รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ

อุดมเดชา พลเยี่ยม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

The chemical structures of bioactive compounds of *Ficus hispida Linn.*

UDOMDEJA POLYIUM

This Research in Funded by Faculty of Science and Technology
Rajamangala University of Technology Phra Nakorn
Fiscal Year 2013

ชื่อเรื่อง : การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ
ผู้วิจัย : ผศ. อุดมเดชา พลเยี่ยม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทคัดย่อ

การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากใบมะเดื่อ ด้วยเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ทำการตรวจสอบพฤกษเคมี การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบและสารสกัด(fraction) ชั้นเมทานอลกับจุลชีพ 4 ชนิด คือ *Vibrio cholerae* , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Vibrio paraheamolyticus* และ *Streptococcus mutans* ATCC 27175และศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ ผลการวิจัยพบว่า

1. สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเมทานอลแสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ทั้ง 4 ชนิด ได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากเฮกเซน และ เอทิลอะซิเตต

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัด(fraction) ชั้นเมทานอล พบว่าชั้น F5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สูงที่สุด

3. การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ ซึ่งมีลักษณะผลึกใสไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวพบว่ามีจุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 188-195 °C

ในการวิจัยครั้งต่อไปควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและโครงสร้างโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย หรือ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เป็นต้น โดยศึกษาจากส่วนต่างๆ ของมะเดื่อทั้ง ราก เมล็ด ใบ ดอก และผล เพื่อจะได้ข้อมูลสำหรับการคัดเลือกพืชสมุนไพรและนำไปพัฒนาต่อยอดการวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

Title : **Chemical composition and Biological activity of *Ficus hispida* Linn.**
Researcher : **Udomdeja Polyium**
Faculty of Science and Technology,
Rajamangala University of Technology Phra Nakhon

ABSTRACT

Study the chemical structure of the bioactive compound extracted from the leaves of the *Ficus hispida* Linn , with extraction techniques Sequential Extraction, using three organic solvents, hexane, ethyl acetate and methanol . Phytochemical examination , testing antimicrobial activity of crude extracts and fraction of methanol extracts with the four species of microorganisms , *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Vibrio paraheamolyticus*, and to determine the molecular structure of compounds. The results showed that

1. Crude methanol extract of the leaves of the *Ficus hispida* Linn show inhibitory microbial species, more than crude extracts of hexane and ethyl acetate .

2. Testing antimicrobial activity of methanol extracts fraction was found to inhibit microbial highest F5 show.

3. The molecular structure of compounds, crystals are colorless mp. 188-195 ^{0}C.

Research should further study the molecular structure and biological activity of bioactive compounds in other areas, including anti-cancer Antimalarial and antioxidant activity of different parts of the study. The roots, leaf, flower and fruit seeds to plant information for the selection and to further develop research in the next commercial.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ ได้รับทุน อุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรา อมรแก้ว คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ให้การสนับสนุนทุนการทำวิจัยและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและห้องปฏิบัติการทางเคมีอินทรีย์ในการทำวิจัยเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**I**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**II**
กิตติกรรมประกาศ	**III**
สารบัญ	**IV**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**3**
2.1 พืชสมุนไพร	3
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร	4
2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร	6
2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	13
2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	15
2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร	22
2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	28
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	**32**
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	32
3.2 พืชสมุนไพร และจุลชีพ	33
3.3 วิธีการทดลอง	33
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	37
3.5 ระยะเวลาการทดลอง	37
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	37

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	**38**
4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี	38
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบ	39
4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของชั้นของสารสกัดจากเมทานอล	40
4.4 การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์	41
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	**44**
5.1 สรุปผลการทดลอง	44
5.2 อภิปรายผล	45
5.3 ข้อเสนอแนะ	45
บรรณานุกรม	**46**
ภาคผนวก การวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของสาร	**49**

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ(Biodiversity) เนื่องจากมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อนที่เรียกว่า “Indo-Burma ” และมีที่ตั้งอยู่ในเขตสภาพภูมิอากาศแถบร้อนชื้น ณ ใจกลางของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จึงก่อให้เกิดสภาพธรรมชาติอันหลากหลาย เป็นสะพานเชื่อมต่อสังคมสิ่งมีชีวิตจากเขตเหนือของโลกแถบเทือกเขาหิมาลัยและตอนใต้ของจีนกับคาบสมุทรมลายู รวมถึงสังคมสิ่งมีชีวิตแบบร้อนแห้งแล้งจากกัมพูชาและลาว จึงเป็นแหล่งกำเนิดของระบบนิเวศ เขตร้อนหลากหลายประเภท ความหลากหลายทางชีวภาพดังกล่าวได้มีส่วนสนับสนุนค้าจุนให้วิถีชีวิตของคนไทยดำเนินไปโดยสมบูรณ์ ความหลากหลายทางชีวภาพปรากฏในอาหารและสมุนไพรพื้นบ้าน พืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมาแต่โบราณและสืบทอดต่อมาจนเกิดเป็นยากลางบ้านหรือยาแผนโบราณในปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญต่อการนำพืชสมุนไพรมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่นในอุตสาหกรรมยา มีการค้นพบยาชนิดใหม่ๆ จากการค้นพบองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาแล้วนำมาใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาและสังเคราะห์ยาตามกรรมวิธีทางเภสัชกรรม การสกัดสารจากพืชสมุนไพรและการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ประโยชน์นั้นเป็นวิธีหนึ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างมากเพื่อนำมาใช้หาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ๆ จากพืชชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นที่ได้รับความสนใจทำการศึกษาและวิจัยเป็นอย่างมาก และเป็นการนำสมุนไพรในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด (สุภาพ บุณยะรัตเวช, 2523 :118 และรัตนา อินทรานุปกรณ์ , 2547 : 63-79) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เป็นต้น และสารนั้นจะต้องไม่มีผลทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็นส่วนประกอบของยา ย่อมไม่ต้องการให้ยามีผลกับส่วนที่ดีของร่างกาย ยกเว้น เชื้อโรค หรือส่วนเกิน (มะเร็ง) ที่เราต้องการขจัดเท่านั้น สารใดก็ตามถ้ามีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ เราก็จะจัดสารนั้นให้อยู่ในพวกสารพิษ (toxic substance)ประกอบกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ เน้นการพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสรางความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดลอมโดยใหความสำคัญกับการพัฒนาคุณคาความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปญญาทองถิ่น โดยใชหลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญในการจัดการองค์ความรูและสรางภูมิคุมกันสงเสริมการใชความหลากหลายทางชีวภาพในการสรางความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจทองถิ่นและชุมชนรวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสรางนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เปนเอกลักษณของประเทศ การวิจัยเพื่อการพัฒนาศักยภาพของมะเดื่อด้านการใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อสร้างองค์ความรู้และคุ้มครองภูมิปัญญาท้องถิ่น จึงเป็นประเด็นที่ควรมีการศึกษาเพื่อสืบทอดภูมิปัญญาท้องถิ่นและ เพื่อเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพการใช้ประโยชน์ของพืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข เพื่อเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพของพืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งเป็นแนวทางสู่การนำไปเป็นยา อาหารเสริมหรือเครื่องสำอาง ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

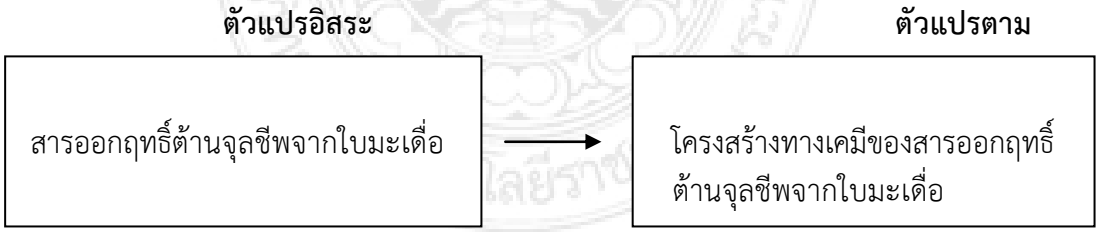
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากมะเดื่อ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือมะเดื่อ
   ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ficus hispida* Linn. f.
   ชื่อวงศ์ : Moraceae
2. ส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย
   ใบของมะเดื่อ
3. จุลชีพที่ใช้ในการวิจัยคือแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด
   3.1 Staphylococcus aureus ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมบวก
   3.2 *Streptococcus mutans* ATCC 27175 แบคทีเรียแกรมบวก
   3.3 *Vibrio cholerae* แบคทีเรียแกรมลบ
   3.4 *Vibrio paraheamolyticu s* แบคทีเรียแกรมลบ
4. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เป็นตัวทำละลายอินทรีย์จำนวน 3 ชนิด
   เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย



1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

ข้อมูลโครงสร้างทางโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรไทยซึ่งจะนำไปสู่การผลิตเชิงอุตสาหกรรมและเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ ผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 พืชสมุนไพร
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร
2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร
2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร
2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัยคือ มะเดื่อ ข้อมูลอนุกรมวิธานที่สำคัญของพืชสมุนไพรประกอบด้วยชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อวงศ์ ชื่อพื้นเมือง ลักษณะทั่วไป ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และประโยชน์ดังนี้

http://www.bloggang.com/

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

1. ชื่อ มะเดื่อ

2. ชื่ออื่น เดื่อปล้อง เดื่อป่อง เดื่อสาย เดื่อป้อง ตะเออน่า ฮะกอ สะนียา (นราธิวาส)

3. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus hispida* Linn. f.

4. วงศ์ MORACEAE

5. แหล่งที่พบ พบทุกภาคของประเทศ

6. ประเภทไม้ ไม้ยืนต้น

7. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น ไม้ยืนต้นขนาดกลางสูงประมาณ 5-10 เมตร ลำต้นเดี่ยวตั้งตรงเปลือกหนา กิ่งแขนงแตกเป็นพุ่มทรงกลมทั้งต้น มีน้ำยางสีขาว ลำต้นมีรอยควั่นเป็นปล้องหรือเป็นข้อๆ คล้ายข้อไม้ไผ่ตลอดจนถึงกิ่ง

ใบ ใบเดี่ยวออกตรงข้ามกัน รูปไข่แกมขอบขนานหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ ผิวสากหนืดมือ คล้ายใบย่อยมีขนนาบกับแผ่นใบสีเขียวสด

ดอก มีสีเหลืองแกมเขียว ออกช่อกระจุกแน่น เจริญอยู่ในฐานรองดอกกลมกลวงเหมือนลูกแพร์ แกมรูปไข่กลับกว้าง ดอกย่อยแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกันเป็นสีชมพูอ่อน

ผล กลมแป้นขนาดเล็กติดเป็นกลุ่มแน่น 10-15 ผล สีเขียวสดเมื่อแก่มีสีน้ำตาลปนเขียว

8. ส่วนที่ใช้บริโภค ผลอ่อน

9. การขยายพันธุ์ เมล็ด ตอนกิ่ง

10. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เจริญเติบโตได้ดีในดินทุกชนิด อยู่ตามป่าโปร่งป่าดิบเขาทั่วไป

11. ฤดูกาลที่ใช้ประโยชน์ ตลอดปี

12. การปรุงอาหาร ผลอ่อน รับประทานเป็นผักจิ้มร่วมกับน้ำพริก

(เต็ม สมิตินันทน์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรมป่าไม้ 379 หน้า. สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2542. ผักพื้นบ้านภาคใต้ 279 หน้า. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพรไทย รวมเภสัชกรรมไทย. 2540. 618 หน้า.)

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร

การเตรียมพืชสมุนไพร (Preparation of Medicinal plants) ประกอบด้วยการคัดเลือกพืชสมุนไพร การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร การเก็บส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพร การเตรียมพืชสมุนไพร การทำให้สมุนไพรมีขนาดเล็ดลง

(http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri02/lesson.htm)

2.2.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

1. คัดเลือกพืชที่มีผลในการรักษามานานแล้ว โดยใช้ภูมิปัญญาแผนโบราณ
2. คัดเลือกพืชที่อยู่ในวงศ์ (Family) หรือ genus เดียวกัน โดยใช้หลักของ Chemotaxonomy
3. คัดเลือกพืชในวงศ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยดูจาก Botanical และ Chemotaxonomy
4. การคัดเลือกโดยทั่วไปพืชที่จะคัดเลือกควรเป็นพืชที่มีอยู่ในประเทศไทย

2.2.2 การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 **:** 59-60) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. พืชสมุนไพรที่จะนำมาสกัด ต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง เพราะพืชหลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันหรือมีชื่อพ้องกัน โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่หายากและขาดแคลน ต้องตรวจสอบอย่างรอบครอบ

2. การเลือกเก็บพืชสมุนไพรที่สมบูรณ์ มีอายุตามชนิดของพืช สามารถออกดอกออกผลที่มีจำนวนมากพอ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มากพอดังนี้

2.1 รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโต หากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย

2.2 เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่

2.3 ใบและดอก เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน

2.4 ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร

2.5 ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือเมื่อสุกเต็มที่ ตามชนิดของพืชสมุนไพร

2.6 เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก

3. เก็บตัวอย่างให้ถูกฤดูกาลของพืชแต่ละชนิด เช่น พวก ขิง ข่า กระชายดำ จะมีเหง้าอยู่ใต้ดิน ในฤดูฝนเหง้าจะมีน้ำปริมาณมาก ทำให้มีปริมาณสารระเหยต่ำ ดังนั้นจึงควรเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้ง จะได้ปริมาณสารระเหยที่มากกว่า

4. วิธีการเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสมต่อการนำไปแยกสกัดสาร พืชบางชนิดต้องสกัดสด หรือบางชนิดต้องสกัดแห้ง

5. เก็บตัวอย่างในปริมาณที่มากพอ เพื่อเก็บไว้เป็น Original Sample ซึ่งการเก็บจะต้องมีการจดบันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้อง เช่น วันเวลา ฤดูกาลที่เก็บ สถานที่เก็บ เป็นต้น

6. ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าและผลิตภัณฑ์ ต้องระวัง สิ่งปลอมปน การใช้ชื่ออื่นมาอ้าง และชื่อพ้องกัน

7. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วต้องการทำตัวอย่างแห้ง ต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์

2.2.3 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. การเตรียมตัวอย่างแบบสด พืชสมุนไพรสดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง

2. การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง เป็นการป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

3. ระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้พืชแห้งโดยทั่วไปดอก ใบ และยอด จะใช้อุณหภูมิที่ 20-40 องศาเซลเซียส ส่วนเปลือกและรากจะใช้อุณหภูมิที่ 30-35 องศาเซลเซียส

4. พืชสมุนไพรแห้งควรเก็บในที่แห้ง มืด เย็น และมีอากาศหมุนเวียนและหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน

2.2.4 การทำให้สมุนไพรตัวอย่างมีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชสมุนไพรต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชสมุนไพรที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

การย่อยพืชสมุนไพรให้มีขนาดเล็กลง

1. การหั่นหรือตัดพืชสมุนไพรแห้งควรตัดตามยาว (longitudinal cut) หรือตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยม (rectangular or cubical cut) ก่อนบด (grinding) โดยใช้เครื่องบดแบบต่างๆ ตามชนิดของวัตถุดิบและขนาดที่ต้องการหลังการบด เช่น เครื่องบดชนิดค้อน(driven hammer mill) เหมาะสำหรับย่อยขนาดพืชที่แตกหักง่าย เช่นรากหรือหัว ขนาดของพืชที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของตระแกรงที่ใช้

ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่จะหมุนเวียนกลับไปย่อยอีก จนได้ขนาดที่เล็กพอที่จะลอดผ่านรูตะแกรง หรือเครื่องบดชนิดตัด (cutting mills) เหมาะสำหรับย่อยใบ เปลือกไม้ และรากที่เหนียวมีเส้นใย ขนาดของพืชที่ต้องการลดขนาดขึ้นกับขนาดของตะแกรงที่ใช้และความเร็วของมอเตอร์ที่ใช้หมุนใบมีด เป็นต้น

2. พืชสมุนไพรสดทำได้โดยการหั่น (slicing) โดยใช้มีด หรือพืชสมุนไพรที่แช่ในแอลกอฮอล์ อาจใช้เครื่องปั่น (waring blender) เป็นต้น

นอกจากนี้อาจทำการย่อยเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เอนไซม์ (enzyme disintegration) หรือโดยใช้สารเคมี (chemical disintegration)

3. การลดขนาดของพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดควรคำนึงถึงโครงสร้างของพืชสมุนไพรเป็นหลัก ถ้าเป็นโครงสร้างแข็งแรง ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปได้ยาก เช่น รก เนื้อไม้ ควรบดให้มีขนาดเล็กกว่าส่วนที่มีโครงสร้างอ่อนนุ่ม ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปได้ง่าย เช่น ใบ ดอก การบดพืช

4. การย่อยสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากจนเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์แตกมากเกินไป ซึ่งบางครั้งทำให้สารสกัดขุ่น ขนาดของผงพืชสมุนไพรที่เหมาะสมหาได้จากการทดลองซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบสำคัญสูงสุด

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบจากสมุนไพร(Extraction of Active Constituents from Medicinal Plant) ในเบื้องต้นโดยใช้ตัวทำละลาย(solvent)จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) โดยสารสกัดหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรซึ่งจะมีองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active constituents) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) ซึ่งชนิดและปริมาณขององค์ประกอบในสารสกัดขึ้นอยู่กับสมุนไพรและสภาวะที่ใช้ในการสกัด

วัตถุประสงค์ของการสกัดนั้นเพื่อแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร และทำให้ความเข้มข้นของสารสำคัญมีสูงขึ้น และเพื่อลดขนาด (dose) ของการใช้สมุนไพรให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม
(รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547 : 59-60)

ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรนั้นมีข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์ การเลือกตัวทำละลาย การเลือกวิธีการสกัด วิธีการสกัด และการทำสารสกัด ให้เข้มข้น

2.3.1 สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์

ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัต์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551 : 68-71) กล่าวถึงคุณสมบัติทั่วไปที่ควรทราบกอนทำการแยกสารดังนี้

1. ความไมชอบน้ำ (hydrophobicity) หรือ ความชอบน้ำ (hydrophilicity)

ความชอบน้ำ (hydrophilicity) หรือความไมชอบน้ำ (hydrophobicity) ของสารนั้นพิจารณาไดจากความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลาย ที่มีขั้วสูงไปหาขั้วต่ำตามลำดับ ดังนี้ น้ำ เมธานอล อะซีโตไนไตร(acetonitrile) เอธิลอะซีเตด (ethyl acetate) ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane) คลอโรฟอรม (chloroform) ปโตรเลียมอีเธอร (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane) สารสกัดหยาบที่จะนำมาแยกใหไดสารบริสุทธิ์อาจละลายในตัวทำละลายไดยาก ควรกรองสารละลายของสารสกัดหยาบเพื่อ แยกเปนสวนของตะกอนและสวน ของสารละลาย (filtrate)หรือหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเปน สวนของตะกอนและสวนลอย (supernatant) นอกจากนี้ยังสามารถสกัดแยกสวนของสารสกัดหยาบ ดวยการใชตัวทำละลายสองชนิดที่ไมเขากัน เชน น้ำ กับเอธิลอะซีเตด หรือคลอโรฟอรมกับไดคลอโรมีเธนหรือเฮกเซน เปนตน โดยทำการสกัด ดวยกรวยแยก จากนั้นจึงนำแตละ สวนมาแยกใหบริสุทธิ์ ตอไปดวยเทคนิคทางโครมาโทกราฟชนิดอื่น หรือแบงบางสวนของสารที่แยกไดนั้นมาทดสอบฤทธิ์ทาง ชีวภาพกอนที่จะแยกสารใหบริสุทธิ์ตอไป

2. pKa

โดยทั่วไปค่าพีเอช (pH) 3 7 และ 10 จะเปนคาพีเอชที่แสดงถึงความเปนกรด กลาง และเบสตามลำดับ การทราบคา pKa จะทำใหทราบถึงความคงตัวของสารนั้นที่คาพีเอชตาง ๆ ของสารละลาย อยางไร ก็ตามในขั้นตอนการแยกสารสามารถปรับความเปนกรดเบสของสาร ที่อยูในรูปสารละลายหรือสารแขวนตะกอนดวยการหยดกรดหรือดางเพียง 1 - 2 หยด จากนั้นจึงสกัดแยก ดวยตัวทำละลายผสมที่แยกออกเปนสองชั้นได สารที่ไมแตกตัวจะละลายอยูในเฟสของ ตัวทำละลายอินทรีย (organic phase) สวนสารที่แตกตัวมีประจุเปนไอออนจะละลายอยูในเฟสของน้ำ (aqueous phase)

3. ความคงตัวตอความรอน

ความคงสภาพ (stability) มี 2 ประเภท คือ ความคงสภาพทางเคมี (chemical stability) และความคงสภาพทางกายภาพ (physical stability) ความคงสภาพของสารจะลดลงเมื่อเกิดการเสื่อมสลาย (degradation) เนื่องจากกระบวนการตาง ๆ เชน hydrolysis, dehydration, isomerization และ racemization, decarboxylation และ elimination, oxidation, photodegradation และ complex interaction รวมทั้งแสงและความรอน สารผลิตภัณฑธรรมชาติที่จัดเปนโปรตีนมักไมคงตัวตอความรอนจึงมักทำใหเกิดปญหาในการแยกสาร ดังนั้นจึงนิยมแยกสารที่ไมใชโปรตีนเพราะมีความคงตัวสูงกวา โดยทั่วไปการทดสอบความคงสภาพตอความรอนจะใชวิธีการบม (incubation) สารตัวอยางที่อุณหภูมิ 80 หรือ 90 องศาเซลเซียส เปน เวลานาน 10 นาที บนหมออังไอน้ำ (water bath) สารที่ถูกความรอนมักมีคุณสมบัติเปลี่ยนไป เชน เกิดการเกาะกลุมกัน (clotting หรือ aggregation) แสดงวาความรอนทำใหสารสลายตัวหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสรางทางเคมีไปจากเดิม

4. ขนาดโมเลกุล

การแยกสารอาจไม่ไดแยกตามความมีขั้วของสาร แตอาจแยกตามขนาดของโมเลกุล(size) หรือน้ำหนักโมเลกุล ของสาร เชน การแยกสารผลิตภัณฑธรรมชาติดวย Sephadex LH-20 column พบวาสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญจะถูกชะ ออกมาจากคอลัมนกอนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เปนตน ทั้งนี้การแยกสารตามขนาดโมเลกุลจะมีประโยชนอยางมากเมื่อ สารที่เปนองคประกอบในสารผสมมีขนาดโมเลกุลแตกตางกันแตมีขั้วใกลเคียงกันมาก จึงทำใหแยกออกจากกันไดยากเมื่อ ใช normal phase หรือ reverse phase แตหากแยกสารเหลานี้ดวย Sephadex LH-20 ที่อาศัยหลักการแยกสารตามขนาด โมเลกุลจะสามารถแยกสารบริสุทธิ์ไดตามตองการ ในบางครั้งโปรตีนที่ไมมีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเขามารบกวนกระบวนการแยกสาร อีกทั้งโปรตีนมักไมคงตัวตอความ รอนจึงสลายตัวกลายเปนสารรบกวนได วิธีกำจัดโปรตีนออกจากสารสกัดทางชีวภาพมักทำการสกัดดวยตัวทำละลายที่เขา กับน้ำได เชน เมธานอล เมื่อทำสารสกัดในชั้นเมธานอลใหแหงสนิท (ปราศจากน้ำ) แลว จึงจะสกัดสารสกัดที่ไดนั้นซ้ำอีกครั้ง ดวยเมธานอลเพื่อใหแนใจวาไมมีโปรตีนติดมาดวย เพราะโปรตีนจะละลายมากับน้ำในระหวางกระบวนการสกัด นอกจากนี้ ยังสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได ดวยการกรองผาน ultrafiltration membrane โดยใชแรงดันสุญญากาศหรือแรงหมุนเหวี่ยง ชวยไลสารตัวอยางใหผานไปบนแผนกรองสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเทานั้นที่จะสามารถผานรูของแผนกรองไปได สำหรับ โปรตีนซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญนั้นไมสามารถผานแผนกรองไปได อยางไรก็ตามสารที่จะแยกดวยวิธีนี้ไดตองมีขนาดโมเลกุล ใหญกวา 2000 amu สำหรับสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากจะตองแยกดวยวิธีการแยกสารผานเยื่อ (dialysis) ซึ่งสามารถ แยกโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกวา 2000-3000 amu ได โดยสารจะแพรผาน dialysis tubing ออกมา ยังสารละลายตัวกลางที่อยู ภายนอก โดยโปรตีนจะถูกกักเก็บไวใน tubing

5. สเตอริโอเคมี

สเตอริโอเคมี(Stereochemistry) เปนวิชาเคมีที่เกี่ยวกับระยะอะตอมในโมเลกุล ซึ่งมีอิทธิพลตอการแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และการคนพบยา เนื่องจากในปจจุบันมียาหลายชนิดที่จำหนายทั่วโลกจัดเปน chiral drug ดังนั้นเทคนิคในการแยก chiral compound จึงมีความสำคัญมากขึ้น

โดยทั่วไปสามารถแบงไอโซเมอร (isomer) ออกเปนหลายชนิดดังแผนภาพที่ 1 นอกจากนี้ยังสามารถแบง stereoisomer ออกเปน 2 ชนิด คือ enantiomer และ diastereomer โดยที่ enantiomer คือ โมเลกุลที่เปนภาพกระจกเงา (mirror image) ซึ่งกันและกัน เนื่องจาก enantiomer ทั้งสองมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ เหมือนกัน ดังนั้นจึงไมสามารถแยก enantiomer ออกจากกันดวยวัฏภาคคงที่ชนิด conventional reversed-phase stationary phase ได สำหรับ diastereomer ซึ่งโมเลกุลทั้งสองไมไดเปน ภาพกระจกเงาซึ่งกันและกันนั้น มีคุณสมบัติทาง เคมีและกายภาพแตกตางกันบาง จึงสามารถแยกออกจากกันดวย conventional stationary phase ได นอกจากนี้ยัง สามารถแบง diastereomer ออกเปน 2 กลุม คือ optically active isomer และ non-optically active geometric isomer โมเลกุลที่มี optical actiชนิดนี้ไมมีสมมาตร (symmetry) ภายในโมเลกุล ไมสามารถซอนทับ (superimpose) กับโมเลกุลที่เปนกระจกเงากันได โดยทั่วไปโมเลกุลชนิดนี้จะมีหมูแทนที่โดยรอบ tetrahedral carbon atom ที่แตกตางกันทั้ง 4 หมู ซึ่ง chiral molecule ของ lactic acid ที่มี central stereogenic center จะไมมีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุล (internal symmetry plane) (รูปที่ 1) ดังนั้น lactic acid จึงมี chiral enantiomeric form 2 แบบ ในทางตรงกันขาม propanoic acid ซึ่งมีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุลจัดเปน achiral molecule ความแตกตางระหวาง enantiomer ทั้งสอง คือ มีปฏิกิริยากับ chiral molecule

ชนิดอื่นไดแตกตางกัน และมี คุณสมมบัติทางกายภาพที่แตกตางกันดวย จึงเปนเหตุใหมี optical activity ในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ (plane polarized light) ไดแตก ตางกัน อยางไรก็ตาม enantiomer ทั้งสองยังคงมีคุณสมบัติบางอยางที่เหมือนกัน (identical) เชน จุดหลอมเหลว การละลาย และขอมูลทางสเปกโตรสโกปบางชนิด เปนตน ในปจจุบันนิยมแยก enantiomer ใหบริสุทธิ์ดวย HPLC นอกจากนี้การแยก chiral drug ในเชิงอุตสาหกรรมจะนิยมใช simulated moving bed (SMB) chromatography โดยการทำใหเกิด diastereomeric complex จากนั้นจึงแยกตอไปดวย conventional reversed-phase chromatography หรือคอลัมนที่บรรจุ immobilized chiral stationary phase (CSP)

2.3.2 การเลือกตัวทำละลาย

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 83-84) กล่าวถึงการเลือกตัวทำละลายสรุปได้ดังนี้

1. ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายมีความสำคัญมากที่สุด ซึ่งจะทำให้ทราบว่าสารที่ต้องการละลายหรือไม่ละลายในตัวทำละลายชนิดใด เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งมีโครงสร้างสลับซับซ้อนมากน้อยต่างกันและมีอยู่ในพืชทั้งในสภาพอิสระและรวมตัวกับสารอื่นๆ ในสภาพเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นควรพิจารณาถึงสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญที่ต้องการสกัดนอกเหนือจากความมีขั้วของสาระสำคัญดังกล่าว ในการเลือกตัวทำละลายมีหลักการทั่วไปว่า สิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน (Like dissolve like) เช่น คุณสมบัติสารสำคัญมีขั้ว ก็ควรเลือกตัวทำละลายหรือตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกันในสารสกัด

2. ความคงตัว

ตัวทำละลายมีความคงตัว หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. การระเหย

ตัวทำละลาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4. สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด

สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด เช่นเมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.3.3 วิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 85-89) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. มาเซอเรชัน

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในตัวทำละลายที่เหมาะสม จะทำเป็นเวลานาน 7 วัน หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างที่หมักผงสมุนไพรอยู่นั้นควรเขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรอง แยกกาก (marc) ออกจากตัวทำละลาย วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายน้อย และเนื่องจากเป็น

วิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะสมกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย เมื่อสารในสุมนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจนสมบูรณ์

การสกัดแบบมาเซอเรชันใช้เวลานาน จึงมีผู้ดัดแปลงใช้มิกเซอร์ (mixer) หรือโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) มาช่วยทำให้เซลล์พืชแตกออกมาก่อนทำการสกัด เพื่อลดระยะเวลาการสกัด ต่อมาพัฒนาใช้เสียงที่มีความถี่สูงเกิน 20,000 เฮิรตซ์ ร่วมในการสกัดเรียกวิธีนี้ว่า การสกัดอัลตราซาวน์ (ultrasound extraction) แต่วิธีหลังนี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำไปเป็นเพอร์ออกไซด์ ซึ่งอาจมีผลต่อการสกัด นอกจากนี้อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ต่อสารโดยตรง เพราะขณะที่ใช้การสกัดอัลคราซาวน์ทำให้เกิดช่องว่างและมีอากาศแทรกเข้าไปในตัวทำละลาย

2. เพอร์โคเลชัน

เพอร์โคเลชัน (Percolation) เป็นการปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายสารสำคัญออกมาโดยใช้เครื่องเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) วิธีการทำเพอร์โคเลชันคือนำผงสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายก่อน 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุผงทีละชั้นลงในเพอร์โคเลเตอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (column) ปลายเปิดทั้ง 2 ด้าน โดยด้านบนจะกว้างกว่าด้านล่าง เพื่อความสะดวกในการบรรจุผงสมุนไพร ส่วนปลายด้านล่างปิดเปิดได้ เพื่อที่จะสามารถควบคุมอัตราการไหลของสารสกัดหรือเพอร์โคเลตจากเพอร์โคเลเตอร์ได้ เติมตัวทำละลายหรือตัวทำลาย (menstrumm) ลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 0.5 cm ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงปล่อยตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วที่พอเหมาะ พร้อมกับเติมตัวทำละลายใหม่ลงไปเรื่อยๆ อย่าให้แห้งเก็บเพอร์โคเลตจนการสกัดสมบูรณ์โดยการตรวจสอบจากเพอร์โคเลตส่วนสุดท้าย นำเพอร์โคเลตที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

วิธีเพอร์โคเลชันจัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารจะใช้เพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายตัว และให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าหากัน

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง

การสกัดแบบต่อเนื่อง(Continuous extraction) โดยการใช้ซอกซ์เลตเอกแทรกเตอร์ (soxhlet extractor) ซึ่งเป็นระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ เมื่อได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ ตัวทำละลายจะผ่านผงสมุนไพรซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดออกมา เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแซมเบอร์ (extracting chamber) สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะวนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลืองแต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และ

ตัวทำละลายที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของตัวทำละลายแตกต่างไปจากเดิม และผลการสกัดที่ไม่ดี

4. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) มีหลายวิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชที่ใช้ ดังนี้

4.1 การกลั่น (distillation) ในทางอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ

การกลั่นโดยใช้น้ำ (water distillation) ใช้กับพืชแห้งซึ่งไม่ถูกทำลายเมื่อต้ม เนื่องจากพืชที่นำมากลั่นจะแช่อยู่ในน้ำเดือดทั้งหมดตลอดระยะเวลาการกลั่น วิธีนี้ใช้กลั่นน้ำมันจากเปลือกไม้ เช่น กลั่นน้ำมันสน (turpentine oil) จากยางสน เป็นต้น

การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) ใช้ได้กับพืชสดและแห้ง ซึ่งอาจถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกต้ม เช่น กานพลู จะบดให้เป็นผง เติมน้ำให้ท่วมผ่านไอน้ำเข้าไป ส่วนที่กลั่นได้จะมีทั้งน้ำมันและน้ำ ทำการแยกน้ำมันออกมา การกลั่นวิธีนี้สะดวกที่สุดและใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันในทางการค้า

การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (steam distillation) วิธีนี้ใช้กับพืชสด เช่น สะระแหน่ โดยนำพืชสดมาวางบนตะแกรง แล้วผ่านไอน้ำเข้าไปโดยตรง โดยไม่ต้องมีการหมักพืชด้วยน้ำก่อน จัดเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายน้อย

4.2 การบีบหรือการอัด

การบีบหรือการอัด (expression)ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้วิธีการกลั่นไม่ได้ เนื่องจากถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม ได้แก่ น้ำมันผิวมะนาว (lemon oil) น้ำมันผิวส้ม (orange oil)

การบีบที่นิยมคือ วิธีเอกคิวเอล (ecuelle method) ซึ่งใช้กับน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม (citrus oil) โดยเอาผลไปบีบบนรางที่มีเข็มแหลมๆ อยู่เข็มต้องยาวพอที่จะแทงผ่านผนังชั้นนอก (epidermis) เพื่อให้ต่อมน้ำมันแตกออกมา น้ำมันจะหยดลงไปในรางซึ่งเก็บน้ำมันได้

4.3 วิธีเอ็นฟอยเรนซ์

วิธีเอ็นฟอยเรนซ์ (enfleurange) ใช้กับน้ำมันหอมระเหยของกลีบดอกไม้ต่างๆ เป็นวิธีที่เก็บความหอมได้ดี แต่ก่อนใช้ในอุตสาหกรรมทำน้ำหอม (perfume) วิธีนี้จะใช้ไขมัน (fat) หรือน้ำมันไม่ระเหย (fixed oil) ที่ไม่มีกลิ่นเป็นตัวดูดซับ [ส่วนใหญ่ใช้ไขมันวัว (beef tallow) ร้อยละ 40 กับไขมันหมู (lard) ร้อยละ 60] โดยนำตัวดูดซับมาแผ่เป็นแผ่นบางๆ แล้วเอากลีบดอกไม้มาวางเรียงบนตัวดูดซับนาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนกลีบดอกไม้ใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนตัวดูดซับเอาน้ำมันหอมระเหยมากพอ จึงเอาตัวดูดซับมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยออกด้วยแอลกอฮอล์

4.4 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย

การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (extraction with solvent) ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) อาจใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น แอซีโทน (acetone) เมทานอล แอลกอฮอล์ เป็นต้น วิธีนี้จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการกลั่นที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลง และมีกลิ่นผิดไปจากธรรมชาติได้ จึงนำวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ต้นทุนการผลิตสูงกว่าวิธีการกลั่น

2.3.4 การเลือกวิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 90) กล่าวถึงการเลือกวิธีการสกัดสรุปได้ดังนี้ การสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลายๆ อย่าง ได้แก่

1. ธรรมชาติของสมุนไพร โดยพิจารณาดังนี้

1.1 ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อพืช สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน หากเป็นสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

1.2 ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในตัวทำละลาย ถ้าละลายได้ง่ายใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้ยากใช้วิธีเพอร์เลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

1.3 ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด

หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีง่ายๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. ความต้องการการสกัด

หากต้องการสารสกัดเจือจาง ควรใช้ใช้วิธีมาเซอเรชัน แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 101-102) กล่าวถึงการทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration) สรุปได้ดังนี้

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การระเหย

การระเหย(Free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากตัวละลาย โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารอินทรีย์ (organic solvent) ในการสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสาระสำคัญ เมื่อใช้ความร้อน

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ

การกลั่นในภาวะสุญญากาศ(Distillation in vacuo) เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากตัวทำละลายสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ(vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า rotary evaporator ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่จะกลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบนี้จะต้องต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต้อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

3. การทำให้แห้ง

การทำให้แห้ง(drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากตัวทำละลายจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของเข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dyer)

4. อัลตราฟิลเทรชั่น

อัลตราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) เป็นการนำสารสกัดด้วยน้ำ ทำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหลักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000

2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 19-55) และจาก http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri02/lesson.htm กล่าวโดยสรุปดังนี้

สารที่พบในพืชประกอบด้วย สารปฐมภูมิ (Primary Constituents) และสารทุติยภูมิ (Secondary Constituents) สารปฐมภูมิประกอบด้วยแป้ง โปรตีน ไขมัน เซลลูโลส ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารที่พืชสร้างจาก Intermedial basic metabolism มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ มีโครงสร้างง่ายๆ

ไม่ซับซ้อน สารทุติยภูมิกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางเคมี (Chemotaxonomy Group) ประกอบด้วยแอลคาลอยด์ (Alkaloid) ไกลโคไซด์ (Glycoside) แทนนิน (Tannins) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) สเตอรอยด์ (Steroid) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) ยางไม้ (Gums) และอื่นๆ

1. แอลคาลอยด์

แอลคาลอยด์เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีไนโตรเจน มีสมบัติเป็นเบส พบในพืช มีโครงสร้างซับซ้อนแตกต่างกัน มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถสกัดด้วยกรดอ่อน เมื่อนำสารสกัดไปทำปฏิกิริยากับเบสจะได้แอลคาลอยด์อิสระ ใช้เป็นเป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ แอลคาลอยด์ส่วนมากมีผลต่อความว่องไวเชิงสรีรวิทยา เช่น อะโทรเพน (Atropane) โคเคน (Cocatine) มีสมบัติคล้ายสารเสพติด และเป็นยาแก้ปวด ควินิน (Quinine) รักษาโรคมาลาเรีย

2. ไกลโคไซด์

ไกลโคไซด์เกิดจาก aglycone หรือ genin จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycone part) ละลายน้ำได้ดี ไกลโคไซด์จำแนกตามโครงสร้างของ aglycone ได้หลายประเภท เช่น คาร์ดิเอ็ก ไกลโคไซด์ (Cardiac glycisides) แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ (Antraw quinonne glycosides) ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides) ไซยาโนเจนนิติก ไกลโคไซด์ (Cyanogenatic glycosides) ไอโซไทโอไซยาเนท ไกลโคไซด์ (Isothiocyanate glycosides) ฟลาโวนอล ไกลโคไซด์ (Favonol glycoside) แอลกอฮอลิค ไกลโคไซด์ (Alcoholic glycosides)

3. แทนนิน

แทนนินพบในพืช มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อน เป็นกรดอ่อน มีรสฝาด เมื่อรวมกับโปรตีนจะให้สารที่ไม่ละลายน้ำ ใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้และใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ถ้ารับประทานเป็นประจำอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม เปลือกอบเชย ใบฝรั่ง เมื่อทาผิวหรือเยื่อบุอ่อนที่เป็นโรค หรือได้รับอันตราย แทนนิน จะสร้างฟิล์มปกคลุม ทำให้ผิวไม่ไวต่อความรู้สึกเจ็บปวด จะหยุดการหลั่งสารและทำให้หายคัน

4. ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารมีสีเช่นสารสีแดง (carthamim) จากดอกคำฝอย สารสีเหลือง (luleolin) จากดอกสายน้ำผึ้ง

5. สเตอรอยด์

สเตอรอยด์เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมนและยาต้านอักเสบ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยา

6. เทอร์ปีนอยด์

เทอร์ปีนอยด์ พบมากในพืช เป็นองค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหย เช่น ลิโมนีน (limonene) ซิโทรเนลลอล (citronellol) เป็นต้น

7. น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย เป็นของเหลวมีกลิ่นหอมเฉพาะ ระเหยได้ในอุณหภูมิห้อง เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำหรือการบีบใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง และ สมุนไพร และใช้ขับลม ฆ่าเชื้อโรค

8. ยางไม้

ยางไม้เป็นของเหนียวที่พบในพืช จะไหลออกมาเมื่อพืชถูกกรีด บางชนิดนำมาใช้ในการเตรียมยาจำพวกอีมัลชั่นในทางเภสัชกรรม เช่น กัมอะเคเชีย (gum acacia) และกัมทรากาคานท์ (gum tragacanth)

9. สารอื่นๆ

ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เอ็นไซม์ วิตามิน เรซิน และบาลซัม

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 19-55) และชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัต์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551 : 78-80) กล่าวโดยสรุปดังนี้

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหลานี้ไมจำเพาะเจาะจง และการใหผลบวกก็เปนเพียงการบอกถึงประเภทของสารผลิตภัณฑธรรมชาติบางชนิดเทานั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสรางคลายกันแต่เป็นสารตางกลุมกันจะใหผลบวกลวง ในอีกแงหนึ่งการใหผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเขมขนต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไมพอตอการตรวจสอบดวยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องตน ทางพฤกษเคมี ดังนี้

2.5.1 การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการเกิดตะกอน

โดยการนำสารตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาเคมีจะปรากฏสี หรือเกิดการขุ่น (turbidity) หรือเกิดตะกอน เป็นวิธีที่มีความไว (sensitive) สูง แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มสารเคมีและต้องระวังปริมาณน้ำยาตรวจสอบที่ใช้และภาวะที่เหมาะสม

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรต

ใช้ปฏิกิริยามอลลิช (Molisch’s test) การเกิดวงแหวนสีมวงแดงที่รอยตอระหวางชั้นของเหลวกับ Molisch reagent การตรวจสอบสมบัติการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing agent) ของโมโนแซค

คาร์โรด์ และไดแซ็กคาร์โรด์ ใช้สารละลายเฟทลิ่ง (Fehling's solution) ถ้ามีจะเกิดตะกอนแดงของคิวปรัสออกไซด์ (cuprous oxide)

การตรวจสอบน้ำตาลดีออกซี (deoxysugar) ใช้ปฏิกิริยาเคอเลอขคิเลียนี (Keller-Kiliani test) โดยละลายน้ำตาลในกรดน้ำส้มที่มีสารเฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride) ละลายอยู่เล็กน้อย เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถ้ามีน้ำตาลดีออกซีจะเห็นสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้นตรงรอยต่อของชั้นสารละลายและจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

2. กลุ่มแอลคาลอยด์

อัลคาลอยเปนสารที่มีฤทธิ์เปนดางและมีไนโตรเจนเปนองคประกอบในโมเลกุล true alkaloids ตองมีไนโตรเจนอยูใน heterocyclic ring และมีสูตรโครงสรางทางเคมีที่ซับซอน สามารถตรวจสอบดวยน้ำยาทดสอบเบื้องตน เชน Dragendorff's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีแดงอิฐหรือสีสม Kraut's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีสมน้ำตาลแดง Marme's reagent (potassium cadmium iodide) เกิด ตะกอนสีขาว และ Hager's reagent (picric acid) เกิดตะกอนสีเหลือง ทั้งนี้สารที่ใชตรวจสอบอัลคาลอยด เชน Mayer reagent, Dragendorff reagent, Wagner reagent และ Ammonium reineckate จะใหผลบวกลวงกับ coumarins, polyphenols, purines, amino acids, proteins และสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมักพบไดในสาร สกัดจากพืช ในทางตรงกันขามอัลคาลอยดไมทุกชนิดที่อาจพบไดในสารสกัดจากพืชจะใหผลบวกกับสารทดสอบเหลานี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสรางทางเคมี

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

ภายในโครงสรางทางเคมีประกอบดวย steroids nucleus, unsaturated lactone ring และ rare sugar ซึ่งมีความสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแตละสวนในโครงสรางทำไดดังนี้

1. Steroid nucleus ใชวิธี Liebermann-Burchard test ใหสีฟาหรือเขียว สารทดสอบตองแหงและปราศจากน้ำ
2. Unsaturated lactone ring ตรวจสอบดวย Kedde reagent หรือ Raymond reagent ใหสีมวง น้ำเงิน หรือ Baljet reagent ใหสีสม-แดง
3. Deoxy sugar ตรวจสอบดวย Killer-Kailiani test ใหวงแหวนสีมวงแดงที่รอยต่อระหวางชั้นของเหลว ทั้งนี้สารประกอบหลายชนิดในกลุม sesquiterpene lactones และ cardiacglycosides ที่มีโครงสราง เปน unsaturated lactones จะใหผลบวกกับการทดสอบดวย Kedde reagent, Baljet reagent และ Legal reagent

3.2 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์

ซาโปนินไกลโคไซด์เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีโครงสร้างทางเคมีแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของอะไกลโคน (aglycone) คือ สเตียรอยดอลซาโปจินิน (steroidal sapogenin) และไทรเทอร์พีนอยด์ซาโปจินิน (triterpenoid sapogenic) การตรวจสอบเบื้องต้น จากการเกิดฟองเมื่อเขยากับน้ำ ฟองรูปหกเหลี่ยมจะคงอยูนานกวา 15 นาที และคุณสมบัติการทำใหเม็ดเลือดแดง แตกออก นอกจากนี้ยังตรวจสอบดวย Liebermann-Burchard test โดย steroidal saponins ใหสีฟา-เขียว ในขณะที่ triterpenoid saponins ใหสีมวงแดง

3.3 กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

สารในกลุมนี้ประกอบดวยสวนของ aglycone ของanthraquinones และน้ำตาล ซึ่ง anthraquinones มีคุณสมบัติละลายไดดีในดาง แลวเกิดเปนสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึง ไฮโดรไลซ anthraquinone glycosides ดวยกรดหรือดาง หรือ $FeCl_3$ หรือ sodium dithionate ใหกลายเปน aglycone ของ anthraquinones แลวจึงสกัดออกมาดวยตัวทำละลายอินทรีย จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรียมาทดสอบกับดางจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกวา Borntrager test

3.4 กลุ่มไซยาโนจินิกส์ไกลโคไซด์

ทดสอบดวยวิธี Grignard test และ Guaiac-copper sulfate paper วิธีที่นิยมใช้กันมากคือวิธีที่ใช้กระดาษพิเครท เนื่องจากสามารถตรวจหากรดไฮโดรไซยานิกไดแม้ว่ามีปริมาณน้อยขนาด 1 ไมโครกรัมหรือต่ำกว่าได้ ในการจรวจหากรดไฮโดรไซยานิกมีข้อระวัง คือหากผลการตรวจสอบเป็นผลบวก มิได้หมายความว่าในพืชตัวอย่างนั้น มีไซยาโนจินิกไกลโคไซด์อยู่เป็นองค์ประกอบเสมอไป พืชนั้นอาจจะมีไซยาโนจีนิกไลปิด (cyanogenic lipid) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ได้โดยเอนไซม์ไลเปส (lipase enzyme) ที่อยู่ในพืชนั้นและให้กรดนี้ออกมาหากผลการตรวจสอบให้ผลบวกตั้งแต่ช่วงเวลา 16-24 ชั่วโมง ในกรณีนี้กรดไฮโดรไซยานิกที่ถูกปล่อยออกมาส่วนใหญ่เกิดจากสารเคมีที่ระเหยได้ตัวอื่นๆ มากกว่าจะมาจากไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ สารเคมีเหล่านี้อาจเป็นพวกไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) หรือพวกอัลดีไฮด์ที่ระเหยได้ (volatile aldehydes) หรือแม้แต่พวกสารอินทรีย์ไทโอไซยาเนส (thiocyanates) และไนไทรต์ (nitrites) ก็ให้ผลบวกในการตรวจสอบเช่นเดียวกัน ฉะนั้นช่วงเวลาที่ถือว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกควรอยู่ในช่วง 15 นาทีถึง 3 ชั่วโมงเท่านั้น

การตรวจหาไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ในพืชตัวอย่างควรทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกันแต่ใช้ภาวะเงื่อนไขที่แตกต่างกัน เช่น หลอดทดลองหนึ่งมีการเติมเอนไซม์อิมัลซิน(emulsion) กับ (linamarase) ลงไป แต่อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องเติม เพื่อให้แน่ใจว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกจริง เนื่องจากพืชบางชนิดถึงแม้จะมีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบจริง แต่อาจขาดเอนไซม์ เบตา-กลูโคซิเดสร่วมอยู่ในพืชนั้น จึงเติมเอนไซม์ทั้งคู่ลงในหลอดทดลองหลอดหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบกัน จะช่วยในการตัดสินใจว่าผลการตรวจสอบนั้นเป็นผลบวกจริง

3.5 กลุ่มไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์

การตรวจหาไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์อาจตรวจในสภาพของไกลโคไซด์หรือตรวจหาผลิตภัณฑ์ของไกลโคไซด์จากการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (enzymic hydrolytic products) เช่น ตรวจหาน้ำตาลกลูโคสหรือหมู่ซัลเฟตหรือโมเลกุลของไอโซไทโอไซยาเนต

การตรวจหาในสภาพไกลโคไซด์จัดเป็นวิธีที่นิยมและง่ายต่อการตรวจหา โดยนำพืชที่ต้องการมาต้มในแอลกอฮอล์เดือด เพื่อขจัดฤทธิ์ของเอนไซม์ จากนั้นทำการสกัดพืชด้วยน้ำต้มเดือดหรือเอทานอลหรือเมทานอล หากพืชมีองค์ประกอบเป็นพวกไขมันมากควรกำจัดไขมันออก แล้วทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator) และแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ซึ่งมีอะลูมินา (alumina) เป็นตัวดูดซับหรือมี เรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบได้ (anion exchange resin) เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออน นำไกลโคไซด์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกในสารละลายผสมของแอลกอฮอล์และน้ำ จากนั้นศึกษาเอกลักษณ์ของไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ด้วยเปเปอร์โครมาโทกราฟีหรือรงคเลขกระดาษ (paper chromatography) ในระบบตัวทำละลาย (solvent system) ของบิวทานอล-กรดแอซิติก- น้ำ (butanol-acetic acid-water) จากนั้นฉีดพ่นด้วย 0.2 โมลาร์ของ ซิลเวอร์ไนเทรต (silver nitrate) และอบให้แห้งด้วย 0.2 โมลาร์ของโพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) ถ้าหากเป็นไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์จะสังเกตเห็นจุดสีเหลือปรากฏขึ้นบนพื้นสีแดง

3.6 กลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์

ฟลาโวนอยดแบ่งออกเปน typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids การตรวจสอบสารในกลุมนี้ ทำไดดังนี้

1. Shibata’s reaction หรือ Cyanidin test เปนการตรวจสอบโครงสรางหลักของฟลาโวนอยด หากมีโครงสรางเปน benzo-pyrone ที่เปนโครงสรางสวนสำคัญใน flavones, flavonols, flavanones, flavanonols และ isoflavones จะเกิดปฏิกิริยากับแมกนีเซียมโดยมีกรดไฮโดรคลอริก เขมขนชวยละลายแมกนีเซียมและเรงปฏิกิริยา ไดผลบวกเปนสารละลายสีสม แดง หรือชมพู

2. Pew test ใชหลักการเดียวกันกับ cyanidin test แตใชสังกะสีเปนตัวเรงปฏิกิริยา ผลบวกจะใหสารละลายเปนสี สม แดง แตสีที่เกิดขึ้นจางกวาวิธี cyanidin test

3. Ferric chloride (FCl_3) test เปนการตรวจสอบ phenolic group ในโครงสราง ซึ่งพบไดใน flavonoids, tannins, coumarins, quinones และสารที่ประกอบดวย phenolic group ผลบวกจะเกิดตะกอนหรือสารละลายมีสีเขียว น้ำเงิน หรือดำ

4. Bromine water เปนการตรวจสอบสารในกลุม proanthocyanidins ที่เปนองคประกอบใน condensed tannins ผลบวกเกิดตะกอนสีเหลือง ซึ่ง flavonoids กลุมอื่น ๆ จะใหผลลบ

5. Molisch’s test เปนการทดสอบสารกลุมคารโบไฮเดรต หากพบน้ำตาลซึ่งเปนสวนหนึ่งของ glycosides จะพบวงแหวนสีมวงที่รอยตอระหวางชั้นของเหลว และในบางครั้งพบสีมวงกระจายอยูทั่วไปในชั้นลางที่เปนชั้นกรดซัลฟวริก เขมขน

6. การตรวจสอบโดยใชสารละลายกรดและดาง จะพบวาฟลาโวนอยดมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงสีไดตามสภาพความ เปนกรดหรือดาง หากเปนสารกลุม anthocyanins เมื่ออยูในสภาวะ

กรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สีม่วง หรือน้ำเงิน หากเป็นสารกลุ่ม chalcones และ aurones เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สี สมหรือแดง ทั้งนี้สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะให้ผลบวกกับ Shinoda test และกรดซัลฟวริก ในขณะที่สารพวก polyphenols ชนิดอื่นก็สามารถให้ผลบวกลวงกับสารทดสอบเหล่านี้ด้วย

4. กลุ่มคูมาริน

คูมารินเป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น benzo-pyrone หรือ phenylpropanoid lactone หรือ benzopyran-2-one ตรวจสอบด้วยการนำสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์มาละลายในเอธานอลแล้วกรอง จากนั้นนำไปชุบด้วยกระดาษ กรอง แล้วจึงหยดด้วย 10% NaOH จะพบการเรืองแสงที่ long wave UV (365 nm)

5. กลุ่มแทนนิน

แทนนิน เป็นสารจำพวก polyphenols แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1). hydrolyzable tannins ที่โครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วย phenolic acids และน้ำตาล เมื่อต้มในกรดหรือใช้เอนไซม์จะกลายเป็น กรดและน้ำตาล 2). condensed tannins มีโครงสร้างเป็น oligomer หรือ polymer ที่มี monomer เป็น catechins (flavan-3-ol) ซึ่งอาจจัดเป็น proanthocyanidins ของ flavonoids เมื่อนำไปต้มกับกรดจะเกิดตะกอนสีแดงที่เรียกว่า phloba phene จึงเรียกสารเหล่านี้ว่า phlobatannins และ 3). pseudotannins เป็นสารเชิงเดี่ยวมีขนาดโมเลกุลเล็ก แทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานและ ตกตะกอนอัลคาลอยด์ได้ จึงทำให้อัลคาลอยด์หมดฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแทนนินอาศัยการเกิดตะกอนระหว่าง แทนนินกับ gelatin, lead acetate, zinc acetate หรืออัลคาลอยด์ ได้ดังนี้

1. การตรวจสอบด้วย gelatin สารจำพวก true tannins จะเกิดตะกอนคงตัวกับ gelatin แต่สารจำพวก pseudotannins จะเกิดตะกอนที่ไม่คงตัว

2. การตรวจสอบด้วย bromine water หากเป็น condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine water

3. การตรวจสอบด้วย $FeCl_3$ หากเป็น hydrolyzable tannins จะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน ในขณะที่ condensed tannins จะเกิดตะกอนสีเขียว สำหรับสารอื่น ๆ ที่ประกอบด้วย phenolic group เช่น flavonoids และ coumarins จะเกิดสี เขียวหรือน้ำเงิน ในขณะที่สารพวก polyphenols อื่น ๆ จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลกับสารละลาย ferric chloride (5%) ในน้ำหรือเอธานอล

4. การตรวจสอบด้วย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น พบว่า condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. กลุ่มเทอร์พีนอยด์

การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์อาศัยหลักการเกิดสีกับน้ำยาทดสอบบางชนิด เช่น น้ำยา 2,6-ได-เทอร์-บิวทิว-พารา-ครีซอลในเอทานอล (2,6-di-tert-butyl-p-cresol in ethanol) ใช้ตรวจสอบเพนตาไซคลิกไทรเทอร์พีนอยด์ (pentacyclic trirerpenoids) ให้สีม่วง หรือใช้น้ำยากรดคลอโรซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ไทรเทอร์พีนอยด์ให้สีแดง เป็นต้น

2.5.2 การตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 77-79) กล่าวไว้สรุปได้ดังนี้

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ที่สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ โดยประเมินค่า R_f (Relative Front หรือ Retardation Factor) หรือค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ สีและความเข้มข้องสีเปรียบเทียบกับสารอ้างอิง (Reference substance) หรือสารมาตรฐาน (Standard substance) ในกรณีที่ไม่มีสารอ้างอิงหรือสารมาตรฐาน อาจใช้พิมพ์ลายนิ้วมือ (fingerprint) ของโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสมุนไพรนั้น เนื่องจากไม่มีพืชสมุนไพรใดที่มีองค์ประกอบและปริมาณสารที่เหมือนกันทุกอย่าง ทำให้ได้ลักษณะโครมาโทแกรมเฉพาะตัวของพืชสมุนไพรนั้น

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

สารประกอบ (Compound)	**ตัวดูดซับ (Adsorbent)**	**ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)**	**น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)**
น้ำมันหอมระเหย (essential oils)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน: เอทิลแอซีเทต (toluene :ethyl acetate) 73:7	วานิลลิน : กรดซัลฟิวริก (vanillin : sulphuric acid) ให้สีแดง หรือน้ำเงิน
แอลคาลอยด์ (alkaloids)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม(methanol chloroform) 85 : 15 หรือ โทลูอีน : เอทิลแอซีเทต: ไดเอทิลเอไมด์ (toluene : ethyl acetate : diethylamine) 70:20:10	น้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ให้สีส้ม
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เอทิลแอซีเทต : เมทานอล : น้ำ (ethyl acetate : methanol : water) 65:35:10 หรือ เอ็นบิวทานอล : กรดแอซีติก : น้ำ (n-buthanol : acetic acid :water) 4:1:5	น้ำยาเคดเด (Kedde reagent) ให้สีชมพู หรือน้ำเงินอมม่วงกับพวกคาร์ดีโนไลด์ (cardenolide) แอนติโมนีคลอไรด์ (antimony chloride) ให้สีน้ำเงินหรือเรืองแสงสีเหลืองอมเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm กับพวกบิวฟาไดอีโนไลด์ (bufadienolide)
ซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	ไซโคลเฮกเซน : ไดเอทิลเอมีน (cyclohexane : diethylamine) 9:1 หรือ คลอโรฟอร์ม : โทลูอีน: คลอโรฟอร์ม :เมทานอล: น้ำ (chloroform :methanol :water) 64:50:10	วานิลลิน: กรดซัลฟิวริก (vanillin :sulphuric acid) ให้สีน้ำเงิน

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ (anthraquuinone glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene : chloroform) 9:11 หรือ โทลูอีน : แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene : acrtone :chloroform) 40:25:35 หรือ แอซีเทต : เมทานอล : น้ำ(ethyl acetate:methanol:water) 100:13.5:10	ปฏิกิริยาบอนเทรเกอร์ (Borntraeger reaction) แอนทราควิโนนให้สีแดงหรือเรืองแสงสีแดงเมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) 365 nm แอนโทรน (anthrone) ให้สีเหลืองหรือเรืองแสงสีเหลือง
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม :แอซิโทน : กรดฟอร์มิก (chloroform : acetone : formic acid) 75:16.5 :8.5 หรือ เอทิลแอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate : methanol:water) 100:13.5:10 หรือ โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene: chloroform) 9:11	เนเซอรัล โปรดักส์ (ไดฟีนิลโบริล ออกซีเอทิลลามีน) -พอลีเอทิลีนไกลคอล) (natural products (dephenylboryloxyethylamine)-polyethylene glycol) แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) –ถ nm เรืองแสงสีเหลือง ส้ม หรือเขียว
คูมารินไกลโคไซด์ (coumarin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน :แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene :acetone: chloroform) 40 : 25:35 หรือ โทลูอีน:คลอโรฟอร์ม (toluene:chloroform) 9:11	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) หรือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) เรืองแสงสีน้ำเงินหรือเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm
อิริดอยด์ไกลโคไซด์ (iridoid glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : แอทิลแอซีเทต (toluene:ethyl acetate) 93:7 หรือ คลอโรฟอร์ม : กรดแอซีติก : น้ำ (chloroform : acetic acid : water) 80:10:5:2:6	กรดเกลือ-กรดแอซีติก (hydrochloric acid: acetic acid) ให้สีน้ำเงินหรือน้ำตาล
แทนนิน (tannin)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เอ็น-บิวทานอล: กรดแอซีติก: น้ำ (n-butanol:acetic acid:water) 4:1:5 หรือ เอ็นบิวทานอล:โทลูอีน: เมทานอล : กรดแอซีติก : น้ำ (n-butanol: acetic acid:water) 80:10:5:2:6 หรือ เบนซีน:ไดออกเซน : กรดแอซีติก 90:25:4	1% เมทานอลิกเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% methanolic ferric chloride) ให้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
แทนนิน (tannin)	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (chloroform: methanol) 95:5 เอทิลแอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate:methanol :water) 77:15:8	กรดซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ให้สีแดง

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547 : 77-79

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551 : 81-85) กล่าวโดยสรุปดังนี้

เทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่นิยมใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ไดแก่ Solid phase extraction (SPE) ,thin layer chromatography (TCL), column chromatography (CC) และ high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น ซึ่งการจะเลือกใช้เทคนิคใดนั้นจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการแยกสารและชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด ดังจะกล่าวถึงในรายละเอียดต่อไปนี้

1. Solid phase extraction (SPE)

Solid phase extraction เป็นการแยกสารโดยให้สารที่สนใจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่สารที่ไม่สนใจหรือไม่ต้องการจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะสาร ที่สนใจให้ออกจากคอลัมน์ในภายหลัง โดยทั่วไปสารที่สนใจจะจับอยู่กับวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) ซึ่งเป็นสารดูดซับ (adsorbent) ที่มีรูปร่างเป็นเม็ดเล็ก (bead) หรือเรซิน (rasin) ซึ่งอาจเป็นnormal phase, reverse phase หรือ ion-exchange media ก็ได้ และสามารถบรรจุไว้ในคอลัมน์ได้ซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นไซริงค์ (syring) ตัวอย่างเช่น นำสารที่สกัดด้วยน้ำมาแยกด้วย SPE ที่มีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase พบว่าสารที่มีขั้วต่ำจะติดอยู่ในคอลัมน์แต่สารที่มีขั้วสูงจะถูกชะออกมาก่อน จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่มีขั้นต่ำชะสารที่ติดอยู่ในคอลัมน์ออกมา ซึ่งสารที่ถูกชะออกมานี้ค่อนข้างจะบริสุทธิ์ ในปัจจุบันได้มีการนำ SPEไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีขั้วต่ำ โดยสารที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำจะจับอยู่กับเรซินที่เป็น reverse phase การแยกสารโดยปรับความแรงของ eluting power ให้เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อชะสารออกมาเป็นลำดับตามความมีขั้ว ใช้ศึกษาความเหมือนกันของสารเนื่องจากสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันจะจับกับวัฏภาคคงที่ได้เหมือนกัน และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนกันอีกด้วย จึงช่วยในการจัดสินใจว่าสารสกัดหยาบที่แยกด้วย SPE

มาแล้วจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่เคยแยกได้หรือไม่ นอกจากนี้ยังใช้ SPE เตรียมสารปริมาณมากให้บริสุทธิ์ขึ้น หรือนิยมใช้แยกสารสกัดหยาบก่อนที่จะแยกต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดอื่น ซึ่งการแยกในขั้นแรกด้วย SPE นี้เรียกว่า clean-up โดยจะแยกสารปนเปื้อนจำนวนมากออกไปจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สนใจ เช่น การใช้ SPEกำจัดสารที่มีขั้วจำนวนมากที่ไม่ต้องการและมีที่มาจาก buffer salt หรือส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ใช้SPE ในการเตรียมสารให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยผ่านสารละลายที่เจือจางลงไปในคอลัมน์ SPE จากนั้นชะสารที่ต้องการซึ่งติดค้างอยู่บนคอลัมน์ให้ออกมาโดยใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อยๆ นิยมใช้ SPE เพื่อเตรียมสารในปริมาณน้อยมาก เช่น เมแทบอไลท์ของยาในตัวอย่างเลือด สารปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในน้ำทะเล และสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ให้บริสุทธิ์มากขึ้น ก่อนนำไปแยกต่อไปด้วยเทคนิคอื่นทางโครมาโทกราฟี

2. Thin layer chromatography (TCL)

Thin layer chromatography สามารถแย่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของวัฏภาคคงที่ คือnormal phase TCL และ reverse phase TCL หากเป็น normal phase TCL สารที่มีขั้วต่ำจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วสูง ในขณะที่ reverse phase TCL สารที่มีขั้วสูงจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วต่ำ โดยทั่วไปนิยมทดลองแยกตัวอย่างด้วย TCL เพื่อหาค่า R_f ที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะทำการแยกจริงด้วย column chromatography (CC) ค่า R_f ที่ดีจะต้องเป็นค่าที่ไม่ทำให้สารที่สนใจติดค้างอยู่จุดเริ่มต้นหรือเคลื่อนที่ด้ำกลเกินไปจนใกล้หรือคิดตัก solvent front เมื่อหาสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เหมาะสมแล้วจึงนำตัวอย่างที่ต้องการแยกในปริมาณสูงขึ้นมาแยกในคอลัมน์ต่อไป อย่างไรก็ตามไม่สามารถนำสภาวะหรือสัดส่วนขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จาก TCL มาใช้กับ CC ได้โดยตรง เนื่องจากคอลัมน์เป็นการเคลื่อนที่แบบสองทิศทางและมีสมดุลเกิดขึ้นในคอลัมน์ แต่ TCL นั้นมีสมดุลระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตลอดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อต้องการนำสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ใน TLC ไปใช้ในการแยกสารด้วย CC จึงแนะนำให้ลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC ลงเล็กน้อย(ในกรณีที่วัฏภาคคงที่เป็น normal phase) และเพิ่มความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ทีใช้ใน TLC มากขึ้นเล็กน้อย (ในกรณีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase) เพื่อให้การแยกสารในคอลัมน์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

โดยทั่วไปมักใช้ TLC ร่วมกับ densitometric detector เพราะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แยกสารได้รวดเร็วสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสาร หรือใช้แยกสารเจือปนออกได้ นอกจากนี้ยังได้พัฒนามาเป็น high –performance TLC (HTLC) ซึ่งมีความหนาของวัฏภาคคงที่ที่บางลงและขนาดอนุภาคของวัฏภาคคงที่ที่เล็กลงด้วย จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดีขึ้น

3. Column chromatography (CC)

Column chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารที่ภายในคอลัมน์จะบรรจุวัฏภาคคงที่ชนิดต่างๆ เอาไว้ เมื่อบรรจุ (load) สารตัวอย่างที่ต้อการแยกให้บริสุทธิ์ไปบนคอลัมน์แล้ว จึงชะสารออกจากคอลัมน์ตามแบนด์ (band) ที่ปรากฏอยู่ในคอลัมน์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมต่อไป

การแยกสารตัวอย่างในคอลัมน์ออกเป็นแบนด์อาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีซึ่งหมายถึงการกระจาย (distribution) ของสารระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคคงที่ ดังสมการต่อไปนี้

$$K_D = \frac{[X]_{stationary\ phase}}{[X]_{mobile\ phase}}$$

ความสามารถในการแยกสารเกิดจากอันตรกิริยา (interaction) ของสารกับวัฏภาคคงที่และการแย่งกันจับกับวัฏภาคคงที่ระหว่างสารกับวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว และวัฏภาคเคลื่อนที่อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ ซึ่งจัดเป็น liquid chromatography (CL) และgas chromatography (GC) ตามลำดับ นิยมใช้ GC โดยเฉพาะ Gas-liquid chromatography (GLC) ในงานวิเคราะห์แต่ไม่สามารถใช้เทคนิคนี้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายได้ทุกชนิด โดยทั่วไปสามารถแบ่ง LC ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ การแบ่งตามลักษณะทางกายภาพของระบบ ได้แก่ CC และ planar chromatography (TLC และ paper chromatography) สำหรับ countercurrent chromatography เป็นการแยกสารด้วยของเหลว 2 เฟสที่แบ่งออกเป็นวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ โครมาโทกราฟีส่วนมากมักบรรจุวัฏภาคคงที่ไว้ในคอลัมน์และมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว และการแบ่งตามลักษณะการแยกสารที่อาศัยแรงกระทำระหว่างโมเลกุล หรือลักษณะการแยกที่แตกต่างกัน เช่น การดูดซับ (adsorption) การแยกส่วน (partition) ประจุ (charge) ขนาด (size) และการจับกันของชีวโมเลกุล (biological affinity) เป็นต้น

การดูดซับ (adsorption) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของโมเลกุลระหว่างผิวหน้าของวัฏภาคคงที่กับวัฏภาคเคลื่อนที่ ณ ที่สมดุลพลวัต (dynamic equilibrium) ซึ่งจะมีสารเข้าและออกระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ในปริมาณที่เท่าๆ กัน เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่า การดูดซับ(sorption) และการคาย(desorption) ตามลำดับ โดยอาศัยแรงทางพันธุเคมีที่เป็นแรงอ่อนๆ เช่น hydrogen bond , Van der Waals force และ dipole-dipole interaction สารที่นิยมนำมาใช้เป็นสารดูดซับ (adsorbent) จะต้องคงตัวและไม่เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย เช่น silica, cellulose, styrene, divinylbenzene, alumina และ carbon เป็นต้น

การแยกส่วน (partition) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของสารที่อาศัยหลักการสกัดระหว่างของ เหลวกับของ เหลวโดยวัฏภาคคงที่เป็นของเหลวชนิดหนึ่งที่เคลือบอยู่บน solid support เช่น คอลัมน์ของ เซลลูโลสที่เคลือบด้วยน้ำ หรือ silica TLC plate ที่ดูดซับน้ำเอาไว้บนผิวหน้า ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เข้ากันไม่ได้กับของเหลวที่เป็นวัฏภาคคงที่จึงทำให้เกิดการสกัดระหว่างขั้นของของเหลว (liquid-liquid extraction) ซึ่งเป็นข้อดีของการแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี อย่าไรก็ตามเทคนิคนี้ก็มีข้อเสียคือวัฏภาคคงที่ที่เป็นของเหลวจะถูกชะออกไปจากคอลัมน์พร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ และเกิดการละลายของวัฏภาคคงที่ได้

โดยทั่วไปแล้ววัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวมักเกิดพันธะเคมีกับตัวรองที่เฉื่อย (inert support) ได้เป็น bonded phase ซึ่งหมายถึงพันธะที่คงตัว เช่น พันธะระหว่าง silanol group (Si-OH) บน silica support กับ chlorosilane ซึ่งสารจำพวก silane มักเป็นสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain)ที่มีคาร์บอนมาเชื่อมต่อกันยาวประมาณ 1,2,6, 8 หรือ 18คาร์บอน ดังนั้น bonded phase chromatography หรือ modified partition chromatography จึงเป็นการแยก

สารที่อาศัยหลักการร่วมกันระหว่างการแยกส่วน (partition) และการดูดซับ (adsorption) สำหรับความแตกต่างระหว่าง normal phase กับ reverse phase คือ normal phase มีวัฏภาคคงที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น silica column มี silanol group ที่มีขั้วสูงกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ในขณะที่ reverse phase จะมีวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ เช่น สายไฮโดรคาร์บอนที่สร้างพันธะกับ silica support เป็นเสมือนวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำและมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำที่มีขั้วสูง ซึ่งอาจผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น เมธานอลหรืออะซีโตไนไตร์ (acetonitrite) อย่างไรก็ตาม หากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กำลังแยกอยู่นั้นมีขั้วต่ำและไม่ชอบน้ำ มันจึงอาจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ได้ ดังนั้นจึงแนะนำให้ติดตามการชะสารออกจากคอลัมน์โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่อยู่ในส่วนสกัดต่างๆ ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสารใดติดค้างอยู่ในคอลัมน์

ประจุ (charge) สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดเมื่อมีการปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของสารละลายด้วยกรดหรือด่างอาจจะทำให้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นถูกเปลี่ยนแปลงไปให้อยู่ในรูปของไอออนบวกหรือลบได้ ดังนั้นจึงนำคุณสมบัติการแตกตัวเป็นไอออนนี้มาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ดังต่อไปนี้

3.1 Ion-exchange chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารที่วัฏภาคคงที่ประกอบด้วยเมทริกซ์ที่ไม่ละลาย (insoluble matrix) บนผิวหน้ามีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นประจุลบหรือบวก ซึ่งหมู่ฟังก์ชันนี้จะสัมพันธ์กับไอออนตรงข้าม (counter-ion) ที่มีประจุตรงกันข้าม หลักในการแยกสารขึ้นอยู่กับความสามารถของไอออนสารตัวอย่างที่แข่งขันกับไอออนตรงข้ามในการเข้าจับกับวัฏภาคคงที่ เรียกระบบที่มีวัฏภาคที่เป็นประจุลบและไอออนตรงข้ามเป็นประจุบวกว่า cation- exchange chromatography และเรียกระบบที่มีวัฏภาคคงที่เป็นประจุบวกและไอออนตรงข้ามเป็นประจุลบว่า anion-exchange chromatography การแยกสารที่เกิดขึ้นจากแต่ละโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันที่ความแรงในการจับกับ exchange site จึงสามารถชะสารตัวอย่างออกมาตามลำดับโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะการแตกตัวของสารที่มีประจุ หรือการเพิ่ม ionic concentration ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลเพิ่มการแย่งจับที่ exchange site และมีผลไล่ที่ไอออนของสารตัวอย่าง ความสามารถในการจับของสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของไอออนสารตัวอย่างและหมู่ฟังก์ชันบน ion exchange rasin ไอออนสารตัวอย่างที่จับกับวัฏภาคคงที่ได้ดีจะอยู่ในคอลัมน์ได้นานและถูกชะออกมาช้ากว่า ในทางตรงกันข้ามไอออนสารตัวอย่างที่จับได้ไม่มีจะถูกชะออกมาเร็วกว่า

3.2 Ion-pair chromatography / ion-suppression chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารที่สามารถแยกไอออนสารตัวอย่างได้ด้วยวัฏภาคคงที่มีขั้วต่ำ เช่น reverse phase modified partition column โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อลดการแตกตัวเป็นไอออนของโมเลกุลสารตัวอย่าง ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างมีความเป็นกลาง(ไม่มีขั้ว) และสามารถจับกับวัฏภาคคงที่ที่ไม่มีขั้วได้ ในทำนองเดียวกัน ion-pair chromatography จะมีวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยโมเลกุลสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถแตกตัวได้ (ionizable group) และมีส่วนที่ชอบไขมัน (lipophillic region) ซึ่งทำหน้าที่เป็น

ไอออนตรงข้าม (counter-ion) ที่จะทำให้เกิด reversible ion-pair กับสารตัวอย่าง โดยมี ionic modifier ทำหน้าที่จับคู่ (pairing) กับไอออนสารตัวอย่าง ในสารละลายแล้วทำให้เกิดสปีชีส์ที่ไม่มีขั้วที่สามารถแยกส่วน (partition) เข้าไปในวัฏภาคคงที่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุแล้วเกิดเป็นคู่ไอออน (ion – pair) กับสารตัวอย่างได้ ข้อดีของเทคนิคนี้คือใช้แยกสารตัวอย่างที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ในระบบเดียวกัน

ขนาด (size) โครมาโทกราฟีที่แยกสารตามขนาดของโมเลกุลนั้นจะไม่อาศัยการจับกันระหว่างสารตัวอย่างและวัฏภาคคงที่ การแยกสารด้วยเทคนิค size exclusion chromatography จะครอบคลุมถึง gel permeation chromatography และ gel filtration ซึ่งมีลักษณะของ packing material เป็นเม็ดเล็ก (bead) ที่ทำจากโพลิเมอร์ เช่น polyacrylamide , agarose หรือ silica โดยมีระดับของ polymer crosslinking ช่วยควบคุมความพรุนของเม็ดเล็กเหล่านี้ โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนได้และจะถูกชะออกมาก่อนในขณะที่โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่สุดจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดเล็กที่สุดได้ ที่ว่างใน cross-linked polymer ทำหน้าที่เสมือนวัฏภาคคงที่ ซึ่งโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สุดจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดเล็กและไหลออกมาในทิศทางตรง ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างเม็ดเล็ก โมเลกุลที่มีขนาดรองลงมาจะมี diffusible volume มากกว่าทำให้ถูกชะออกมาได้หลายทิศทางและใช้เวลาในการชะออกมาจากคอลัมน์นานกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ โมเลกุลที่เล็กที่สุดสามารถแทรกเข้าไปในรูพรุนขนาดเล็กที่สุดได้และจะถูกชะออกมาทีหลังสุด size exclusion chromatography เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายมากและไม่ทำลายโครงสร้างทางเคมีของสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการแยกชีวโมเลกุลที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่าง กันมาก เช่น ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออกจากเมแทบอไลท์ที่มีขนาดโมเลกุลเกล็กกว่ามาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากเมแทบอไลท์ทุติยภูมิมักมีขนาดโมเลกุลเล็กและมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียง กันมาก ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้ size exclusion chromatography ในการแยกสารเหล่านี้ ทั้งนี้ มีข้อยกเว้นสำหรับ Sephadex LH20 ที่ยังคงนิยมนำมาใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพราะมีข้อดีที่สามารถใช้กับวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ไม่ใช่น้ำ (nonaqueoese) ได้

การจับกันของสารชีวโมเลกุล (biological affinity) มีความสัมพันธ์กับเทคนิค affinity chromatography ซึ่งเป็นการแยกสารที่ขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจง(specific interaction) ของชีวโมเลกุล เช่น antibody-antigen interaction, enzyme-inhibitor interaction, DNA-DNA binding, DNA-protein interaction หรือ receptor –agonist/antagonist interaction โดยที่ลิแกนด์ (ligand) หรือรีเซปเตอร์ (receptor) จะจับกับ packing material ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) และทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ ของผสมจะไหลผ่านคอลัมน์โมเลกุลที่มีความชอบจับอย่าจำเพาะเจาะจง (specific affinity) กับลิแกนด์จะถูกจับอยู่ในคอลัมน์ในขณะที่โมเลกุลอื่นที่ไม่มีความชอบจับอย่างจำเพาะเจาะจงจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ การชะสารทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและ/หรือองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ซึ่งจะทำให้แรงที่จับกันระหว่างสารตัวอย่างและลิแกนด์นั้นอ่อนลง โดยทั่วไปแล้วการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจะหมายรวมถึงการแยกสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นการแยกสารด้วยเทคนิคนี้จึงนับว่าเป็นแนวทางที่ดีในการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่อาศัยความจำเพาะเจาะจงทางชีวภาพ (biological specicity) อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกเมแทบอไลท์ทุติยภูมิในปริมาณมากด้วย affinity chromatography เนื่องจากเทคนิคนี้ทำ

ได้ยากและต้องใช้เวลานานมากในการเตรียมลิแกนด์ที่เหมาะสมให้มีปริมาณเพียงพอต่อการแยกสารแต่ละครั้ง หากสารผสมเมื่อเริ่มต้นนั้นซับซ้อนเช่นในกรณีสารสกัดหยาบจากพืชหรือจุลินทรีย์ทีมักมีสารอื่นเข้ามารบกวนการแยกหรือขัดขวางการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์และลิแกนด์ (receptor –ligand interaction) หรือสารเหล่านี้เข้าไปดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับวัฏภาคคงที่ จะทำให้การแยกสารไม่สมบูรณ์ และยิ่งไปกว่านั้นการได้สารกลับคืนมา(recovery) จะขึ้นอยู่กับแรงที่จับกันอย่างผันกลับได้ ซึ่งการรบกวนของสารหลายชนิดอาจขัดขวางการได้สารกลับคืนมาด้วย

4. Gradient high performance liquid chromatography (Gradient HPLC)

Gradient high performance liquid chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงความต่างระดับของความมีขั้ว (gradient) ของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ตลอดเวลา เพื่อแยกของผสมและชะองค์ประกอบทุกชนิดให้ออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับความมีขั้ว การชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย gradient elution มีข้อดีกว่า isocratic elution ซึ่งมีสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์คงที่ตลอดเวลา ตรงที่สามารถแยกสารที่มีขั้วใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถแยกสารที่มีขั้วสูงและต่ำออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการคู่ต่อมาการใช้ประโยชน์ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเป็นจำนวนมาก เช่น HPLC-UV, GC-MS, HPLC-MS และ HPLC-NMR เป็นต้น การวิเคราะห์สารที่แยกออกมาจาก HPLC column ด้วย UV และ NMR จะสามารถนำสารนั้นกลับคืนมาได้ ในขณะที่การวิเคราะห์ GC และ MS ไม่สามารถนำสารที่ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือดังกล่าวกลับคืนมาได้ อย่างไรก็ตามสารต่างชนิดกันอาจดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ ทำให้ UV มีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่ำกว่า MS นอกจากนี้ MS ยังมีความไว (sensitivity) ที่สูงกว่า UV จึงสามารถวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำมากได้ การแยกสารด้วย GC มีข้อด้อยกว่าการแยกด้วย HPLC เนื่องจาก GC เหมาะสำหรับการแยกสารที่สามารถระเหยได้และทนต่อความร้อน หากสารที่ต้องการแยกระเหยไม่ได้จะต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ที่ระเหยได้เสียก่อน จึงทำให้มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและเสียเวลามาก ดังนั้นในปัจจุบันจึงมักพบว่า HPLC-MS เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการศึกษาองค์ปีระกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2546 : 56-65) กล่าวถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชกรรมและการใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษาสรุปได้ดังนี้

2.7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. คุณสมบัติทางสรีระวิทยาและทางเคมี เช่นการละลาย
2. คุณสมบัติทางเคมี เช่น เรโซแนนซ์ ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น ชนิดของพันธะเคมี
3. ข้อควรพิจารณา เช่น ขนาดของโมเลกุล สเตอริโอเคมี เป็นต้น

2.7.2 Bio-assaying

1. หลักในการคัดเลือกวัสดุจากพืชสมุนไพร เช่น การสกัดสารและการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารก่อนจะศึกษาผลทางชีวภาพ การวางแนวทางการดำเนินงานตามเงื่อนงำจากการประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในยาสมุนไพรและความเชื่อตามขนบธรรมเนียม การตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีววิทยา ชีวเคมี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีและกายภาพ

2. วิธีการคัดเลือกทางเภสัชวิทยา เป็นการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรีย เห็ดรา โปรโตซัว การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาโรคเช่น โรคมะเร็ง การอักเสบ วิธีการเบื้องต้นที่ใช้เช่น Brine shrimps, Antibacterial screening, Hippocratic screening เป็นต้น

2.7.3 การสำรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนา

การศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความหลากหลายของผลทางชีวภาพและสูตรโครงสร้างของสรออกฤทธิ์และเป้าหมายด้านเภสัชกรรมในการบำบัดรักษาที่ชัดเจน โดยอาศัยการพัฒนาในหลายสาขาวิชา เช่น พันธุกรรม ชีวโมเลกุล วิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิคที่ทันสมัย

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เกสร นันทจิต (2541) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของรากหญ้าแฝกพบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Ps. Aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 67120, *C.albicans, A.flavus, T.mentagrophytes, และ M. gypseum.* ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 % ขึ้นไป สำหรับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 5 ชนิด พบว่ามีสาร 1 ชนิดที่มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) *T.mentagrophytes* เท่ากับ 78 μg/ml และได้ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนายารักษาโรคกลากได้

ชฎารัตน์ ดวงรัตน์ (2544) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองของสารสกัดจากต้นกระทุ่มน้ำเพื่อวัดความเป็นพิษและบ่งชี้ส่วนของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบว่า สารสกัดหยาบ ที่เป็น Crude alkaloids สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.62 μg/ml ซึ่งสูงกว่าสารมาตรฐาน 5-FU ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.47 μg/ml

เกสร นันทจิต (2545) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของใบขันทองพยาบาท โดยการสกัดสารจากใบขันทองพยาบาท ด้วย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี Agar Dilution Methods พบว่าสารสกัดหยาบ จาก เฮกเซน และเมทานอล ไม่มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *C.albicans* ATCC 90028, *A.flavus และ* และ *M. gypseum.ส่วนสารสกัดจาก* ไดคลอโรมีเทน มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *T.mentagrophytes* และ *T.rubrum* ต่ำ โดยมีค่าMIC เท่ากับ 3200 mg/ml

บุญส่ง คงคาทิพย์และคณะ (2545) ศึกษาการสกัด การแยกสารออกฤทธิ์จากต้นเบาหวานเพื่อแยกสารออกฤทธิ์ที่มีผลในการรักษาโรคเบาหวานและหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์พบว่า allantoin เป็นสารหนึ่งในต้นเบาหวานที่ออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด และการนำต้นเบาหวานต้มด้วยน้ำ น้ำที่ต้มเมื่อดื่มในปริมาณที่พอเหมาะ จะสามารถรักษาโรคเบาหวานได้

ปัทมาวดี เสตะกัณณะ. (2545) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย การผลิตยาต้านจุลชีพจากสมุนไพรไทยเป็นทางเลือกหนึ่งของการช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และการที่จะผลิตยาได้นั้น ต้องมีการศึกษาวิจัยที่ครบวงจร ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลเบื้องต้นด้านการศึกษาฤทธิ์ต้าน จุลชีพของสมุนไพร การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพร 10 วงศ์ 20 ชนิด จำนวน 48 สารสกัด โดยวิธี Agar dilution ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 21 ชนิด 24 สายพันธุ์ และเชื้อรา 1 สายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่า สมุนไพร 17 ชนิด จำนวน 35 สารสกัด มีฤทธิ์ต้านจุลชีพบางชนิดได้ และไม่พบสารสกัดจากสมุนไพรใดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ทุกชนิด ในจำนวนนี้มีสมุนไพร 7 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้หลายชนิด และสมควรนำไปศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตยา ได้แก่ กะเม็ง (Eclipta prostrata L.) , กระเจี๊ยบแดง (Hibiscus sabdariffa L) , โด่ดอกขาว (Elephantopus mollis H.B.K.) , ปีบ (Millingtonia hortensis L.f.) , ผักขมหิน (Boerhavia diffusa L.) , ยมหิน (Chukrasia tabularis A. Juss.) และเหงือกปลาหมอ(Acanthus ebracteatus Vahl)

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และคณะ (2546) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี โดยจากการนำ สารสกัดจาก เอทิลแอซิเตต และ เอทานอล 22 ชนิด ซึ่งได้มาจากพืชในจังหวัดอุบลราชธานี 11 ต้น นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สิ่งสกัดจากใบพอกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลางในการต้านอนุมูลอิสระ และสิ่งสกัดจากเอทานอลของใบการเวก มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

วาทินี จตุรพรชัย (2546) ศึกษาการสกัดและผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศไทย โดยการทดสอบสารสกัดหยาบชั้นเอทอลแอลกอฮอล์ของพืชสมุนไพร และเครื่องเทศ 24 ชนิด ในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย 8 ชนิด ด้วยวิธี Well assay พบว่าสารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli, S. aureus, S.derby, S.Typhi, S. Typhimurium และ Lactobacillus sp.* ได้

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547) ศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง พบว่าเมล็ดมะเกี๋ยงมีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟาโวนอยด์ ซาโปนิน แอนทราควิโนนกลัยโคซายด์และแทนนิน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี ABTS Assays และ DPPH Assays พบว่าสารสกัดด้วย n-butanol และ ethyl acetate (F3และF4) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนอื่น โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 1.5108 และ 1.3943 กรัม/กรัม ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่า BHA , Quercetin แต่มีฤทธิ์มากกว่า BHT, Kaempferol และ Rutin และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี DPPH Assays พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ น้อยกว่า BHA, Quercetin , BHT แต่มีฤทธิ์มากกว่า Kaempferol

สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี่ยวไชยพันธุ์ (2548) ศึกษาการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแกว่นป่า โดยใช้วิธี DPPH และ เทคนิคโครมาโทกราฟฟี่ผิวบาง (TLC) พบว่าสารสกัดเมทานอลของผลมะแกว่นป่ามีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายชนิด การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ใช้คอลัมน์ซิลิกาเจลและคอลัมน์ของเรซิน Diaion HP-20 ตามลำดับ พบว่าสาารถแยกสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยการใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลในอัตราส่วน 70 : 30 และสารต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้เป็นสารประกอบพวก Condensed tannin

เชฏฐ รัตนาจารย์ (2548) ศึกษาผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์พบว่าสารสกัดไพรในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดี มีบริเวณยับยั้งระหว่าง 7.87-19.27 มิลลิเมตร แต่ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้น้อย ส่วนสารสกัดไพลชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเมทานอลยับยั้งแบคทีเรียได้ดี

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิวของสารสกัดและน้ำหมักของพืชไทย พบว่าสารสกัดและน้ำหมักจากเปลือกมังคุด กระชายดำ มะขามป้อม มะเกี๋ยง ขมิ้นชันและใบบัวบก สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Propionibacterium acnes* ได้ดีแตกต่างกัน โดยสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม เปลือกมังคุด กระชายดำ ขมิ้นชัน ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม กัดเปลือกมังคุด ขมิ้นชัน กระชายดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มะขามป้อม กระชายดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุดเท่านั้น และเมื่อนำน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) โดยวิธี Broth dilution พบว่า ค่า MIC ของ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 1.5625 % และ *Propionibacterium acnes* เท่ากับ 6.25 %

Arina C.U. และคณะ (2002) ศึกษาสารต้านมาลาเรียจาก Parinari capensis พบว่าฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารสกัดจากเปลือกของ Parinari capensis (Chrysobalanceae ที่สกัดด้วย ปิโตรเลียมอีเทอร์ และไดคลอโรมีเทน จากการทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัด แยก ไดเทอร์ปีน แลคโตนได้ 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียโดยมีค่า IC_{50} 0.54 0.67 และ 1.57 mg/mL.

Pornpimon Mayachiew, Sakamon Devahastin(2007) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดจาก gooseberry and galangal โดยการสกัดสารจาก Indian gooseberry (Phyllanthus emblica Linn.) and galangal (Alpinia galanga) ทดสอบกับ Staphylococcus aureus 2 วิธี คือ disc diffusion และ agar dilution methods พบว่ามีค่า MIC 3.97 และ 0.78 mg/ml ตามลำดับ ค่า MBC 13.97 และ 2.34 mg/ ml ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดด้วยวิธี b-carotene bleaching method มีค่าเท่ากับ 86.4% and 70.3% ตามลำดับ ค่าฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu method มีค่า 290.470.7 and 40.970.2 mg/g plant extract (in GAE) ตามลำดับ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้อบ
2. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
5. 96 well plate
6. Appendoft
7. Sterile Plastic pipette
8. Milipore filter
9. Filter Disc
10. ชุดกรองสาร
11. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน
12. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3.1.2 สารเคมี

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
2. ethanol
3. Methanol
4. Hexane
5. Ethylacetate
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 พืชสมุนไพร และจุลชีพ

3.2.1 มะเดื่อ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Ficus hispida Linn. f.

ชื่อวงศ์ : MORACEAE

3.2.2 จุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. *Streptococcus mutans* ATCC 27175
3. *Vibrio cholerae*
4. *Vibrio paraheamolyticus*

ชนิดของจุลินทรีย์	ลักษณะโดยทั่วไป	การก่อโรค
1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923	แบคทีเรียทรงกลม เรียงตัวเป็นลักษณะคล้ายพวงองุ่น แกรมบวก	เป็นสาเหตุของโรคฝี หนอง กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด กลุ่มอาการผิวหนังกำพร้าหลุดลอกหรือRitt's disease และโรคอาหารเป็นพิษ
2. Streptococcus mutans ATCC 27175	แบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก	เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในช่องปากทำให้เกิดโรคฟันผุ
3. *Vibrio cholerae*	แบคทีเรียรูปท่อนโค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอหิวาห์ตกโรค เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้เล็ก และสร้างสารพิษที่เรียกว่าcholera toxin บนเยื่อบุเซลล์ของผนังลำไส้ทำให้เกิดการขับเกลือแร่ โพแทสเซียม โซเดียมคลอไรด์ ไบคาร์บอเนต และน้ำออกจาก เซลล์สู่โพรงลำไส้ ทำให้ผู้ป่วยคลื่นไส้อาเจียนอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง
4. Vibrio paraheamolyticus	แบคทีเรียรูปท่อนโค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ กระเพาะอาหาร-ลำไส้อักเสบเชื้อนี้มักปนเปื้อนไปกับอาหารทะเล พวก กุ้ง ปู ปลา หอย จะเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุกๆ 10 ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ ทำให้มีอาการท้องร่วงรุนแรง มีอุจจาระเหลวเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือน กุ้งเน่า มักมีอาการปวดเกร็งที่ท้อง ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมีอาการอาเจียนร่วมด้วย มีระยะฟักตัวค่อนข้างสั้น คืออาจเกิดอาการในประมาณ 15-24 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหาร

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. ทำการสำรวจอนุกรมวิธานของพืชสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ มะเดื่อและรับรองพืชสมุนไพรตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์(Voucher Specimens)

2. นำส่วนใบของมะเดื่อ มาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 °C

3. นำส่วนใบของมะเดื่อที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารพืชสมุนไพร

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากมะเดื่อใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูงคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ ดังนี้

1. ส่วนใบของมะเดื่อ ที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 0.5 Kg แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือเฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2. นำของผสมมากรองแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C จะได้สารสกัดหยาบ(Crude extract) ของชั้นเฮกเซน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นต่อไป

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

3.3.3 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้ไปทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ ดังนี้.

1. Alkaloids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 5% HCl 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ทดสอบกับ Dragendorff's test, Marme's test, Mayer's test, Wanger's test, และ Kruat's test สังเกตสีและตะกอนที่เกิดขึ้น

2. Tannins และ phenolic compounds สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายในน้ำ 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ถ้าขุ่นหยด 4-5 หยด 10% NaCl กรอง นำมาทดสอบกับ gelatin solution, gelatin salt solution, 1% $FeCl_3$, Br_2 water, Vanilin, 40% Formalin / HCl, และ Lime water

3. Triterpenes และ Steroids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายด้วย $CHCl_3$ 1-2 ml นำมาทดสอบวิธี Liebermann Burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H_2SO_4 1 หยด ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

4. Flavonoids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน Petoleum ether 4 ml กรอง แล้วเอา residue ละลายใน 80 % ethanol 8 ml นำมาทดสอบ Cyadinin test โดยนำลวด Mg มาใส่ ในหลอดทดลอง 3-4 ชิ้น แล้วค่อยหยด conc. HCl 3 หยด สังเกตฟองที่เกิด ทิ้งไว้ให้ละลายจนหมด จากนั้น เติมน้ำ 1 ml และ Octyl alcohol 1 ml สังเกตสีในชั้นของ Octyl alcohol

5. Antraquinones สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 0.5 M KOH 10 ml แล้วเติม 3% H_2O_2 1ml ต้มบนหม้ออังไอน้ำ 10 นาที กรอง ทิ้งให้เย็น หยด CH_3COOH จนเป็นกรด สกัด ด้วย C_6H_6 10 ml นำมาทดสอบ Modified Borntragers test โดยนำชั้นของ C_6H_6 ไปหยด NH_3 T.S. ตั้งทิ้งไว้

6. Cardiac glycosides สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 10% Lead acetate 10 ml อุ่น 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง สกัดด้วย $CHCl_3$ 5ml 3 ครั้ง นำมาทดสอบวิธี Liebermann burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H_2SO_4 1-2 หยด ลงใน หลอดทดลอง สังเกตสีที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพสำหรับโดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราในที่นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauerและคณะ(1966) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์) มีวิธีการทดสอบดังนี้นำแบคทีเรียชนิดต่างๆที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ที่บ่มเพาะได้มาปรับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนแบคทีเรีย 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำแบคทีเรียที่เตรียมได้ไปเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่ว 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียชนิดต่างๆ บนหน้าวุ้น หลังจากนั้นนำแผ่นดิสต์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DMSO(Dimethyl sulfoxide) (เจือจางลง 2 เท่า ตามลำดับ) วางบนผิววุ้นที่มีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย แต่ถ้าเป็นราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของรา

3.3.5 การแยกสารให้บริสุทธิ์

การแยกสารให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคทาง column chromatography โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ โดยชะด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยค่อยๆเพิ่มขั้วของตัวทำละลายและเก็บ fraction เมื่อระเหยตัวทำละลายออกแล้วตรวจสารที่ได้ด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) และการตกผลึกจนได้สารบริสุทธิ์

3.3.5.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี

ทำการแยกสารโดยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนี้

1. นำสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดใส่ในขวดเล็ก และละลายด้วยตัวทำละลายชนิดเดิม

2. เตรียมแผ่น TLC ให้มีขนาดพอเหมาะประมาณ 25 เซนติเมตร แล้วจุด (spot) สารสกัดที่ละลายแล้วในขั้นตอนที่ 1 ลงบนแผน TLC โดยใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) จุดสารสกัดที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC 2 จุด โดยให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 0.5 เซนติเมตร และแต่ละจุดห่างกันพอประมาณ ด้านบนของแผ่น TLC ขีดระดับตัวทำละลาย (solvent front) ไว้

3. เตรียม TLC tank โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมใส่ในขวดแก้ว นั้นนำกระดาษกรองมาใส่ลงในขวดแก้วโดยให้กระดาษกรองทาบผิวด้านในขวดแก้ว แล้วเตรียมแผ่นกระจกปิดไว้เพื่อให้ ขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

4. นำแผ่น TLC ที่จุดสารสกัด แล้วไปจุ่มลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายซึ่งเตรียมไว้ ปิดฝาขวดแก้วปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับตัวทำละลาย (solvent front) ที่กำหนดไว้ นำแผ่น TLC ออกจากขวดแก้ว ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง

5. นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต(UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

6. นำแผ่น TLC ไปย้อมด้วย developing solvent แล้วนำไปอุ่นบนเตาไฟฟ้า (hot plate) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงสี

7. เตรียมตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.3.5.2 การแยกสารสกัดโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เตรียมคอลัมน์แก้วโดยใช้ขาตั้ง (stand) และตัวจับ (clamp) จับคอลัมน์ให้ตั้งฉากกับพื้น อุดปลายคอลัมน์ด้วยสำลีสะอาดจำนวนเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายเฮกเซนลงไปประมาณครึ่งคอลัมน์เปิดก๊อกปิดเปิด (stopcock) ด้านล่างคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อไล่ฟองอากาศและป้องกันสำลีย้อย นำซิลิกาเจล ผสมกับตัวทำละลายเฮกเซนให้เข้ากัน เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์ แล้วนำไปบรรจุในคอลัมน์ ค่อยๆ บรรจุซิลิกาเจล ลงไปให้ติดต่อ และสม่าเสมอกันพร้อมทั้งเปิดที่ก๊อกปิดเปิดด้านล่างคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านอย่างช้าๆ และค่อยๆ ปรับผิวหน้าให้เรียบโดยการเคาะคอลัมน์เบาๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์อย่างสม่าเสมอ เมื่อบรรจุซิลิกาเจลเสร็จแล้วก็ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 5 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าซิลิกาเจลจึงปิดที่ก๊อกปิดเปิดด้านล่างของคอลัมน์ นำสารสกัดหยาบมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน และบรรจุลงในคอลัมน์ช้าๆ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปรับผิวหน้าให้เรียบ ฉีดล้างด้านในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นปล่อยให้ระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจลและจึงชะลอคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย โดยเรียงความมีขั้วน้อยไปหาขั้นมาก ได้แก่ สารเฮกเซน 100 เปอร์เซ็นต์ สารผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน 5 10 20 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ สารผสมระหว่างเฮกเซนกับเอธิลอะซิเตรต 10 20 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมตัวทำละลายแต่ละชนิดครั้งละ 200 มิลลิลิตรลงไป ทาการเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาครั้งละ 20 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ถูกชะออกมาแต่ละชั้นมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) จากนั้นจึงทำการรวมสารที่เหมือนกันในแต่ละชั้น (fraction) เข้าด้วยกันและนำไปทำการระเหยก่อนนำไปทำการทดสอบต่อไป

3.3.6 การวิเคราะห์โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมี

การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้ อัลตราไวโอเลตและวิสิเบิลสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet and Visible Spectroscopy) อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี(Infrared Spectroscopy : IR) แมสสเปกโทรเมตรี (Mass Spectrometry:MS) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy : NMR)

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ โดยศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้น การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ และ การศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ มีผลการทดลองเป็นดังนี้

4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

Phytochemical screening	ผลการทดสอบ
1.alkaloids	+
2.condensed tannins	+
3.phenolic compounds	-
4.flavonoids	+
5.triterpenes	+
6.steroids	+
7.cardiac glycosides	-
8.antraquinones	+

จากการตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบของมะเดื่อพบสารในกลุ่ม alkaloids condensed tannins flavonoids triterpenes steroids และ antraquinones

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบ

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อที่ได้สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC) ของเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (μg/ml)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	62.50	15.60	15.60
2	*Streptococcus mutans* ATCC 27175	>1000	125.00	31.25
3	*Vibrio cholerae*	1000	31.25	7.80
4	*Vibrio paraheamolyticus*	1000	250	15.60

สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเฮกเซนเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 μg/ml

สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเอทิลแอซิเตต เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจากมากไปหาน้อยตามลำดับดังนี้ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio cholerae* , *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ *Vibrio paraheamolyticus* ได้โดยมีค่า MIC 15.60, 31.25, 125.00 และ 250 μg/ml

สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเมทานอล เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจากมากไปหาน้อยตามลำดับดังนี้ *Vibrio cholerae* , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Vibrio paraheamolyticus* และ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ได้โดยมีค่า MIC 7.80, 15.60 และ 31.25 μg/ml

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของชั้นของสารสกัดจากเมทานอล

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลมาแยกให้บริสุทธิ์จะได้สารจำนวน 7 fraction จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 7 ชั้น ของเมทานอลมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC) ของเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดชั้นเมทานอลจากใบของมะเดื่อ

จุลชีพ	MIC (μg/ml)						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
1.Staphylococcus aureus ATCC 25923	>1000	500	1000	>1000	62.50	1000	500
2.Streptococcus mutans ATCC 27175	1000	1000	62.50	500	250	500	1000
3.Vibrio cholerae	500	250	>1000	500	250	1000	>1000
4.Vibrio paraheamolyticus	1000	500	500	1000	62.50	1000	>1000

สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเมทานอลชั้น F5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุดโดยแสดงค่า MIC จากมากไปหาน้อยตามลำดับดังนี้ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Vibrio paraheamolyticus* , *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ *Vibrio cholerae* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.50 และ 250 μg/ml ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

การตรวจสอบเบื้องต่นทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบของมะเดื่อพบสารในกลุ่ม alkaloids condensed tannins flavonoids triterpenes steroids และ antraquinones

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเฮกเซนเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 μg/ml

สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเอทิลแอซิเตต เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจากมากไปหาน้อยตามลำดับดังนี้ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio cholerae* , *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ *Vibrio paraheamolyticus* ได้โดยมีค่า MIC 15.60, 31.25, 125.00 และ 250 μg/ml

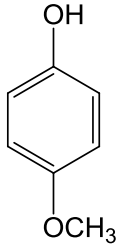
สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเมทานอล เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจากมากไปหาน้อยตามลำดับดังนี้ *Vibrio cholerae* , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Vibrio paraheamolyticus* และ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ได้โดยมีค่า MIC 7.80, 15.60 และ 31.25 μg/ml

5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของชั้นของสารสกัดจากเมทานอล

สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเมทานอลชั้น F5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุดโดยแสดงค่า MIC จากมากไปหาน้อยตามลำดับดังนี้ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Vibrio paraheamolyticus* , *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ *Vibrio cholerae* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.50 และ 250 μg/ml ตามลำดับ

5.1.4 การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์

การศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ชั้น F5 พบว่ามีลักษณะดังนี้ ลักษณะผลึกเป็นผลึกใสไม่มีสี เมื่อนำไปหาจุดหลอมเหลวพบว่ามีจุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 188-195 °C เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง NMR พบว่าแสดงสัญญาณดังต่อไปนี้



5.2 อภิปรายผล

การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ โดยสกัดสารสำคัญจากมะเดื่อด้วยเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบทั้งหมดจำนวน 3 ชนิด นำไปการตรวจสอบทางพฤกษเคมี การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบกับจุลชีพ 4 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 27175, *Vibrio cholerae และ Vibrio paraheamolyticus* การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของชั้นของสารสกัด(fraction) จากเมทานอล และการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ จากผลการศึกษามีประเด็นที่เป็นข้อสังเกตดังนี้

1. สารสกัดหยาบจากใบของมะเดื่อด้วยเมทานอลแสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ทั้ง 4 ชนิด คือ *Vibrio cholerae , Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Vibrio paraheamolyticus* และ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ได้ดีกว่า สารสกัดหยาบจากเฮกเซน และ เอทิลอะซิเตต
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัด(fraction) ชั้นเมทานอล พบว่าชั้น F5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีที่สุด
3. การศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ ซึ่งมีลักษณะผลึกใสไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว พบว่ามีจุดหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 188-195 $^{\circ}$C

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยครั้งต่อไปควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย หรือ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เป็นต้น โดยศึกษาจากส่วนต่างๆ ของมะเดื่อทั้ง ราก เมล็ด ใบ ดอก และผล เพื่อจะได้ข้อมูลที่สมบูรณ์และนำไปพัฒนาต่อยอดการวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บรรณานุกรม

1. เกสร นันทจิต. 2546. **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของเมล็ดสะแกนา.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ชฎารัตน์. 2544. **ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองของสารสกัดจากต้นกระทุ่มน้ำ.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. เชฏฐ รัตนาจารย์. 2548. **ผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

4. ธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551. **การประชุมวิชาการจับกระแสการรักษาและยาใหม่ 3**. คณะเภสัชศาสตร์ และชมรมศิษย์เก่าคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

5. นริศา คำแก่น . 2551. **การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : ก็อปปี้บอกซ์.

6. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2544. **แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์Noble print.

7. นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

8. บุญส่ง คงคาทิพย์ และคณะ. 2545. **การสกัด การแยกสารออกฤทธิ์จากต้นเบาหวาน.** รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สกว.

9. ปัทมาวดี เสตะกัณณะ. **การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย** วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 44, 2 (2545) : 110-124

10. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ สุมาลี พฤกษากร และไชยวัฒน์ ไชสุต.2549. **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิวของสารสกัดและน้ำหมักของพืชไทย.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

11. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ นิสิต กิตติพงษ์พัฒนา และจตุรงค์ รจนากุล. 2547. **การศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง**. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

12. ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และ ทรงพร จึงมั่นคง. 2546. **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

13. รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดสาระสำคัญจากสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

14. วาทินี จตุรพรชัย. 2546. **การสกัดและผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศไทย**. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

15. วัชรี คุณกิตติ และคณะ. 2547. **การพัฒนาและประเมินผลทางคลินิกของเวชภัณฑ์จากวุ้นว่านหางจรเข้ ส่วนสกัดจากใบบัวบก ใบฝรั่ง และใบข่อยเพื่อใช้รักษาโรคในช่องปาก.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

16. วันดี กฤษณพันธ์. 2529. **พฤกษเคมีเบื้องต้น. เภสัชวินิจฉัย. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1**. หน้า 37-100 กรุงเทพ. Text Journal Corporation Co., LTD.

17. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. **เภสัชกรรมไทย รวมสมุนไพร.** พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

18. สุภาพ บุณยะรัตเวช. 2523. **การทดสอบประเภทของสารเคมีในพืชสมุนไพร.** วารสารวิจัยจุฬา. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

19. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.2546. **ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 12 (1) . พืชสมุนไพรและพืชมีพิษ เล่ม 1** : ซีเอ็ดยูเคชั่น จำกัด.

20. สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี่ยวไชยพันธุ์. 2548. **การแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแกว่นป่า**. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

21. Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. American Journal Clinical Pathology 45 : 493-496.

22. U.L.B, Jayasinghe et al, 2002. Antimicrobial activity of some Srilanka Rubiaceae and Meliaceae,Fitoterapia, 73,424-427.

23. Udomwish polyium, Panupat Ta-Ngam and Amonratana Thongnoi. Antimycobacterial and Cytotoxic activities of Crude extracts from the stem bark of Walsura trichostemon Miq. Proceeding of International Conference on the Role of Universities in Hands-On Education. Chiang-Mai, Thailand 23-29 August 2009 , 411-415.

24. Polyium U , Malaphan T Antimycobacterial and Cytotoxic activities of Crude extracts from the leave of Walsura trichostemon Miq. Proceeding of The 2nd Annual International.Conference of Northeast Pharmacy Research. Thailand 2010, 53-56.

25. Udomwish polyium, Panupat Ta-Ngam and Amonratana Thongnoi. Extraction and Testing of Antioxidant and Biological activities of Xylocarpus granatum Koen . Proceeding of The 2nd Rajamangala University of Technology International Conference..Bangkok, Thailand, 24 - 26 November 2010 358-362.

26. Udomwish polyium, Panupat Ta-Ngam and Amonratana Thongnoi. Extraction and Biological Activities of Parinari anamense Hance . Proceeding of Pure and Applied Chemistry. International Conference (PACCON2011) .Bangkok, Thailand January 5-7, 2011.