b 114395

สัญญาเลขที่ 31 / 2550
รหัสโครงการวิจัย 5007050031

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การหาองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสจากภาคเหนือของประเทศไทย

Phytochemical Investigation of Propolis in the North of Thailand

โดย

นาย พหล แสนสมชัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
นางสาว มยุรมาศ แสงเงิน สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปี พ.ศ.2550

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยความกรุณาจากทุนมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ผู้ให้การสนับทุนแหล่งทุนทรัพย์ ในการวิจัยเพื่อความก้าวหน้าในสาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางในงาสุขภาพ ผู้เขียนขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ วันชัย ศิริชนะ อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง รองศาสตราจารย์ นสพ. เทิด เทศประทีป รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ศาสตราจารย์ สุจินต์ จินายนต์ ที่ปรึกษาอธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และรองศาสตราจารย์ พรรณวิภา กฤษฎาพงษ์ คณบดี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ที่ได้ให้การสนับสนุน และส่งเสริมการศึกษาวิจัยครั้งนี้ตลอดมา ขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัย เจ้าหน้ามหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ อาจารย์ มยุรมาศ แสงเงิน ดร. พยุงศักดิ์ ตันติไพบูลย์วงศ์ ดร. ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ และนางสาว อัญชลี เขื่อนเพชร ที่ได้ให้กำลัง การแนะแนวประกอบการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์เพื่อพัฒนาสถาบันการศึกษา และต่อผู้บริหารสถานศึกษา ตลอดจนหน่วยงานต่างๆ ที่มีบทบาทและหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง หากมีสิ่งใดผิดพลาด หรือข้อบกพร่องประการใด ผู้เขียนขอน้อมรับ และขออภัยไว้ ณ ที่นี่ด้วย

พหล แสนสมชัย หัวหน้าโครงการวิจัย
มยุรมาศ แสงเงิน ผู้ร่วมโครงการวิจัย
24 กรกฎาคม 2551

บทสรุปผู้บริหาร

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โพรโพลิส หมายถึงยางไม้จากพืชที่ผึ้งรวบรวมมา พอถึงรังมันจะให้ผึ้งงานตัวอื่นๆ เคี้ยวโดยปนไขผึ้งลงไปเล็กน้อย โพรโพลิสจะมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดแบคที่เรียและสิ่งที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผึ้งตัวอื่นๆ ในรัง ซึ่งทางการแพทย์ได้ทำการทดลองแล้ว ผลปรากฏว่าโพรโพลิสสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้จริง

ที่น่าสนใจประการหนึ่ง สารสกัดที่ได้จากโพรโพลิสสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อจากเชื้อโรคต่างๆ หรือเมื่อร่างกายเป็นโรคที่เรื้อรัง โพรโพลิสมีสารที่สำคัญที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง ต้านการเกิดการต้านภูมิคุ้มกันต่อตนเอง และการแพ้

จากการรายงานทางวิชาการยังไม่พบรายงานการศึกษา การตรวจเอกลักษณ์ของโพรโพลิสในประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสจากภาคเหนือของไทย

2 เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสจากภาคเหนือของไทย

3 เพื่อทดสอบการต้านจุลชีพจากสารสกัดของโพรโพลิส

4 เพื่อนำสารสกัดที่ได้จากโพรโพลิสมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

1.3 คำถามหลักของงานวิจัย

ไม่ควรพบสารที่ก่อให้เกิดการแพ้จากโพรโพลิสที่หาได้จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และพะเยา และโพรโพลิสที่หาได้จาก 3 แหล่งนี้สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพได้หรือไม่

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

โพรโพลิสที่ได้จากรังผึ้งเป็นสารเรซินที่ได้จากพืชสามารถพบได้อย่างแพร่หลายทั้งในยุโรป เอเชีย และอัฟริกา โดยมีฤทธิ์ต้านจุลชีพเช่น *Staphylococcus aureus, Salmonella albany, Bacillus subtilis, Escherichia coli* นอกจากนี้โพรโพลิสจากแบลกาเรียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Helicobacter pylori* สารโพรโพลิสเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดเช่น polyphenol (flavonoids, phenolic acid and their esters), terpenoids, and amino acids องค์ประกอบทางเคมีที่พบในโพรโพลิสขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และแหล่งที่ปลูกพืชที่ผึ้งไปเก็บมา องค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากยุโรป จีน อเมริกาใต้ และเอเชียมีความแตกต่างกันของ flavonoids และ phenolic acid ในทางตรงกันข้ามองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากบราซิลเป็นสารจำพวก

terpenoids และ prenylated derivatives ของ *p*-coumaric acids เนื่องจากยังไม่พบรายงานการศึกษาในประเทศไทยขององค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากภาคเหนือของประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อทำการทดลองเกี่ยวกับองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมี และวิเคราะห์สารที่ก่อให้เกิดการแพ้ที่ได้จากโพรโพลิสที่ได้จากภาคเหนือของประเทศไทย

ขอบเขตการวิจัย

1 ทางด้านเคมี

แยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบของโพรโพลิสให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทางโครมาโทรกราฟี จากนั้นวิเคราะห์ประเภทของสารสกัดหยาบของโพรโพลิสที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทสโกปีของสารสกัดที่แยกได้

2 การตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดโพรโพลิสตัวอย่างโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี ด้วยโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) และ โครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC)

3 การทดสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากโพรโพลิส

4 สรุปผลการทดลองเขียนรายงาน และ Manuscript 2 เดือน

2. ทฤษฎี และแนวคิด

2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมงานวิจัย

โพรโพลิสที่ได้จากรังผึ้งเป็นสารเรซินที่ได้จากพืชสามารถพบได้อย่างแพร่หลายทั้งในยุโรป เอเชีย และอัฟริกา โดยมีฤทธิ์ต้านจุลชีพเช่น *Staphylococcus aureus, Salmonella albany, Bacillus subtilis, Escherichia coli* นอกจากนี้โพรโพลิสจากแบลกาเรียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ*Helicobacter pylori* สารโพรโพลิสเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดเช่น polyphenol (flavonoids, phenolic acid and their esters), terpenoids, and amino acids องค์ประกอบทางเคมีที่พบในโพรโพลิสขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และแหล่งที่ปลูกพืชที่ผึ้งไปเก็บมา องค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากยุโรป จีน อเมริกาใต้ และเอเชียมีความแตกต่างกันของ flavonoids และ phenolic acid ในทางตรงกันข้ามองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากบราซิลเป็นสารจำพวก terpenoids และ prenylated derivatives ของ *p*-coumaric acids เนื่องจากยังไม่พบรายงานการศึกษาในประเทศไทยขององค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากภาคเหนือของประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อทำการ

ทดลองเกี่ยวกับองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมี และวิเคราะห์สารที่ก่อให้เกิดการแพ้ที่ได้จากโพรโพลิสที่ได้จากภาคเหนือของประเทศไทย

3. วิธีการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

1. ทางด้านเคมี

   แยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบของโพรโพลิสให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทางโครมาโทรกราฟี จากนั้นวิเคราะห์ประเภทของสารสกัดหยาบของโพรโพลิสที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทสโกปีของสารสกัดที่แยกได้

2. การตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดโพรโพลิสตัวอย่างโดยวิธีทางโครมาโตกราฟีด้วยโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) และ โครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC)

3. การทดสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากโพรโพลิส

4. สรุปผลการทดลองเขียนรายงาน และ Manuscript

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

โพรโพลิสจากจังหวัด ลำพูน พะเยา และเชียงใหม่

4. ผลการศึกษาวิจัย

การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพระหว่างสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสของทั้ง 3 จังหวัด กับสาร Negative control คือ น้ำกลั่น และ Positive control คือ Chloramphenicol พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพและเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.00±0.00 มิลลิเมตร และ 15.33±0.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 ไมกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus* ถ้าเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสแหล่งเดียวกัน แต่ความเข้มข้นต่างกัน สามารถบอกได้ดังนี้ โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.74±1.00 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16.38±0.89 มิลลิเมตร โดยสารสกัดหยาบเอธานอล

ของโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus* ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16.02±1.10 มิลลิเมตร ดังนั้นสารสกัดหยาบโพรโพลิสของจังหวัดพะเยาที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้สูงสุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด

สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *E. coli* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.74±0.93 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *E. coli* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง15.38±0.67 มิลลิเมตร โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *E. coli* ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.88±0.92 มิลลิเมตร ดังนั้นสารสกัดหยาบโพรโพลิสของจังหวัดเชียงใหม่ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้สูงสุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด

สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 ไมกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *C. albicans* ถ้าเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสแหล่งเดียวกัน แต่ความเข้มข้นต่างกัน สามารถบอกได้ดังนี้ โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *C. albicans* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13.84±1.00 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *C. albicans* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14.34±1.14 มิลลิเมตร โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *C. albicans* ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13.62±0.65 มิลลิเมตร ดังนั้นสารสกัดหยาบโพรโพลิสของจังหวัดพะเยาที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้สูงสุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด

ในการหาปริมาณสารสำคัญ คือ Caffeic acid ที่พบในโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูนซึ่งเป็นสารที่แยกมาจากโพรโพลิส แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง จากนั้นนำมาเปรียบเทียบสารมาตรฐาน Caffeic acid เพื่อยืนยันด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พบปริมาณสาร Caffeic acid ในโพรโพลิส ณ Retention time 4.418 เป็นปริมาณ 0.10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร โพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา พบปริมาณสาร Caffeic acid ในโพรโพลิส ณ Retention time 4.515 เป็นปริมาณ 1.00 ไมโครกรัม ต่อ

มิลลิลิตร และโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ พบปริมาณสาร Caffeic acid ในโพรโพลิส ณ Retention time 4.430 เป็นปริมาณ 2.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

5. สรุปและข้อเสนอแนะ

สารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ โดยพบว่า สารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพรลิสความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus E.coli* และ *C. albicans* จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ ณ ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus E.coli* และ *C. albicans*

จากการทดลองเพื่อหาสารสำคัญ Caffeic acid ที่เป็นสารที่สามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ โดยการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง และ เทคนิค HPLC พบว่าสาร Caffeic acid ที่เป็นสารที่ก่อให้เกิดการแพ้ โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน ณ fraction L5 ปริมาณน้อยที่สุด คือ 0.1 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา ณ fraction P9 เป็นปริมาณ 1.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิตร และสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ ณ fraction CH9 เป็นปริมาณมากที่สุด คือ 2.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นจึงสามารถบอกได้ว่าปริมาณสาระสำคัญที่พบจากสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ มีความเข้มข้นในปริมาณน้อย จึงสามารถใช้สารสกัดโพรโพลิส เพื่อเป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอางได้

6. เอกสารอ้างอิง

1. Kumazawa S., Hamasaka T. and Nakayama T. (2003). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, **84**(3), 329-339.
2. Choi Y. M., Noh D.O., Cho S. Y., Suh H. J., Kim K. M. and Kim J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *L.W.T.*, **39**, 756-761.
3. Basim E., Basim H. and Ozcan M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacteria pathogens. *J. F. Engi.*, **77**, 992–996.
4. Bankova V. (2005) Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM*, **2 (1)**, 29-32.

5. Kumazawa S., Goto H., Hamasaka T., Fukumoto S., Fujimoto T. and Nakayama T. (2004). A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Biosci., Biotech., and Biochem.*, **68**(1), 260-262.

6. Kumazawa S., Hayashi K., Kajiya K., Ishii T., Hamasaka T. and Nakayama T. (2002). Studies on the constituents of Uruguayan propolis. *J. Agri. and F. Chem.*, **50**(17), 4777-4782.

7. Hamasaka T., Kumazawa S., Fujimoto T. and Nakayama T. (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *F. Sci. and Tech. Res.*, **10**(1), 86-92.

8. Boyanov L., Derejian S., Koumanova R., Katsarov N., Gergova G., Mitov I., Nikolov R. and Krastev Z. (2003). Inhibition of Helicobacter pylori growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *J. Med. Microbio.*, **52**, 417–419

9. Martos I., Cossentini M., Ferreres F. and Tomás-Barberán F. A. (1997). Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. *J. Agric. F. Chem.*, **45** (8), 2824 - 2829.

10. Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Kenzevic S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.*, **54**, 65-72.

11. Shouqin Z., Jun X. and Changzheng W. (2005). Effect of High Hydrostatic Pressure on Extraction of Flavonoids in Propolis. *F. Sci. and Tech. Inter.*, Vol. 11, No. 3, 213-216.

12. Maciejewicz W. (2001). Isolation of Flavonoid Aglycones from Propolis by a Column Chromatography Method and Their Identification by GC-MS and TLC Methods. J. *L. Chrom. & Related Tech.*, 24(8), 1171-1179.

13. Volpi N. (2004). Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. 25(12):1872-8.

14. Repolles C, Herrero-Martinez JM, Rafols C. (2006). Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *J Chromatogr A.*, **27**; 1131(1-2):51-7.

15. Christov R, Trusheva B, Popova M, Bankova V, Bertrand M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res.*, **20**(6), 531-6.

ชื่อโครงการ การหาองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสจากภาคเหนือของประเทศไทย

สมาชิกโครงการ พหล แสนสมชัย (สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
มยุรมาศ แสงเงิน (สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

บทคัดย่อ

โพรโพลิส หมายถึงยางไม้จากพืชที่ผึ้งรวบรวมมา องค์ประกอบทางเคมีที่พบในโพรโพลิสขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และแหล่งที่ปลูกพืชที่ผึ้งไปเก็บมา องค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากยุโรป จีน อเมริกาใต้ และเอเชียมีความแตกต่างกันของ flavonoids และ phenolic acid ในทางตรงกันข้ามองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากบราซิลเป็นสารจำพวก terpenoids และ prenylated derivatives การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อการตรวจเอกลักษณ์ของโพรโพลิสในประเทศไทย ศึกษาเพื่อทำการทดลองเกี่ยวกับองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมี และวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ที่ได้จากโพรโพลิสที่ได้จากภาคเหนือของประเทศไทย

เชื้อจุลชีพ *S. aureus*, *E. coli*, และ *C. albicans* ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อหาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ จากสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ โดยวัดบริเวณที่ถูกยับยั้ง จากนั้นวิเคราะห์หาสารสำคัญที่ก่อให้เกิดการแพ้จากสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง และเทคนิค High Performance Liquid Chromatography

สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ ณ ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus*, *E. coli*, และ *C. albicans* อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเปล่า ($p< 0.05$) โดยสารสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ ณ ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus*, *E. coli*, และ *C. albicans* เมื่อนำไปทดสอบหาสารสำคัญที่ก่อให้เกิดการแพ้, caffeic acid, พบว่าสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ มีปริมาณสาร Caffeic acid ในปริมาณที่น้อยมาก จึงสรุปว่าในการศึกษาครั้งนี้สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus*, *E. coli*, และ *C. albicans* และไม่พบสารที่ก่อให้เกิดการแพ้, caffeic acid ดังนั้นสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่จึงน่าจะนำมาเป็นองค์ประกอบในสูตรตำรับเครื่องสำอางได้

Title Phytochemical Investigation of Propolis in the North of Thailand

Member Pahol Sansomchai (School of Cosmetic Science)

Mayuramas Sang-ngern (School of Cosmetic Science)

Abstract

Propolis is a wax-like resinous substance that bees collect from tree. The chemical compositions of propolis are various up to the kind of plants and source of plants that bee are collected. Chemical composition of propolis from Europe China South-Africa and Asia are different in flavonoids and phenolic acid composition. In the opposite way, chemical compositions of propolis from Brazil are kind of terpenoids and prenylated derivatives. This study aimed to identify the unique characteristic of Thai propolis and analyze the caffeic acid in propolis from the North of Thailand.

The microorganism *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, and *C. albicans* were measured for antimicrobial activity, following exposure with 3 kinds of the ethanol extract of propolis from Lumphun, Phayou and Chiang mai by using dish clear zone. Then, the active compound that cause of irritation in propolis from Lumphun, Phayou and Chiang mai are analyzed by thin layer chromatography technique and high performance chromatography technique.

Ethanol crude extracts of propolis from Lumphun, Phayou and Chiang mai at the concentration 0.10 g/mL, 0.50 g/mL, and 1.00 μg/mL were significantly inhibit *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, and *C. albicans* when compared to untreated with distilled water ($p<0.05$). Ethanol crude extracts of propolis from Lumphun, Phayou and Chiang mai at the concentration 0.50 g/mL show the most effectively in the inhibition of *S. aureus*, *E. coli*, and *C. albicans*. The experiment to find out the active compound that cause of irritation, Caffeic acid, found that ethanol crude extracts of propolis from Lumphun, Phayou and Chiang mai found in a little amount. It can be concluded that, Ethanol crude extracts of propolis from Lumphun, Phayou and Chiang mai showed ability in the inhibition of *S. aureus*, *E. coli*, and *C. albicans* and not found the compound that cause of irritation, caffeic acid. So Ethanol crude extracts of propolis from Lumphun, Phayou and Chiang mai might be composition in cosmetic formula.

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		**ข**
บทสรุปผู้บริหาร		**ค**
บทคัดย่อภาษาไทย		**ฆ**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		**ญ**
บทที่ 1 บทนำ		**1**
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
1.3	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	1
1.4	คำถามหลักของงานวิจัย	2
1.5	ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงงานวิจัย	2
1.6	ขอบเขตการวิจัย	2
1.7	ระยะเวลาในการดำเนินงาน	3
1.8	นิยามศัพท์	3
1.9	คณะนักวิจัยและที่ปรึกษางานวิจัย	3
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		**5**
2.1	แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมงานวิจัย	5
2.2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย		**7**
3.1	ระเบียบวิธีการวิจัย	7
3.2	ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	7
3.3	กิจกรรมวิจัย ขั้นตอนการดำเนินงาน การวิเคราะห์ทดสอบ การติดตามผล	7
3.4	สถิติที่ใช้ในการวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย		**9**
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ		**20**

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1-1	ระยะเวลาในการดำเนินงาน	3
ตารางที่ 4-1	แสดงผลการยับยั้งจุลชีพ *S. aureus* ด้วยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากแหล่งต่างๆ และสารเปรียบเทียบ	10
ตารางที่ 4-2	แสดงผลการยับยั้งจุลชีพ *E. coli* ด้วยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากแหล่งต่างๆ และสารเปรียบเทียบ	12
ตารางที่ 4-3	แสดงผลการยับยั้งจุลชีพ *C. albicans* ด้วยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากแหล่งต่างๆ และสารเปรียบเทียบ	14
ตารางที่ 4-4	แสดงปริมาณสาร Caffeic acid และ Retention time ของ Caffeic acid	17

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4-1	The Growth Curve of Microorganism	9
ภาพที่ 4-2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*	10
ภาพที่ 4-3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*	12
ภาพที่ 4-4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans*	14
ภาพที่ 4-5	กราฟมาตรฐานของ Caffeic acid	16
ภาพที่ 4-6	กราฟมาตรฐานของ Caffeic acid	16
ภาพที่ 4-7	กราฟแสดงปริมาณ Caffeic acid ที่พบจากโพรโพลิสตัวอย่างจากจังหวัดลำพูน	18
ภาพที่ 4-8	กราฟแสดงปริมาณ Caffeic acid ที่พบจากโพรโพลิสตัวอย่างจากจังหวัดพะเยา	18
ภาพที่ 4-9	กราฟแสดงปริมาณ Caffeic acid ที่พบจากโพรโพลิสตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่	19

บรรณานุกรม

1. Kumazawa S., Hamasaka T. and Nakayama T. (2003). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, **84**(3), 329-339.
2. Choi Y. M., Noh D.O., Cho S. Y., Suh H. J., Kim K. M. and Kim J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *L.W.T.*, **39**, 756-761.
3. Basim E., Basim H. and Ozcan M. (2006). Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacteria pathogens. *J. F. Engi.*, **77**, 992–996.
4. Bankova V. (2005) Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM*, **2 (1)**, 29-32.
5. Kumazawa S., Goto H., Hamasaka T., Fukumoto S., Fujimoto T. and Nakayama T. (2004). A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Biosci., Biotech., and Biochem.*, **68**(1), 260-262.
6. Kumazawa S., Hayashi K., Kajiya K., Ishii T., Hamasaka T. and Nakayama T. (2002). Studies on the constituents of Uruguayan propolis. *J. Agri. and F. Chem.*, **50**(17), 4777-4782.
7. Hamasaka T., Kumazawa S., Fujimoto T. and Nakayama T. (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *F. Sci. and Tech. Res.*, **10**(1), 86-92.
8. Boyanov L., Derejian S., Koumanova R., Katsarov N., Gergova G., Mitov I., Nikolov R. and Krastev Z. (2003). Inhibition of Helicobacter pylori growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *J. Med. Microbio.*, **52**, 417–419
9. Martos I., Cossentini M., Ferreres F. and Tomás-Barberán F. A. (1997). Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. *J. Agric. F. Chem.*, **45** (8), 2824 -2829.
10. Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. and Vladimir-Kenzevic S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.*, **54**, 65-72.
11. Shouqin Z., Jun X. and Changzheng W. (2005). Effect of High Hydrostatic Pressure on Extraction of Flavonoids in Propolis. *F. Sci. and Tech. Inter.*, Vol. 11, No. 3, 213-216.
12. Maciejewicz W. (2001). Isolation of Flavonoid Aglycones from Propolis by a Column Chromatography Method and Their Identification by GC-MS and TLC Methods. J. *L. Chrom. & Related Tech.*, 24(8), 1171-1179.
13. Volpi N. (2004). Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. 25(12):1872-8.

14. Repolles C, Herrero-Martinez JM, Rafols C. (2006). Analysis of prominent flavonoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *J Chromatogr A.*, **27**; 1131(1-2):51-7.

15. Christov R, Trusheva B, Popova M, Bankova V, Bertrand M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res.*, **20**(6), 531-6.

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โพรโพลิส หมายถึงยางไม้จากพืชที่ผึ้งรวบรวมมา พอถึงรังมันจะให้ผึ้งงานตัวอื่นๆ เคี้ยวโดยปนไขผึ้งลงไปเล็กน้อย โพรโพลิสจะมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดแบคที่เรียและสิ่งที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผึ้งตัวอื่นๆ ในรัง ซึ่งทางการแพทย์ได้ทำการทดลองแล้ว ผลปรากฏว่าโพรโพลิส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้จริง

ที่น่าสนใจประการหนึ่ง สารสกัดที่ได้จากโพรโพลิสสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อจากเชื้อโรคต่างๆ หรือเมื่อร่างกายเป็นโรคที่เรื้อรัง โพรโพลิสมีสารที่สำคัญที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง ต้านการเกิดการต้านภูมิคุ้มกันต่อตนเอง และการแพ้

จากการรายงานทางวิชาการยังไม่พบรายงานการศึกษา การตรวจเอกลักษณ์ของโพรโพลิสในประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อทำการทดลองเกี่ยวกับองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมี และวิเคราะห์สารที่ก่อให้เกิดการแพ้ที่ได้จากโพรโพลิสที่ได้จากภาคเหนือของประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสจากภาคเหนือของไทย

2 เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสจากภาคเหนือของไทย

3 เพื่อทดสอบการต้านจุลชีพจากสารสกัดของโพรโพลิส

4 เพื่อนำสารสกัดที่ได้จากโพรโพลิสมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการใช้ประโยชน์จากโพรโพลิสไทย เพื่อเพิ่มมูลค่าของพืชท้องถิ่น
2. น่าจะไม่พบสารที่เป็นพิษจากโพรโพลิสจากภาคเหนือของไทย เพื่อลดการนำเข้าสาระสำคัญจากต่างประเทศ
3. ในการผลิตและการแปรรูป จะทราบถึงคุณภาพของโพรโพลิสที่พบในภาคเหนือของไทย
4. ผู้บริโภคหรือผู้ป่วย มีทางเลือกในการเลือกใช้สมุนไพรไทย
5. นักศึกษาสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวันได้
6. สามารถเผยแผ่ความรู้สู่ชุมชน

1.4 คำถามหลักของงานวิจัย

ไม่ควรพบสารที่ก่อให้เกิดการแพ้จากโพรโพลิสที่หาได้จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และพะเยา และโพรโพลิสที่หาได้จาก 3 แหล่งนี้สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพได้หรือไม่

1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

โพรโพลิสที่ได้จากรังผึ้งเป็นสารเรซินที่ได้จากพืชสามารถพบได้อย่างแพร่หลายทั้งในยุโรป เอเชีย และอัฟริกา โดยมีฤทธิ์ต้านจุลชีพเช่น *Staphylococcus aureus, Salmonella albany, Bacillus subtilis, Escherichia coli* นอกจากนี้โพรโพลิสจากแบลกาเรียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ*Helicobacter pylori* สารโพรโพลิสเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดเช่น polyphenol (flavonoids, phenolic acid and their esters), terpenoids, and amino acids องค์ประกอบทางเคมีที่พบในโพรโพลิสขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และแหล่งที่ปลูกพืชที่ผึ้งไปเก็บมา องค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากยุโรป จีน อเมริกาใต้ และเอเชียมีความแตกต่างกันของ flavonoids และ phenolic acid ในทางตรงกันข้ามองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากบราซิลเป็นสารจำพวก terpenoids และ prenylated derivatives ของ *p*-coumaric acids เนื่องจากยังไม่พบรายงานการศึกษาในประเทศไทยขององค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสทีได้จากภาคเหนือของประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากภาคเหนือของประเทศไทย

1.6 ขอบเขตการวิจัย

1. ทางด้านเคมี

   แยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบของโพรโพลิสให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทางโครมาโทรก์ราฟี จากนั้นวิเคราะห์ประเภทของสารสกัดหยาบของโพรโพลิสที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทสโกปีของสารสกัดที่แยกได้

2. การตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดโพรโพลิสตัวอย่างโดยวิธีทางโครมาโตกราฟีด้วยโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) และ โครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC)

3. การทดสอบสมบัติการต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากโพรโพลิส

4. สรุปผลการทดลองเขียนรายงาน และ Manuscript

1.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ตารางที่ 1-1 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ขั้นตอน	เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. เก็บตัวอย่าง สกัดด้วยตัวทำละลาย	←	—	—	—	—	→						
2. ตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดโพรโพลิสที่ได้		←	—	—	—	—	—	—	—	—	→	
3. ทดสอบการต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากโพรโพลิส							←	—	—	—	→	
4. สรุปผลการทดลองเขียนรายงาน และ Manuscript											←	→

1.8 นิยามศัพท์

โพรโพลิส หมายถึงยางไม้จากพืชที่ผึ้งรวบรวมมา พอถึงรังมันจะให้ผึ้งงานตัวอื่นๆ เคี้ยวโดยปนไขผึ้งลงไปเล็กน้อย โพรโพลิสจะมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดแบคทีเรียและสิ่งที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผึ้งตัวอื่นๆ ในรัง ซึ่งทางการแพทย์ได้ทำการทดลองแล้ว ผลปรากฏว่าโพรโพลิส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้จริง

สารโพรโพลิสเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดเช่น polyphenol (flavonoids, phenolic acid and their esters), terpenoids, and amino acids องค์ประกอบทางเคมีที่พบในโพรโพลิสขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และแหล่งที่ปลูกพืชที่ผึ้งไปเก็บมา องค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากยุโรป จีน อเมริกาใต้ และเอเชียมีความแตกต่างกันของ flavonoids และ phenolic acid

1.9 คณะนักวิจัยและที่ปรึกษางานวิจัย

1.9.1 ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณวิภา กฤษฎาพงษ์

Assoc. Prof. Panvipa Krisdaphong, Ph.D.

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ คุณวุฒิ Ph.D.

สถานที่ติดต่อ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
333 ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์ 0-5391-6833
โทรสาร 0-5391-6831
E-mail: panvipa@mfu.ac.th

1.9.2 หัวหน้าโครงการวิจัย (80%)

นาย พหล แสนสมชัย
ตำแหน่ง อาจารย์ คุณวุฒิ M.Sc. (Biochemistry)
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ Natural Products, Antioxidant, Phagocytosis, Immunity
สถานที่ติดต่อ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
333 ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์ 0-5391-6833
โทรสาร 0-5391-6831
E-mail: lyw11@hotmail.com

1.9.3 ผู้ร่วมโครงการวิจัย (20%)

นางสาว มยุรมาศ แสงเงิน
ตำแหน่ง อาจารย์ คุณวุฒิ M.Sc. (Chemistry)
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ Natural Products, Organic chemistry
สถานที่ติดต่อ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
333 ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์ 0-5391-6833
โทรสาร 0-5391-6831
E-mail: s_mayuramas@hotmail.com

บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมงานวิจัย

โพรโพลิสที่ได้จากรังผึ้งเป็นสารเรซินที่ได้จากพืชสามารถพบได้อย่างแพร่หลายทั้งในยุโรป เอเชีย และอัฟริกา โดยมีฤทธิ์ต้านจุลชีพเช่น *Staphylococcus aureus, Salmonella albany, Bacillus subtilis, Escherichia coli* นอกจากนี้โพรโพลิสจากแบลกาเรียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ*Helicobacter pylori* สารโพรโพลิสเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดเช่น polyphenol (flavonoids, phenolic acid and their esters), terpenoids, and amino acids องค์ประกอบทางเคมีที่พบในโพรโพลิสขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และแหล่งที่ปลูกพืชที่ผึ้งไปเก็บมา องค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากยุโรป จีน อเมริกาใต้ และเอเชียมีความแตกต่างกันของ flavonoids และ phenolic acid ในทางตรงกันข้ามองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากบราซิลเป็นสารจำพวก terpenoids และ prenylated derivatives ของ *p*-coumaric acids เนื่องจากยังไม่พบรายงานการศึกษาในประเทศไทยขององค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสทีได้จากภาคเหนือของประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโพรโพลิสที่ได้จากภาคเหนือของประเทศไทย

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การที่ผึ้งจะผลิตโพรโพลิสนั้น ตอนเริ่มต้น ผึ้งจะรวบรวมวัสดุที่เรียกว่า เรซิน มาจากต้นไม้บางชนิดนำกลับมาทำเป็นโพรโพลิส โดยเติมน้ำลายของพวกมันไปในเรซินและนำกลับรัง ด้วยถุงชนิดพิเศษที่ขาของผึ้งวิธีดังกล่าวทำให้วัสดุดังกล่าวไม่มีจุลินทรีย์ติดอยู่ และไม่เป็นอันตรายต่อตัวของผึ้งเอง วิธีดังกล่าวคล้ายกับการทำมัมมี่ ผึ้งจะเก็บสารโพรโพลิสเพื่ออุดช่องว่างที่มีในรังของผึ้ง สารโพรโพลิสที่ได้จากเปลือกไม้ ตาหรือยอดอ่อนของใบไม้ สามารถพบได้โดยทั่วไป แต่สารโพรโพลิสที่ได้จากพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศที่เย็นจะเป็นที่นิยมมากว่าแถบอื่น

สารโพรโพลิสที่ได้จากรังผึ้งมักประกอบไปด้วยเรซิน ซึ่งสารจำพวกโพลีฟีนอลประมาณร้อยละ 50 ไขผึ้งร้อยละ 30 น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 10 เกสรดอกไม้ร้อยละ 5 และสารอินทรีย์สารอนินทรีย์ร้อยละ 5 องค์ประกอบที่ได้จากโพรโพลิสนั้นมีความซับซ้อนมาก สารสำคัญกว่า 200 ชนิดได้ถูกค้นพบจากโพรโพลิสจากโครเอเชีย ญี่ปุ่น แบลกาเรีย เกาหลี ตุรกี ฮังการี ชิลี โดยสมบัติ

ทางชีวภาพของสารที่พบได้ในโพรโพลิสนั้นมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารโพลีฟีนอล สารฟลาโวนอยด์ aromatic acids, phenolic acid ester, triterpenes, lignans ได้มีรายงานว่าสารจำพวกนี้มีฤทธิ์เป็น bactericidal, fungicidal, antiviral, antiprotozoal, antioxidant, anti-inflammatory และ immunomodulatory activities

สารฟลาโวนอยด์เป็นสารหลักในกลุ่มของสารประกอบของฟีนอล ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพของโพรโพลิส สารฟลาโวนอด์ที่พบในโพรโพลิสเป็นสารกลุ่ม aglycones ซึ่งปราศจากน้ำตาล สารกลุ่มนี้จึงสามารถเรียกได้อีกอย่างว่า lipophilic flavonoids ซึ่งสามารถออกได้เป็น flavanones, flavones, flavonols, dihydroflavonols และ chalcones ความเข้มข้นของสารฟลาโวนอยด์ที่พบในโพรโพลิสจะขึ้นอยู่กับสภาพภูมิประเทศ และสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าสารฟลาโวนอยด์นี้มีคุณสมบัติทางชีวภาพมากมาย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบของสาระสำคัญที่ได้จากโพรโพลิสจากภาคเหนือของประเทศไทย

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

1. ทางด้านเคมี

แยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทางโครมาโทรกราฟี จากนั้นวิเคราะห์ประเภทของสารสกัดหยาบที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทสโกปีของสารสกัดที่แยกได้

วิธีการดำเนินงาน

1. เตรียมตัวอย่างพืช
2. แยกสกัดด้วยตัวทำละลายเอธานอลอย่างละ 2 ครั้งๆ
3. ระเหยเอาตัวทำละลายออก
4. แบ่งสารสกัดที่ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ
5. วิเคราะห์ประเภทของสารสกัดที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทสโกปี

2. การตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดพืชตัวอย่างโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี ด้วยโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) และ โครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC)

3. การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ (*Staphylococcus aureus, Candida albicans* และ *Eschericia coli*) โดยตรวจวัดจำนวนเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sabouraud dextrose agar) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับสารสกัดที่สกัดจากตัวทำลายทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

โพรโพลิสจาก เชียงใหม่ ลำพูน และพะเยา

3.3 กิจกรรมวิจัย ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย การวิเคราะห์ทดสอบ การติดตามผล

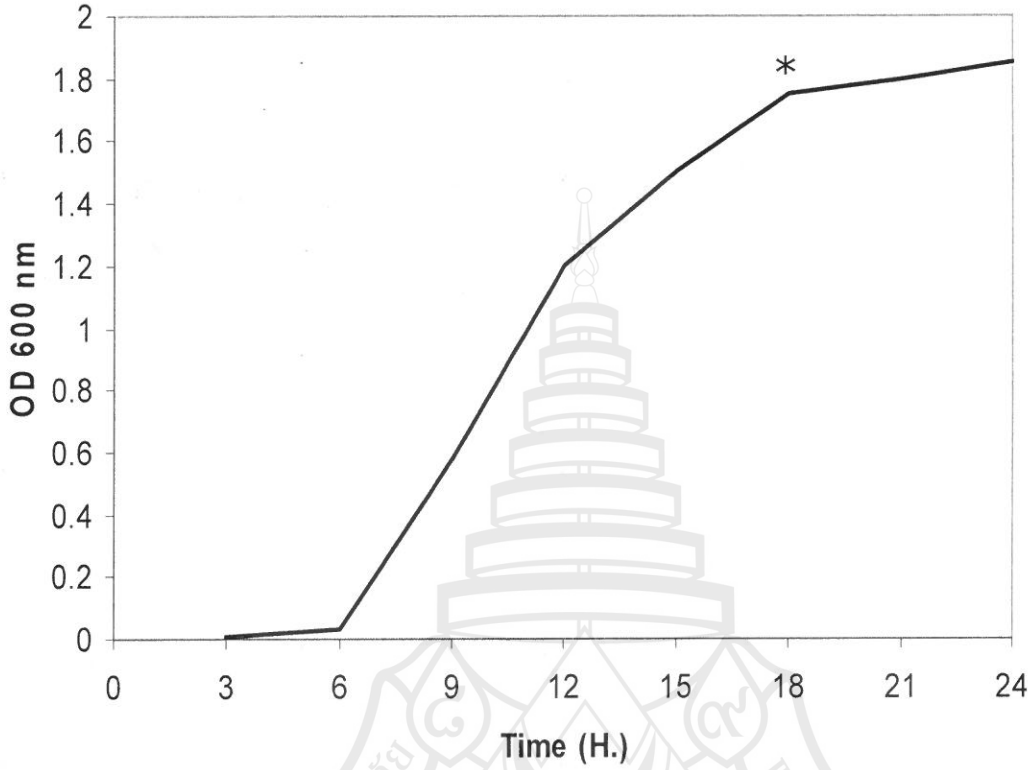
1. เก็บตัวอย่างโพรโพลิส สกัดด้วยตัวทำละลาย 6 เดือน
2. ตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดโพรโพลิสตัวอย่างโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี ด้วยโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) และ โครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC) 10 เดือน
3. สมบัติการต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากโพรโพลิส 5 เดือน

4. สรุปผลการทดลองเขียนรายงาน และ Manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 2 เดือน

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

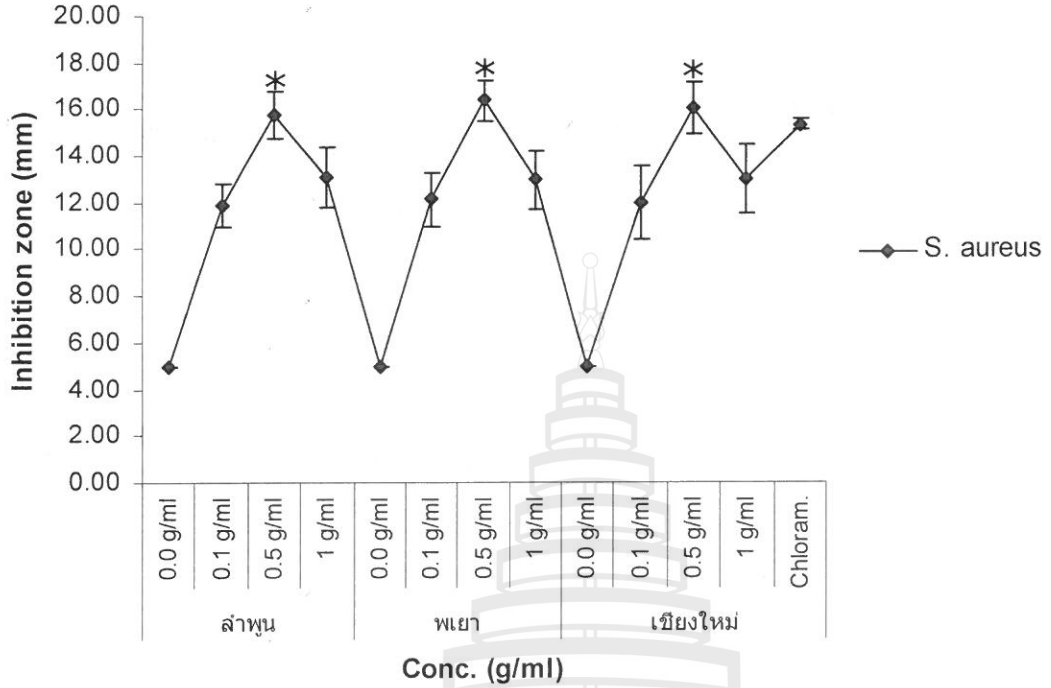
one-way ANOVA ค่า $p < 0.05$

บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย



ภาพที่ 4-1 The Growth Curve of Microorganism.

จากภาพที่ 4-1 เป็นการวัดค่าการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่สุดของเชื้อจุลชีพ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าในช่วง 0 – 6 ชั่วโมง เชื้อจุลชีพมีการเจริญเติบโตในช่วง Lag Phase ในช่วงชั่วโมงที่ 6 -18 เชื้อจุลชีพมีการเจริญเติบโตในช่วง Log Phase และในช่วงตั้งแต่ 18-24 ชั่วโมง เชื้อจุลชีพมีการเจริญเติบโตในช่วง Stationary Phase ดังนั้น ช่วงเวลาที่เชื้อจุลชีพมีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ ชั่วโมงที่ 18 เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด จึงเลือกชั่วโมงดังกล่าวในการทดลองเลี้ยงเชื้อจุลชีพ



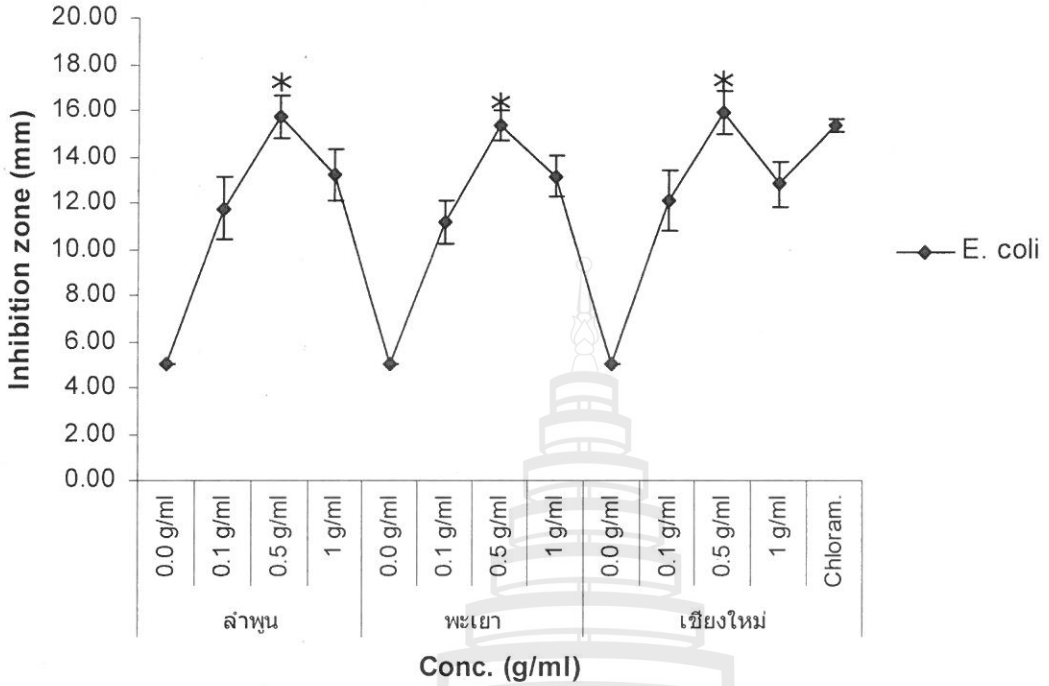
ภาพที่ 4-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*

ตารางที่ 4-1 แสดงผลการยับยั้งจุลชีพ *S. aureus* ด้วยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากแหล่งต่างๆ และสารเปรียบเทียบ

บริเวณ Inhibition zone (มม.) จากสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิส และสารเปรียบเทียบ			
S. aureus	ลำพูน	พะเยา	เชียงใหม่
0.00 g/ml	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
0.10 g/ml	11.90±0.89	12.12±1.19	12.02±1.57
0.50 g/ml	15.74±1.00	16.38±0.89	16.02±1.10
1.00 g/ml	13.10±1.29	12.98±1.25	12.98±1.48
Chloramphenicol	15.33±0.26	15.33±0.26	15.33±0.26

จากภาพที่ 4-2 และตารางที่ 4-1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสของจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพระหว่างสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสของทั้ง 3 จังหวัด กับสาร Negative control คือ น้ำกลั่น และ Positive control คือ Chloramphenicol พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพและเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.00±0.00 มิลลิเมตร และ 15.33±0.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 ไมกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus* ถ้าเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสแหล่งเดียวกัน แต่ความเข้มข้นต่างกัน สามามรถบอกได้ดังนี้ โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.74±1.00 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16.38±0.89 มิลลิเมตร โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *S. aureus* ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16.02±1.10 มิลลิเมตร ดังนั้นสารสกัดหยาบโพรโพลิสของจังหวัดพะเยาที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้สูงสุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดต่างๆ กับน้ำกลั่น พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิส ณ ความเข้มข้น 0.50 กรัม ต่อมิลลิลิตร ไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิส ณ ความเข้มข้น 0.10 กรัม ต่อมิลลิลิตร และ 1.00 กรัม ต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol



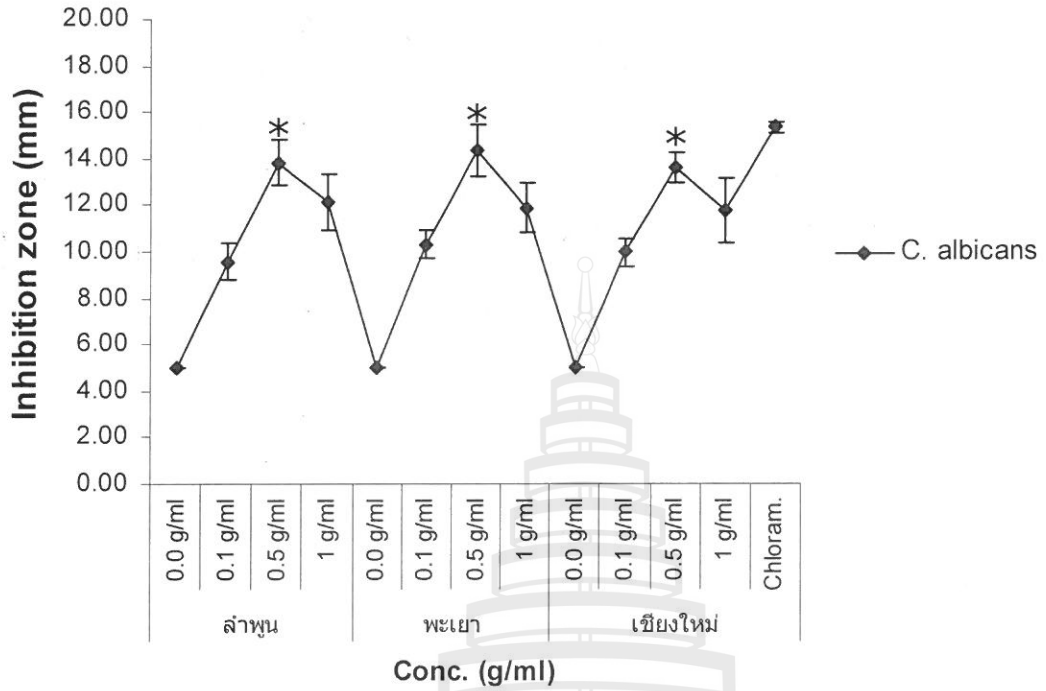
ภาพที่ 4-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*

ตารางที่ 4-2 แสดงผลการยับยั้งจุลชีพ *E. coli* ด้วยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากแหล่งต่างๆ และสารเปรียบเทียบ

บริเวณ Inhibition zone (มม.) จากสารสกัดหยาบเอธานอลของโพร โพลิส และสารเปรียบเทียบ			
E. coli	ลำพูน	พะเยา	เชียงใหม่
0.00 g/ml	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
0.10 g/ml	11.76±1.35	11.18±0.96	12.12±1.31
0.50 g/ml	15.74±0.93	15.38±0.67	15.88±0.92
1.00 g/ml	13.20±1.14	13.12±0.88	12.80±0.95
Chloramphenicol	15.33±0.26	15.33±0.26	15.33±0.26

จากภาพที่ 4-3 และตารางที่ 4-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสของจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพระหว่างสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสของทั้ง 3 จังหวัด กับสาร Negative control คือ น้ำกลั่น และ Positive control คือ Chloramphenicol พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพและเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.00±0.00 มิลลิเมตร และ 15.33±0.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 ไมกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *E. coli* ถ้าเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสแหล่งเดียวกัน แต่ความเข้มข้นต่างกัน สามามรถบอกได้ดังนี้ โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *E. coli* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.74±0.93 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *E. coli* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง15.38±0.67 มิลลิเมตร โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *E. coli* ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.88±0.92 มิลลิเมตร ดังนั้นสารสกัดหยาบโพรโพลิสของจังหวัดเชียงใหม่ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้สูงสุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดต่างๆ กับน้ำกลั่น พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิส ณ ความเข้มข้น 0.50 กรัม ต่อมิลลิลิตร ไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิส ณ ความเข้มข้น 0.10 กรัม ต่อมิลลิลิตร และ 1.00 กรัม ต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol



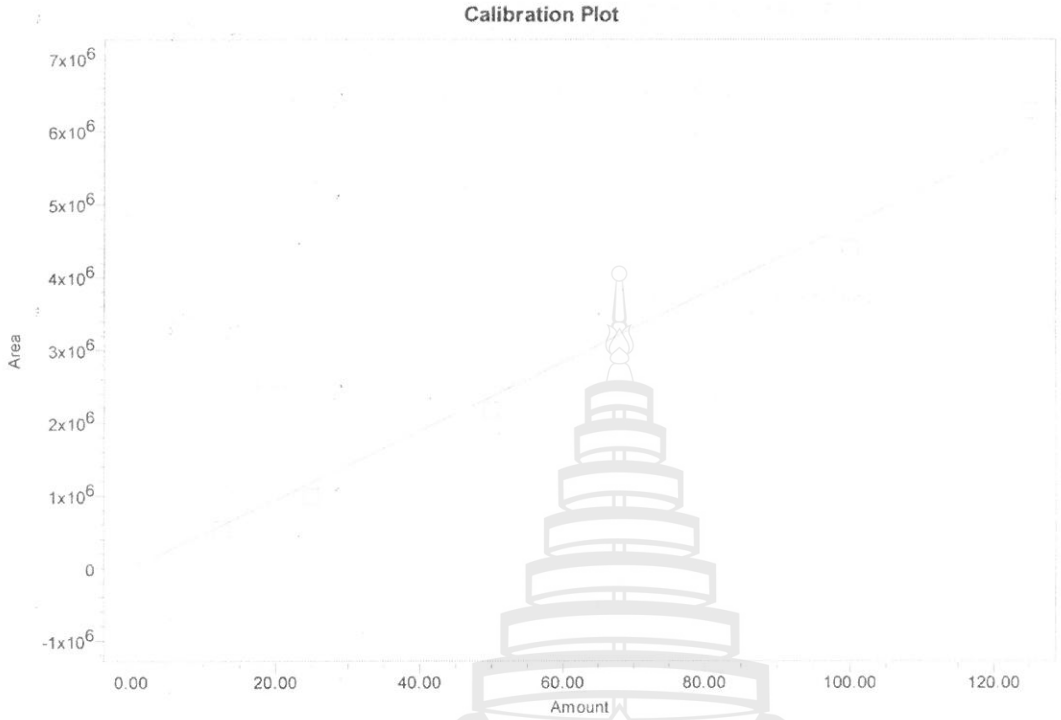
ภาพที่ 4-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans*

ตารางที่ 4-3 แสดงผลการยับยั้งจุลชีพ *C. albicans* ด้วยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากแหล่งต่างๆ และสารเปรียบเทียบ

บริเวณ Inhibition zone (มม.) จากสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิส และสารเปรียบเทียบ			
C. albicans	ลำพูน	พะเยา	เชียงใหม่
0.00 g/ml	5.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
0.10 g/ml	9.58±0.81	10.32±0.64	9.96±0.61
0.50 g/ml	13.84±1.00	14.34±1.14	13.62±0.65
1.00 g/ml	12.12±1.22	11.86±1.07	11.78±1.38
Chloramphenicol	15.33±0.26	15.33±0.26	15.33±0.26

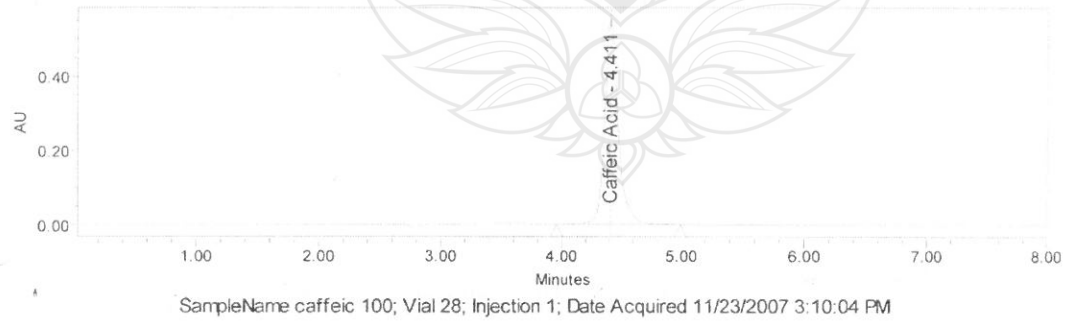
จากภาพที่ 4-4 และตารางที่ 4-3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสของจังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพระหว่างสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสของทั้ง 3 จังหวัด กับสาร Negative control คือ น้ำกลั่น และ Positive control คือ Chloramphenicol พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพและเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.00±0.00 มิลลิเมตร และ 15.33±0.26 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 ไมกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *C. albicans* ถ้าเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดโพรโพลิสแหล่งเดียวกัน แต่ความเข้มข้นต่างกัน สามามรถบอกได้ดังนี้ โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *C. albicans* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13.84±1.00 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *C. albicans* ดีที่สุดโดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14.34±1.14 มิลลิเมตร โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ ที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ *C. albicans* ดีที่สุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13.62±0.65 มิลลิเมตร ดังนั้นสารสกัดหยาบโพรโพลิสของจังหวัดพะเยาที่ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ได้สูงสุด โดยเกิดบริเวณยับยั้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดต่างๆ กับน้ำกลั่น พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิส ณ ความเข้มข้น 0.50 กรัม ต่อมิลลิลิตร ไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ส่วนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิส ณ ความเข้มข้น 0.10 กรัม ต่อมิลลิลิตร และ 1.00 กรัม ต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol



ภาพที่ 4-5 กราฟมาตรฐานของ Caffeic acid กราฟนี้เป็นกราฟมาตรฐานที่แสดงถึงพื้นที่ภายใต้พีค กับความเข้มข้นของสาร Caffeic acid

จากภาพที่ 4-5 แสดงกราฟมาตรฐานของสาร Caffeic acid ซึ่งเรียงจากความเข้มข้นน้อยที่สุด คือ 0 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร 12.50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร 25.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร 50.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร 100.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นมากที่สุด คือ 125.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยกราฟมาตรฐานมี Retention time ดังที่แสดงในภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-1

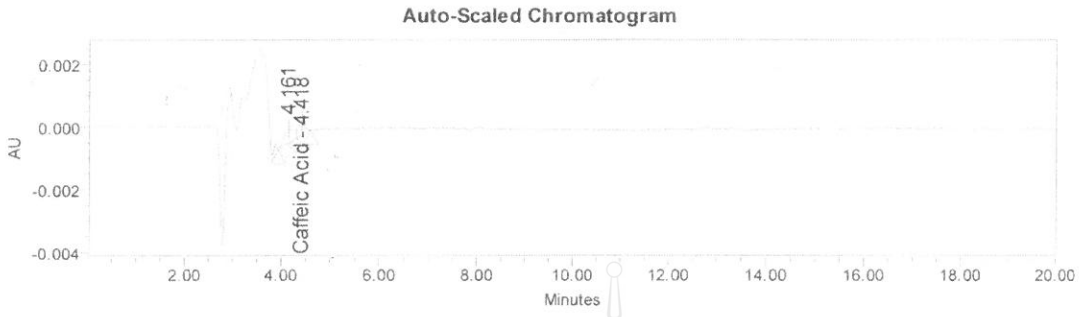


ภาพที่ 4-6 กราฟมาตรฐานของ Caffeic acid ซึ่งกราฟนี้เป็นกราฟตัวอย่างของ Retention time ของ Caffeic acid มาตรฐาน นอกจากนี้โดยกราฟนี้จะบอกถึงปริมาณสาร ความสูงของพีค และพื้นที่ภายใต้พีคด้วย

ตารางที่ 4-4 แสดงปริมาณสาร Caffeic acid และ Retention time ของ Caffeic acid

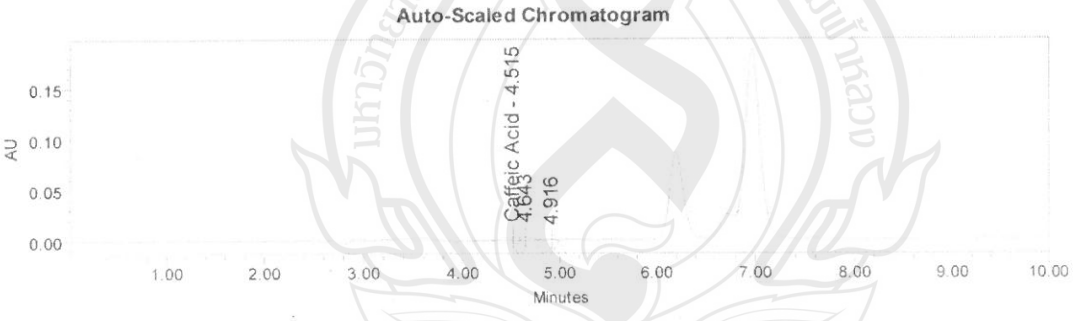
สาร	ความเข้มข้น (µg/ml)	Retention time
Caffeic acid	12.50	4.396
Caffeic acid	25.00	4.406
Caffeic acid	50.00	4.409
Caffeic acid	100.00	4.411
Caffeic acid	125.00	4.412

ตารางที่ 4-4 นี้เป็นตารางที่แสดงถึงความเข้มข้นของสาร Caffeic acid โดยมีหน่วยเป็นไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และ Retention time โดย Retention time นี้ จะมีค่าตั้งแต่ 4.396 ถึง 4.412 โดยค่านี้ใช้เป็นค่าเปรียบเทียบกับสาร Caffeic acid ในโพรโพลิสตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัด ลำพูน พะเยา และเชียงใหม่



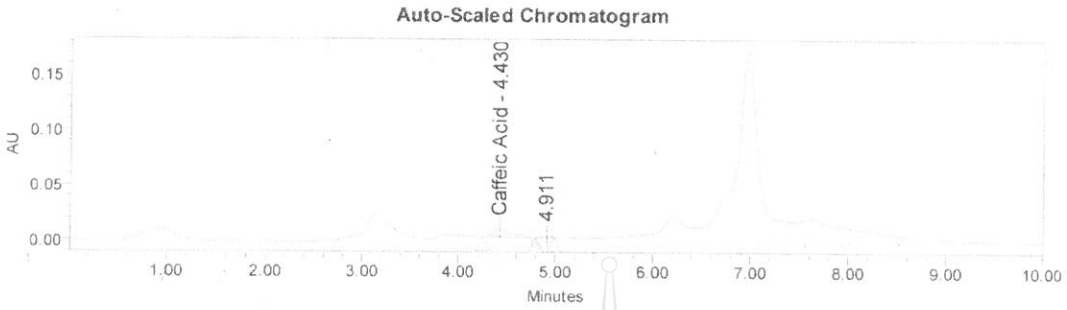
ภาพที่ 4-7 กราฟแสดงปริมาณ Caffeic acid ที่พบจากโพรโพลิสตัวอย่างจากจังหวัดลำพูน

จากภาพที่ 4-7 แสดงกราฟของสาร Caffeic acid ที่พบในโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูนซึ่งเป็นสารที่แยกมาจากโพรโพลิส แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง จากนั้นนำมาเปรียบเทียบสารมาตรฐาน Caffeic acid เพื่อยืนยันด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน พบปริมาณสาร Caffeic acid ในโพรโพลิส ณ Retention time 4.418 เป็นปริมาณ 0.10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมี Retention time ดังที่แสดงในภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-1



ภาพที่ 4-8 กราฟแสดงปริมาณ Caffeic acid ที่พบจากโพรโพลิสตัวอย่างจากจังหวัดพะเยา

จากภาพที่ 4-8 แสดงกราฟของสาร Caffeic acid ที่พบในโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยาซึ่งเป็นสารที่แยกมาจากโพรโพลิส แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง จากนั้นนำมาเปรียบเทียบสารมาตรฐาน Caffeic acid เพื่อยืนยันด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา พบปริมาณสาร Caffeic acid ในโพรโพลิส ณ Retention time 4.515 เป็นปริมาณ 1.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมี Retention time ดังที่แสดงในภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-1



ภาพที่ 4-9 กราฟแสดงปริมาณ Caffeic acid ที่พบจากโพรโพลิสตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่

จากภาพที่ 4-9 แสดงกราฟของสาร Caffeic acid ที่พบในโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ซึ่งเป็นสารที่แยกมาจากโพรโพลิส แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง จากนั้นนำมาเปรียบเทียบสารมาตรฐาน Caffeic acid เพื่อยืนยันด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ พบปริมาณสาร Caffeic acid ในโพรโพลิส ณ Retention time 4.430 เป็นปริมาณ 2.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมี Retention time ดังที่แสดงในภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-1

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ

สารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ โดยพบว่า สารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพรลิสความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อมิลลิลิตร 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.00 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus E.coli* และ *C. albicans* จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ ณ ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อมิลลิลิตร ให้ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus E.coli* และ *C. albicans*

จากการทดลองเพื่อหาสารสำคัญ Caffeic acid ที่เป็นสารที่สามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ โดยการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง และ เทคนิค HPLC พบว่าสาร Caffeic acid ที่เป็นสารที่ก่อให้เกิดการแพ้ โดยสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดลำพูน ณ fraction L5 ปริมาณน้อยที่สุด คือ 0.1 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดพะเยา ณ fraction P9 เป็นปริมาณ 1.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิตร และสารสกัดหยาบเอธานอลของโพรโพลิสจากจังหวัดเชียงใหม่ ณ fraction CH9 เป็นปริมาณมากที่สุด คือ 2.00 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นจึงสามารถบอกได้ว่าปริมาณสาระสำคัญที่พบจากสารสกัดหยาบเอธานอลจากโพรโพลิสจากทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลำพูน พะเยา และเชียงใหม่ มีความเข้มข้นในปริมาณน้อย จึงสามารถใช้สารสกัดโพรโพลิส เพื่อเป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอางได้

ประวัตินักวิจัย และคณะ

รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณวิภา กฤษฎาพงษ์	ที่ปรึกษาโครงการวิจัย
สัดส่วนที่ทำวิจัย	-
ที่อยู่	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง 333 ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์	0-5391-6833

2. นายพหล แสนสมชัย	หัวหน้าโครงการวิจัย
สัดส่วนงานที่ทำวิจัย	ร้อยละ 90
ที่อยู่	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง เชียงราย 57100
โทรศัพท์	0-5391-6836

3. นางสาวมยุรมาศ แสงเงิน	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
สัดส่วนงานที่ทำวิจัย	ร้อยละ 10
ที่อยู่	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง เชียงราย 57100
โทรศัพท์	0-5391-6836