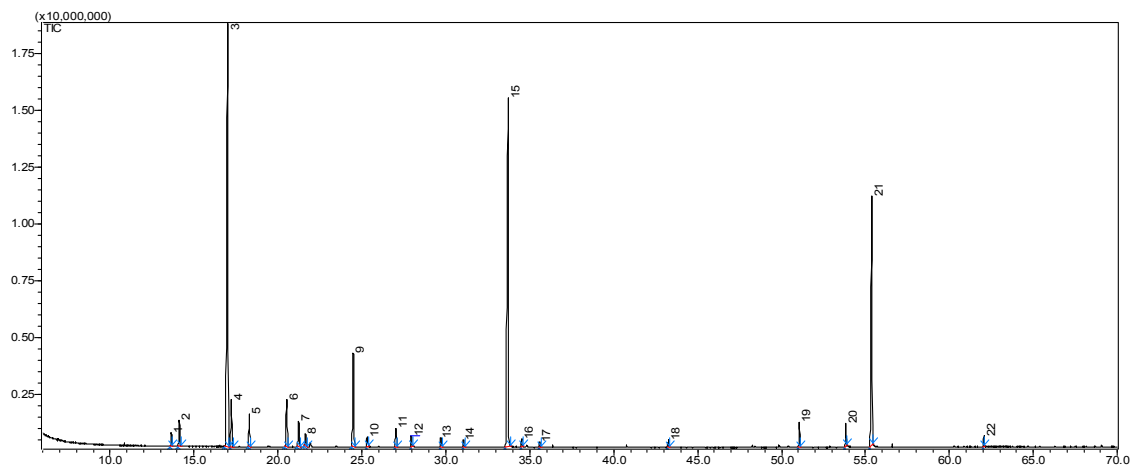
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.44	α -Thujene
2	939	1.52	α -Pinene
3	976	35.39	Sabinene
4	980	3.68	β -Pinene
5	991	2.24	β -Myrcene
6	1018	2.21	α -Terpinene
7	1023	0.68	m-Cymene
8	1031	0.79	Limonene
9	1062	4.65	γ -Terpinene
10	1068	0.70	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	0.77	Terpinolene
12	1097	0.71	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.36	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1177	19.15	Terpinen-4-ol
15	1189	0.25	α -Terpineol
16	1352	0.28	β -Terpinyl acetate
17	1523	0.93	β -Sesquiphellandrene
18	1612	0.75	(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene
19	1662	13.76	DMPBD
20	-	0.17	Unknown
21	-	1.27	4-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)but-1,3-diene



ภาพผนวกที่ 1-16 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S16

ตารางผนวกที่ 1-16 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S16 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

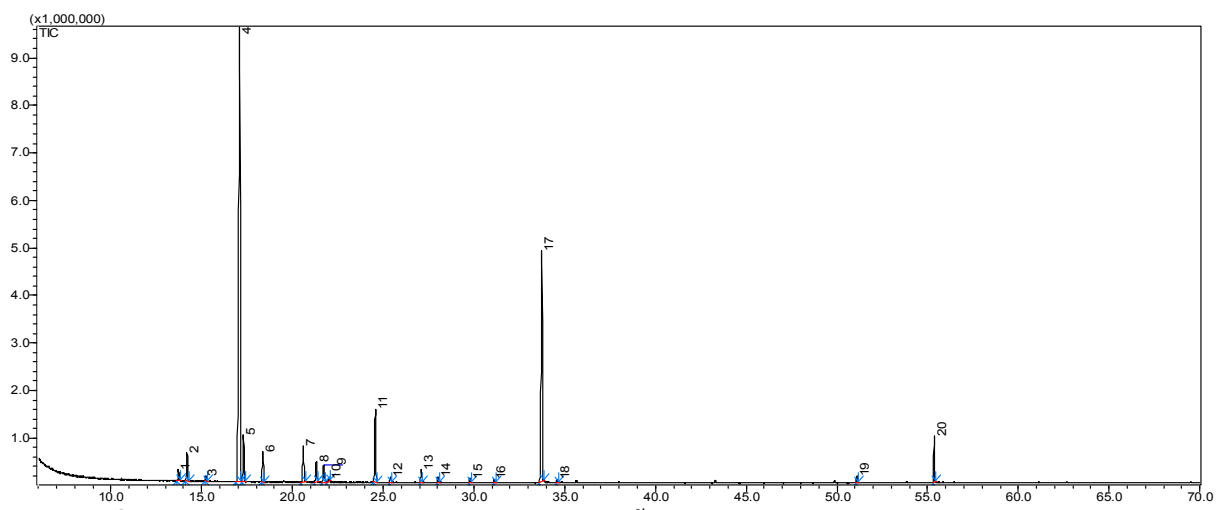
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.60	α -Thujene
2	939	1.56	α -Pinene
3	976	41.10	Sabinene
4	980	2.91	β -Pinene
5	991	2.29	β -Myrcene
6	1018	2.75	α -Terpinene
7	1023	1.07	m-Cymene
8	1031	0.80	Limonene
9	1062	6.01	γ -Terpinene
10	1068	0.70	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	1.02	Terpinolene
12	1097	0.64	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.51	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1137	0.37	Terpinen-1-ol
15	1177	24.31	Terpinen-4-ol
16	1189	0.36	α -Terpineol
17	1352	0.31	β -Terpinyl acetate
18	1523	0.55	β -Sesquiphellandrene
19	1612	0.55	(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene
20	1662	11.27	DMPBD
21	-	0.32	4-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)but-1,3-diene



ภาพผนวกที่ 1-17 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S17

ตารางผนวกที่ 1-17 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S17 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

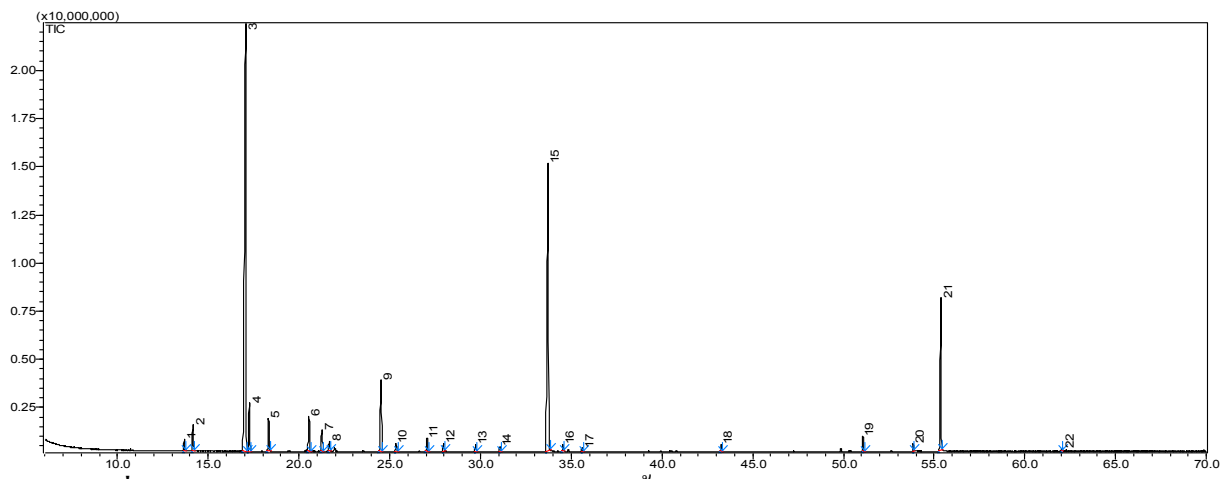
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.69	α -Thujene
2	939	1.35	α -Pinene
3	976	31.69	Sabinene
4	980	2.60	β -Pinene
5	991	1.90	β -Myrcene
6	1018	2.99	α -Terpinene
7	1023	1.64	m-Cymene
8	1031	0.81	β -Phellandrene
9	1062	6.17	γ -Terpinene
10	1068	0.59	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	1.04	Terpinolene
12	1097	0.62	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.55	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1137	0.36	Terpinene-1-ol
15	1177	28.07	Terpinene-4-ol
16	1189	0.35	α -Terpineol
17	1194	0.22	Myrtenol
18	1352	0.30	β -tepinyl acetate
19	1523	1.03	β -Sesquiphellandrene
20	1612	0.92	(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene
21	1662	15.71	DMPBD
22	-	0.40	4-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)but-1,3-diene



ภาพผนวกที่ 1-18 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S18

ตารางผนวกที่ 1-18 ตารางองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S18 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

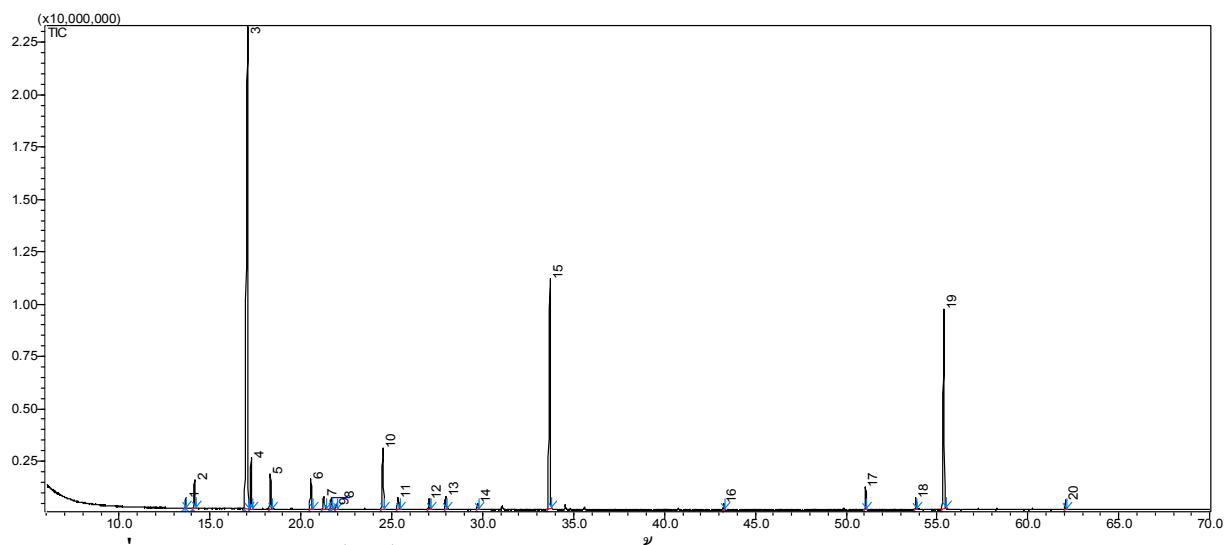
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.79	α -Thujene
2	939	2.17	α -Pinene
3	953	0.41	Camphene
4	976	49.12	Sabinene
5	980	3.59	β -Pinene
6	991	2.56	β -Myrcene
7	1018	3.51	α -Terpinene
8	1026	1.91	p-Cymene
9	1031	1.76	β -Phellandrene
10	1033	0.15	1,8-Cineole
11	1062	6.80	γ -Terpinene
12	1068	0.42	(Z)-Sabinene hydrate
13	1088	1.05	Terpinolene
14	1097	0.45	(E)-Sabinene hydrate
15	1122	0.35	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
16	1137	0.22	Terpinen-1-ol
17	1177	21.91	Terpinen-4-ol
18	1189	0.24	α -Terpineol
19	1523	0.36	β -Sesquiphellandrene
20	1662	2.37	DMPBD



ภาพผนวกที่ 1-19 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S19

ตารางผนวกที่ 1-19 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S19 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

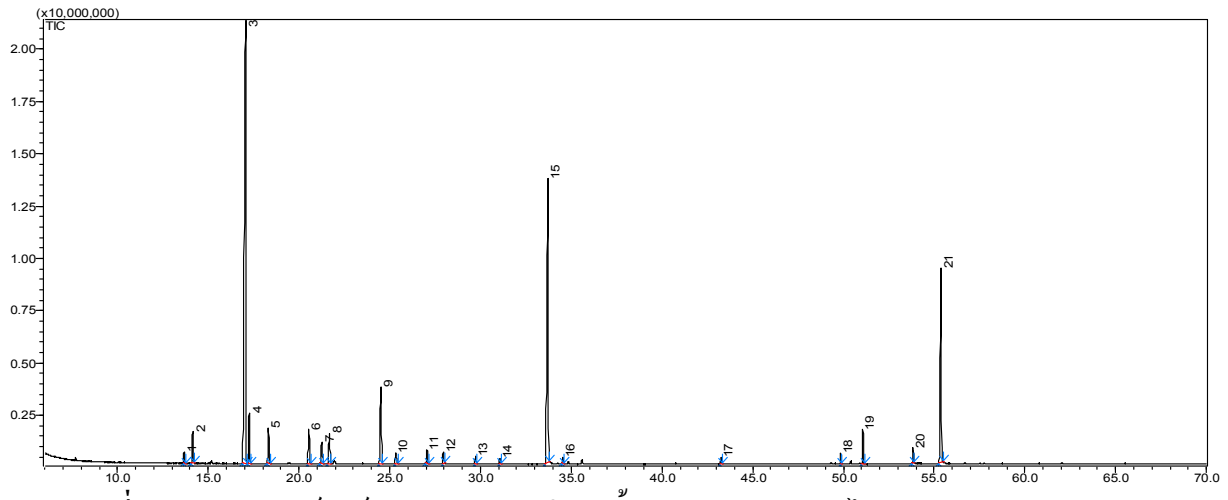
Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.70	α -Thujene
2	939	1.57	α -Pinene
3	976	42.50	Sabinene
4	980	2.98	β -Pinene
5	991	2.19	β -Myrcene
6	1018	2.56	α -Terpinene
7	1023	1.62	m-cymene
8	1031	0.70	Limonene
9	1062	5.44	γ -Terpinene
10	1068	0.57	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	0.86	Terpinolene
12	1097	0.52	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.47	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1137	0.34	Terpinen-1-ol
15	1177	25.94	Terpinen-4-ol
16	1189	0.35	α -Terpineol
17	1194	0.23	Myrtenol
18	1352	0.33	β -Terpinyl acetate
19	1523	0.70	β -Sesquiphellandrene
20	1612	0.34	(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene
21	1662	8.96	DMPBD
22	-	0.13	4-(2,4,5-trimethoxyphenyl)but-1,3-diene



ภาพผนวกที่ 1-20 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S20

ตารางผนวกที่ 1-20 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S20 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.53	α -Thujene
2	939	1.63	α -Pinene
3	976	47.99	Sabinene
4	980	2.92	β -Pinene
5	991	2.28	β -Myrcene
6	1018	2.19	α -Terpinene
7	1023	1.01	m-cymene
8	1031	0.78	Limonene
9	1033	0.28	1,8-Cineole
10	1062	4.34	γ -Terpinene
11	1068	0.81	(Z)-Sabinene hydrate
12	1088	0.73	Terpinolene
13	1097	0.79	(E)-Sabinene hydrate
14	1122	0.36	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
15	1177	17.81	Terpinen-4-ol
16	1352	0.30	β -Terpinyl acetate
17	1523	1.01	β -Sesquiphellandrene
18	1612	0.56	(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene
19	1662	13.24	DMPBD
20	-	2.89	4-(2,4,5-Trimethoxyphenyl)but-1,3-diene



ภาพผนวกที่ 21 การวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลตัวอย่าง S21

ตารางผนวกที่ 1-21 สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยไพลตัวอย่าง S21 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

Peak No.	KI	% peak area	Possible compound
1	931	0.59	α -Thujene
2	939	1.77	α -Pinene
3	976	40.15	Sabinene
4	980	2.78	β -Pinene
5	991	2.22	β -Myrcene
6	1018	2.34	α -Terpinene
7	1023	1.50	m-Cymene
8	1031	2.28	β -Phellandrene
9	1062	5.30	γ -Terpinene
10	1068	0.68	(Z)-Sabinene hydrate
11	1088	0.86	Terpinolene
12	1097	0.67	(E)-Sabinene hydrate
13	1122	0.46	(Z)-p-menth-2-en-1-ol
14	1137	0.30	Terpinen-1-ol
15	1177	23.48	Terpinen-4-ol
16	1189	0.29	α -Terpineol
17	1352	0.27	β -Terpinyl acetate
18	1483	0.43	α -Curcumene
19	-	1.51	β -Sesquiphellandrene
20	1612	0.62	(E)-1-(3',4'-Dimethoxyphenyl)but-1-ene
21	1662	11.50	DMPDB