

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และพืชที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

1. Ethanol, analytical grade, (Merk, Germany)
2. Absolute ethanol (Merk, Germany)
3. Trolox (Sigma-Aldrich, Germany, assay 99%)
4. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) (Sigma chemical Co., USA, Assay 99%)
5. Vitamin C (Merk, Germany, assay 99%)
6. Gallic acid (Sigma-Aldrich, Germany, assay > 98%)
7. Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany)
8. Methanol, analytical grade, (Merk, Germany)
9. Sodium carbonate (Sigma-Aldrich, Germany)
10. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma-Aldrich, Germany, assay > 98%)
11. Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) (Merk, Germany)

3.1.2 อุปกรณ์

1. Gas chromatography / mass spectrometer, GC/MS (Agilent GC7890A coupled with a Agilent 5975C mass selective detector)
2. UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV2450, Japan)
3. Microplate reader (Molecular Devices, U.S.A.)
4. Vacuum rotary evaporator (Buchi R-124)
5. Freeze dryer (Snijder's scientific)

3.1.3 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ดอกบุนนาค เก็บมาจากต้นที่ปลูกบริเวณหน้าอาคารเพนเทคอสตในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2558 นำดอกบุนนาคไปจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง และเก็บไว้อ้างอิงที่หอพรรณไม้และฐานข้อมูลของพืชพรรณ (Herbarium and flora database) ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเกสรและกลีบดอกบุนนาค

นำดอกบุนนาคสด จำนวน 40 ดอก มาแยกเกสรและกลีบดอกออกจากกัน นำเกสรและกลีบดอกไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค SPME GC/MS โดยใช้ไฟเบอร์ในการสกัดสารเป็นไฟเบอร์ชนิด polydimethylsiloxane ขนาด 100 ไมโครเมตร อุณหภูมิที่ใช้ในการดูดซับ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS คอลัมน์ที่ใช้แยกสารเป็นคอลัมน์ชนิด DB-5 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ฟิมล์หนา 0.25 ไมโครเมตร และมีสภาวะที่ใช้ในเครื่อง GC ดังนี้

| | | |
|---------------------------|-----------|------------------------------------|
| อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า | 250 | องศาเซลเซียส |
| โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์ | | |
| อุณหภูมิเริ่มต้น | 35 | องศาเซลเซียส |
| อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ | 2 | องศาเซลเซียสต่อนาที |
| ถึงอุณหภูมิ | 40 | องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 2 นาที |
| อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ | 5 | องศาเซลเซียสต่อนาที |
| ถึงอุณหภูมิ | 60 | องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 5 นาที |
| อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ | 10 | องศาเซลเซียสต่อนาที |
| ถึงอุณหภูมิ | 200 | องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 10 นาที |
| อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ | 10 | องศาเซลเซียสต่อนาที |
| ถึงอุณหภูมิ | 250 | องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 5 นาที |
| อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด | 280 | องศาเซลเซียส |
| ชนิดสารแบบ | splitless | |

และมีสภาวะที่ใช้เครื่อง MS ดังนี้

| | | |
|---------------------------|------------|--------------|
| อุณหภูมิของ MS Quadrupole | 150 | องศาเซลเซียส |
| อุณหภูมิของตัวผลิตไอออน | 230 | องศาเซลเซียส |
| สแกนพารามิเตอร์ | 50-550 amu | |

นำแมสสเปกตรัมของสารแต่ละพีคเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานที่เก็บไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ (Library search software) ได้แก่ WILEY และ NIST ถ้าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมากกว่า

หรือเท่ากับ 90% ถือว่าสารที่ได้เป็นสารตัวเดียวกัน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์พื้นที่ที่สกัดของแต่ละสาร (% area) จากสมการ 3.1

$$\text{เปอร์เซ็นต์พื้นที่ที่สกัดสาร} = \frac{\text{พื้นที่ที่สกัดสาร}}{\text{พื้นที่ที่สกัดทั้งหมด}} \times 100 \quad (3.1)$$

คำนวณหาค่า retention index (RI) ของแต่ละสาร ดังสมการ 3.2 โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนผสม (คาร์บอน 8-40) ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS ในสภาวะเดียวกันกับที่วิเคราะห์เกสรและกลีบดอกบุนนาค และเปรียบเทียบค่า RI ของสารจากอ้างอิงของ Adam (2001)

$$RI = 100Z + 100 \left(\frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(Z)}}{\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{R(Z)}} \right) \quad (3.2)$$

เมื่อ t'_R = retention time

Z = *n*-alkanes with Z carbon atom, where Z is an even number

$Z+1$ = *n*-alkanes with $Z+1$ carbon atoms

3.3 การสกัดสารจากดอกบุนนาค

แยกเกสรดอกบุนนาคและกลีบดอกออกจากกัน นำเกสรดอกบุนนาค กลีบดอกบุนนาค และดอกบุนนาคทั้งดอก ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดให้ละเอียด ซังเกสรดอกบุนนาค 150 กรัม กลีบดอกบุนนาคและดอกบุนนาคทั้งดอก อย่างละ 200 กรัม ใส่ในขวดแก้วขนาดใหญ่ เติมน้ำทำละลายเอทานอล ปริมาตร 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน กรองสารละลายโดยใช้ชุดกรองแบบสุญญากาศ แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศภายใต้ความดันต่ำ (vacuum rotary evaporatory) จนได้ของเหลวเหนียว แล้วนำไปทำให้แห้งต่อด้วยเครื่อง freeze dryer คำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัด (% yield) จากสมการ 3.3

$$\text{ร้อยละผลผลิตของสารสกัด} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้}}{\text{น้ำหนักของแก่นตะวันที่นำมาสกัด}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.4 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด ใช้วิธี Folin-Ciocalteu reagent method (McDonald, Prenzler, Antolovich, & Robards, 2001) และใช้สาร gallic acid เป็นสารมาตรฐาน

ก. เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (1:10 v/v)

ปิเปตสาร Folin-Ciocalteu reagent 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

ข. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

ชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนตมา 10.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

ค. เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง gallic acid มา 10.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำ (50:50 v/v) เล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำจนถึงขีดวัดปริมาตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย gallic acid เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 และ 0.60 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายผสมจนถึงขีดวัดปริมาตร

ง. เตรียมสารละลายของสารสกัดเกสรบุนนาค สารสกัดกลีบดอกบุนนาค และสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดมา 2.50 มิลลิกรัม ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมตัวทำละลายผสมจนถึงขีดวัดปริมาตร

จ. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ 1-6 หลอดละ 1.00 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 7 ปิเปตสารละลายสารสกัดกลีบดอกบุนนาคเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 8 ปิเปตสารละลายสารสกัดเกสรดอกบุนนาคเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร และหลอดที่ 9 ปิเปตสารละลายสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (1:10 v/v) ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอดๆ ละ 5.00 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร จำนวน 4.00 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปกโทโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเพื่อหาสมการเส้นตรง คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และรายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ในสารสกัดแห้งหนัก 1 กรัม (mg GAE/g dry weight)

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยวิธี DPPH

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเกสรบุนนาค สารสกัดกลีบดอกบุนนาค และสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก ด้วยวิธี DPPH radical scavenging โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ สุกัญญา เขียวสะอาด และสามารถ คงทวีเลิศ (2556) ใช้สาร trolox และ vitamin C เป็นสารมาตรฐาน ตัวทำละลายใช้เอทานอล (absolute ethanol)

ก. เตรียมสารละลาย DPPH 0.004% w/v

ชั่งสาร DPPH มา 8 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ข. เตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox

เตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง trolox มา 10.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย trolox เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ค. เตรียมสารละลายมาตรฐาน vitamin C

เตรียมสารละลายมาตรฐาน vitamin C เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง vitamin C มา 10.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.0013, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.015 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย vitamin C เข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.013, 0.025, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ง. เตรียมสารละลายของสารสกัดเกสรดอกบุนนาค

เตรียมสารละลายสารสกัดเกสรดอกบุนนาค เข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดมา 50.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร แล้วเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายของสารสกัดเกสรดอกบุนนาค เข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.10, 0.20, 0.40, 0.60 และ 0.80 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

จ. เตรียมสารละลายของสารสกัดกลีบดอกบุนนาค

เตรียมสารละลายสารสกัดกลีบดอกบุนนาค เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดมา 10.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร แล้วเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายของสารสกัดกลีบดอกบุนนาค เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ฉ. เตรียมสารละลายของสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก

เตรียมสารละลายสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดมา 10.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร แล้วเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.075, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายของสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.25, 0.5, 0.75, 1.00 และ 2.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ข. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน trolox ความเข้มข้น 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ 1-6 หลอดละ 1.00 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 7 ให้เป็น blank โดยใส่เอทานอลแทนสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH 0.004 % w/v ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอดๆ ละ 3 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปกโทโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 3 (n = 3) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสมการ 3.4

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A_b - A_s)}{A_b} \times 100 \quad (3.4)$$

เมื่อ A_b คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารมาตรฐานหรือไม่มีสารสกัด (blank)

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารมาตรฐานหรือสารสกัด

พล็อตกราฟระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน trolox หาสมการเส้นตรงของกราฟ เพื่อนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน trolox ที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) สำหรับสารละลายมาตรฐาน vitamin C และสารละลายของสารสกัดเกสรบุนนาค สารสกัดกลีบดอกบุนนาค และสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ก็ทำการทดลองในทำนองเดียวกัน

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยวิธี ABTS

ในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเกสรดอกบุนนาค สารสกัดกลีบดอกบุนนาค และสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก โดยวิธี ABTS โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ สุกัญญาและสามารถ (2556) ใช้สาร trolox และ vitamin C เป็นสารมาตรฐาน ใช้เอทานอล (absolute ethanol) เป็นตัวทำละลาย

ก. เตรียมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (mM)

ชั่งสาร ABTS มา 0.038 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

ข. เตรียมสารละลาย $K_2S_2O_8$ เข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์

ชั่งสาร $K_2S_2O_8$ มา 0.3783 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น จนถึงขีดวัดปริมาตร

ค. ผสมสารละลาย ABTS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย $K_2S_2O_8$ 176 ไมโครลิตร ในขวดสีชา ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลาย ABTS radical cation ทำการเจือจางสารละลาย ABTS radical cation ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.900

ง. เตรียมสารมาตรฐาน trolox

เตรียมสารมาตรฐาน trolox เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง trolox มา 10.00 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.0025, 0.005, 0.010, 0.015 และ 0.020 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน trolox เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.025, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

จ. เตรียมสารมาตรฐาน vitamin C

เตรียมสารมาตรฐาน vitamin C เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง vitamin C มา 10.00 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.0025, 0.005, 0.010, 0.015, 0.020 และ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน vitamin C เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.025, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร

ฉ. เตรียมสารละลายของสารสกัดเกสรดอกบุนนาค

เตรียมสารละลายของสารสกัดเกสรดอกบุนนาค เข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดเกสรดอกบุนนาคมา 50.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร แล้วเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายของสารสกัดเกสรดอก

บุนนาค เข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.60 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ข. เตรียมสารละลายของสารสกัดกลีบดอกบุนนาค

เตรียมสารละลายของสารสกัดกลีบดอกบุนนาค เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดกลีบดอกบุนนาคมา 10.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร แล้วเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.75, 1.00 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายของสารสกัดกลีบดอกบุนนาค เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ข. เตรียมสารละลายของสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก

เตรียมสารละลายของสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอกมา 10.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอลเล็กน้อย เทสารละลายใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร แล้วเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.0125, 0.025, 0.05, 0.075 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายของสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอกเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.125, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ฉ. นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.00 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ใช้ตัวทำละลายเอธานอลเป็น blank ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 3 (n = 3) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการ 3.5

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A_b - A_s)}{A_b} \times 100 \quad (3.5)$$

เมื่อ A_b คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารมาตรฐาน และ A_s คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารมาตรฐาน แล้วนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ มาพล็อตกราฟกับความเข้มข้น หาสมการเส้นตรงเพื่อนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายที่สามารถจัดอนุมูล ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

3.7.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดเกสรดอกบุนนาค สารสกัดกลีบดอกบุนนาค และสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก ใช้วิธี Resazurin microplate assay (REMA) (Brien, Wilson, Orton, & Pognan, 2000)

เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบเป็นเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB (oral cancer, ATCC CCL-17), เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (breast cancer, ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H 187 (small cell lung cancer, ATCC CRL-5804) ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งมีดังนี้

- นำเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในระยะ logarithm มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการในอาหารใหม่ สำหรับเซลล์มะเร็งช่องปากเข้มข้น 2.2×10^4 cells/mL ส่วนมะเร็งเต้านมเข้มข้น 3.3×10^4 cells/mL และมะเร็งปอดเข้มข้น 6.7×10^4 cells/mL

- เตรียมสารละลายสารสกัด 6 ความเข้มข้น โดยเจือจางสารแบบ three fold dilution ให้มีความเข้มข้น 50.00, 16.67, 5.56, 1.85, 0.62 และ 0.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ตัวทำละลายเป็น 0.5% Dimethylsulfoxide (DMSO) ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเซลล์มะเร็งปริมาตร 45 ไมโครลิตร เติมนลงในหลุม 384-well plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ เข้มข้น 5% สำหรับเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งเต้านมใช้เวลาบ่มเพาะเป็นเวลา 3 วัน สำหรับเซลล์มะเร็งปอดใช้เวลาบ่มเพาะเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเติมนสาร resazurin เข้มข้น 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้เครื่อง SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) ใช้ความยาวคลื่นที่กระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นที่คายพลังงาน (emission wavelengths) ที่ 530 และ 590 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้งคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ตามสมการ 3.6

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\% Cytotoxicity)} = [1 - (FU_T / FU_C)] \times 100 \quad (3.6)$$

เมื่อ FU_T และ FU_C คือ ค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากสภาวะที่เติมและไม่ได้เติมสารทดสอบตามลำดับ

- การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ใช้ยา ellipticine และ doxorubicin เป็น positive control ส่วนในการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 ใช้ยา doxorubicin และ tamoxifen เป็นสาร positive control และในการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H 187 ใช้ยา doxorubicin และ ellipticine เป็น positive control และใช้ 0.5% DMSO เป็น negative control

ค่าความเข้มข้นของสารสกัดเกสรดอกบุนนาค สารสกัดกลีบดอกบุนนาค และสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอกที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (ค่า IC_{50}) สามารถคำนวณจากโปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA)

3.7.2 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (cytotoxicity against vero cell) ของสารสกัดเกสรดอกบุนนาค สารสกัดกลีบดอกบุนนาค และสารสกัดดอกบุนนาคทั้งดอก ใช้วิธี Green fluorescent protein (GFP)-based assay (Hunt, Jordan, Jesus, & Wurm, 1999) เซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็นเซลล์ของไตลิง (African green monkey kidney, ATCC CCL-81) ใช้ยา ellipticine เป็น positive control และสาร 0.5% DMSO เป็น negative control ทำการทดสอบโดยเตรียมสารละลายสารสกัด 6 ความเข้มข้น โดยเจือจางสารแบบ three fold dilution ให้มีความเข้มข้น 50.00, 16.67, 5.56, 1.85, 0.617 และ 0.206 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ 0.5% DMSO เป็นตัวทำละลาย นำเซลล์ที่เข้มข้น 3.3×10^4 cells/mL ปริมาตร 45 ไมโครลิตร ลงในหลุม 384-well plate และเติมสารละลายสารสกัดปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะที่มี CO_2 เข้มข้น 5% เป็นเวลา 4 วัน วัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ในวันที่ 0 และวันที่ 4 โดยใช้เครื่อง SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) ใช้ความยาวคลื่นที่กระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นที่คายพลังงาน (emission wavelengths) ที่ 485 และ 535 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง และค่า IC_{50} เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

3.8 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาชงดอกบุนนาค

3.8.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาชงเกสรดอกบุนนาค

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาชงเกสรดอกบุนนาค ได้นำดอกเก๊กฮวยและหญ้าหวานผสมในบางสูตร เนื่องจากดอกเก๊กฮวยมีสรรพคุณดับร้อน รักษาอาการปวดศีรษะ เวียนศีรษะ ตาแดง บำรุงประสาทและสายตา (ชมพูนุท และคณะ, 2558) ส่วนหญ้าหวานเป็นพืชที่ให้ความหวานโดยธรรมชาติ เป็นความหวานที่ปราศจากแคลอรี และไม่มีผลกระทบต่อปริมาณน้ำตาลในร่างกาย เพราะเมื่อรับประทาน ร่างกายสามารถขับออกมาได้ทันทีไม่มีการสะสม จึงเหมาะกับผู้ที่ไม่ใส่ใจสุขภาพ ผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก และผู้ที่เป็นเบาหวาน ที่ยังต้องการรสหวานในอาหารและเครื่องดื่ม (พิสมัย, 2555)

ในการวิจัยครั้งนี้ได้นำเกสรดอกบุนนาค ดอกเก๊กฮวย และหญ้าหวาน ที่แห้งมาทำการบดหยาบ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาชงเกสรดอกบุนนาคทำเป็น 3 สูตร สูตรที่ 1 ประกอบด้วยเกสรดอกบุนนาคอย่างเดียว ส่วนสูตรที่ 2 ผสมระหว่างเกสรดอกบุนนาคและดอกเก๊กฮวย สูตรที่ 3 ผสมระหว่างเกสรดอกบุนนาค ดอกเก๊กฮวย และหญ้าหวาน ในอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้

| สูตรที่ | อัตราส่วน (กรัม) | | |
|---------|------------------|------------|----------|
| | เกสรดอกบุนนาค | ดอกเก๊กฮวย | หญ้าหวาน |
| 1 | 1.50 | 0 | 0 |
| 2 | 1.35 | 0.15 | 0 |
| 3 | 1.32 | 0.15 | 0.03 |

บรรจุชาแต่ละสูตรในถุงเยื่อกระดาษ ถุงละ 1.50 กรัม นำถุงชาไปแช่ในน้ำร้อน อัตราส่วนชา 1 ชอง ต่อน้ำ 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำชาไปทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบชิมชา จำนวน 20 คน ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง และทำการประเมินการยอมรับด้านสี กลิ่น รส เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม แบบประเมินเป็นแบบ 9-point Hedonic scale โดย scale ระดับคะแนน 1-9 คะแนน โดยเลข 1=ไม่ชอบมากที่สุด 2=ไม่ชอบมาก 3=ไม่ชอบปานกลาง 4=ไม่ชอบเล็กน้อย 5=เฉยๆ 6=ชอบเล็กน้อย 7=ชอบปานกลาง 8=ชอบมาก และ 9=ชอบมากที่สุด

การวิเคราะห์ความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ชาชงดอกบุนนาค วิเคราะห์คะแนนความชอบแบบ 9 Point Hedonic Scale โดยใช้ค่าเฉลี่ย (\bar{x}) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) เปรียบเทียบคะแนนความพึงพอใจของผู้ทดสอบด้านประสาทสัมผัส ที่มีต่อผลิตภัณฑ์ชาชงดอกบุนนาค โดยการวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

3.8.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาชงกลีบดอกบุนนาค

นำกลีบดอกบุนนาค ดอกเก๊กฮวย และหญ้าหวาน ที่นำมาทำการบดหยาบ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาชงกลีบดอกบุนนาคทำเป็น 3 สูตร โดยสูตรที่ 1 ประกอบด้วยกลีบดอกบุนนาคอย่างเดียว ส่วนสูตรที่ 2 ผสมระหว่างกลีบดอกบุนนาคและดอกเก๊กฮวย สูตรที่ 3 ผสมระหว่างกลีบดอกบุนนาค ดอกเก๊กฮวยและหญ้าหวาน ในอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้

| สูตรที่ | อัตราส่วน (กรัม) | | |
|---------|------------------|------------|----------|
| | กลีบดอกบุนนาค | ดอกเก๊กฮวย | หญ้าหวาน |
| 1 | 1.50 | 0 | 0 |
| 2 | 1.35 | 0.15 | 0 |
| 3 | 1.32 | 0.15 | 0.03 |

บรรจุชาแต่ละสูตรในถุงเยื่อกระดาษ ถุงละ 1.50 กรัม นำถุงชาแช่ในน้ำร้อน อัตราส่วนชา 1 ของต่อน้ำ 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำชาไปทดสอบด้านประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับการทดสอบชาชง เกสรดอกบุนนาค

3.8.3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาชงพิกัดเกสรทั้ง 5

เนื่องจากดอกบุนนาคจัดอยู่ในพิกัดเกสรทั้ง 5 ซึ่งพิกัดเกสรทั้ง 5 ประกอบด้วย ดอกบุนนาค ดอกมะลิ ดอกพิกุล ดอกสารภี และเกสรบัวหลวง ซึ่งมีสรรพคุณ แก้อ่อนในกระหายน้ำ ชูกำลัง บำรุงหัวใจ แก้ไข้ แก้ลมวิงเวียน ในการวิจัยนี้จึงได้การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาชงดอกบุนนาคจากพิกัดเกสรทั้ง 5 โดยนำพิกัดเกสรทั้ง 5 ที่แห้งมาบดหยาบ ผสมให้เข้ากันในอัตราส่วนต่างๆ โดยเพิ่มปริมาณดอกบุนนาคอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้

| สูตรที่ | อัตราส่วน (กรัม) | | | | |
|---------|------------------|----------|---------|----------|-------------|
| | ดอกบุนนาค | ดอกพิกุล | ดอกมะลิ | ดอกสารภี | เกสรบัวหลวง |
| 1 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| 2 | 2.00 | 0.75 | 0.75 | 0.75 | 0.75 |
| 3 | 3.00 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |

บรรจุชาแต่ละสูตรในถุงเยื่อกระดาษ ถุงละ 1.50 กรัม นำถุงชาแช่ในน้ำร้อน อัตราส่วนชา 1 ของต่อน้ำ 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที นำชาไปทดสอบด้านประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับการทดสอบชาชง เกสรดอกบุนนาค

3.9 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาตมสมุนไพรดอกบุนนาค

นำดอกบุนนาคแห้งมาพัฒนาเป็นชาตมสมุนไพร โดยนำไปผสมกับสมุนไพรอื่นๆ ที่มีกลิ่นหอมในอัตราส่วนต่างๆ ได้ 3 สูตร ทำโดยเตรียมส่วนที่ 1 นำเมนทอล พิมเสน การบูร น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันเปปเปอร์มินต์ (แต่ละสูตรจะใส่ไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับสูตร) มาผสมรวมกันในชามสแตนเลสหรือชามแก้ว ใช้ไม้พายคนให้เข้ากันจนเป็นของเหลว ส่วนที่ 2 นำสมุนไพรต่างๆ (แต่ละสูตรจะใส่ไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับสูตร) ใส่ในภาชนะชามสแตนเลสหรือชามแก้ว คลุกให้เข้ากัน แล้วนำของเหลวในส่วนที่ 1 ผสมลงในสมุนไพร ส่วนที่ 2 ใช้ไม้พายคน คลุกเคล้าให้เข้ากัน เทใส่ขวดโหลแก้วทิ้งไว้ 1 คืน ค่อยนำส่วนผสมบรรจุลงในขวดชาตม ขวดละ 5 กรัม นำยาตมที่ได้ทั้ง 3 สูตรไปทำการทดสอบด้านประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน ทำการทดสอบซ้ำอีก 2 ครั้ง และทำการประเมินการยอมรับด้านกลิ่นหอม รู้สึกสดชื่น รู้สึกผ่อนคลาย และความชอบโดยรวม แบบประเมินเป็นแบบ 9-point Hedonic scale ทำการวิเคราะห์ความ

พึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ยาตมดอกบุนนาคเช่นเดียวกับการวิเคราะห์การทดสอบชาชงดอกบุนนาค

| สูตรที่ 1 | ส่วนประกอบ | ปริมาณ (กรัม) |
|-----------|---------------------|---------------|
| | ดอกบุนนาค | 50 |
| | กานพลู | 50 |
| | ดอกจันทน์เทศน์ | 50 |
| | พริกไทยดำ | 50 |
| | กระวาน | 50 |
| | โป๊ยกั๊ก | 50 |
| | อบเชย | 50 |
| | เปราะหอม | 50 |
| | ดีปลี | 50 |
| | เมนทอล | 50 |
| | การบูร | 50 |
| | พิมเสน | 50 |
| | น้ำมันยูคาลิปตัส | 50 |
| | น้ำมันเปปเปอร์มินต์ | 50 |
| สูตรที่ 2 | ส่วนประกอบ | ปริมาณ (กรัม) |
| | ดอกบุนนาค | 50 |
| | กานพลู | 50 |
| | ดอกจันทน์เทศน์ | 50 |
| | พริกไทยดำ | 50 |
| | โกศหัวบัว | 50 |
| | โป๊ยกั๊ก | 50 |
| | กระวาน | 50 |
| | เมนทอล | 100 |
| | การบูร | 50 |
| | พิมเสน | 50 |

สูตรที่ 3

| ส่วนประกอบ | ปริมาณ (กรัม) |
|------------------|---------------|
| ดอกบุนนาค | 50 |
| กานพลู | 50 |
| ดอกจันทน์เทศน์ | 50 |
| พริกไทยดำ | 50 |
| กระวาน | 50 |
| โปยี้ก๊ก | 50 |
| ผิวมะกรูด | 50 |
| โกฐหัวบัว | 50 |
| โกฐสอ | 50 |
| เมนทอล | 50 |
| การบูร | 50 |
| พิมเสน | 50 |
| น้ำมันยูคาลิปตัส | 50 |