รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช

อุดมเดชา พลเยี่ยม
นิภาพร ปัญญา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

The development of medicinal plant extracts to control Weed germination and growth

Udomdeja Polyium

Nipaporn Panya

This Research in Funded by Faculty of Science and Technology

Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

Fiscal Year 2011

ชื่อเรื่อง : การพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช
ผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุดมเดชา พลเยี่ยม สาขาวิชาวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
อาจารย์นิภาพร ปัญญา สาขาวิชาวิทยาการคอมพิวเตอร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทคัดย่อ

การศึกษาการยับยั้งการการงอก และการเจริญเติบโตของหญ้ารังนกวัชพืชในนาข้าว โดยใช้สารสกัดจากใบของตะบัน และมะพอก ที่ได้มาจากการหมักแบบ Maceration และเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล

ผลการวิจัยพบว่า

1. สารสกัดจากใบตะบันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 2,000-3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้ารังนกสูงที่สุด เมื่อนำสารดังกล่าวไปทำการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟฟีพบว่า สารสกัดชั้น F1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้ารังนกสูงที่สุด

2. สารสกัดจากใบมะพอกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ Hexane ที่มีความเข้มข้น 2,000- 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้ารังนกสูงที่สุด เมื่อนำสารดังกล่าวไปทำการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟฟีพบว่า สารสกัดชั้น F4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้ารังนกสูงที่สุด

จากข้อมูลที่ค้นพบสามารถนำไปใช้สำหรับการวิจัย และการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดธรรมชาติเพื่อใช้ควบคุมวัชพืชในนาข้าว และพัฒนาต่อยอดสู่การวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

Title : The development of medicinal plant extracts to control weed germination and growth
Researcher : Udomdeja polyium Nipaporn panya
Faculty of Science and Technology, RMUTP

ABSTRACT

Study on the inhibition of germination and growth of weeds in rice fields. The extract from the leaves of *Xylocarpus gangeticus* Parkins and *Parinari anamense* Hance using fermentation Maceration and extraction techniques for Sequential Extraction with three types of solvent hexane, ethyl acetate and methanol.

The results showed that

Leaf extract of *Xylocarpus gangeticus* Parkins with ethylacetate at a concentration of 2,000 - 3,000 ppm showed the highest inhibition of germination and growth of weeds. When the substance to be separated by chromatographic techniques showed that the extracts inhibited the germination and growth percentage of F1 is the highest.

Leaf extract of *Parinari anamense* Hance with hexane at a concentration of 2,000 - 3,000 ppm showed the highest inhibition of germination and growth of weeds. When the substance to be separated by chromatographic techniques showed that the extracts inhibited the germination and growth percentage of F4 is the highest.

Which can be used for research and development of natural products from plants to control weeds in rice fields to develop further research to commercialization

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรา อมรแก้ว คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัย และอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการทางเคมีอินทรีย์ในการทดลองเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้แก่คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**I**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**II**
กิตติกรรมประกาศ	**III**
สารบัญ	**IV**
สารบัญตาราง	**VI**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**4**
2.1 การงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช	4
2.2 วัชพืชในนาข้าว	11
2.3 พืชสมุนไพร	14
2.4 การเตรียมพืชสมุนไพร	16
2.5 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร	18
2.6 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	26
2.7 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	28
2.8 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร	36
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	42
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	**44**
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	44
3.2 พืชสมุนไพร และวัชพืช	44
3.3 วิธีการทดลอง	45
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	49
3.5 ระยะเวลาการทดลอง	49
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	49

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	50
4.1 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการงอกของวัชพืช	50
4.2 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของวัชพืช	52
4.3 ผลของสารแต่ละชั้นต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช	58
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	60
5.1 สรุปผลการทดลอง	60
5.2 อภิปรายผล	61
5.3 ข้อเสนอแนะ	62
บรรณานุกรม	63

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรที่ใช้ในการคำนวณ ในการวิเคราะห์วิธี Conventional growth analysis 10
ตารางที่ 2.2 การป้องกันการเกิดวัชพืช 12
ตารางที่ 2.3 การควบคุมวัชพืช 12
ตารางที่ 2.4 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี 33
ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชของสารสกัดจากใบตะบัน 50
ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะพอก 51
ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชของสารสกัดจากใบตะบัน 52
ตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชของสารสกัดจากใบตะบัน 53
ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชของสารสกัดจากใบตะบัน 54
ตารางที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะพอก 55
ตารางที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะพอก 56
ตารางที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะพอก 57
ตารางที่ 4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดชั้น Ethylacetate จากใบตะบัน 58
ตารางที่ 4.10 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดชั้น Hexane จากใบมะพอก 59

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การพัฒนาทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีส่งผลให้เกิดความเจริญก้าวหน้าทุกๆด้าน ทำให้มีการนำนวัตกรรมใหม่ๆ มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการดำเนินชีวิตประจำวันของมนุษย์ ทางด้านการเกษตรมีการใช้สารเคมีสังเคราะห์ชนิดต่างๆในการปลูกพืช การเลี้ยงสัตว์ อาทิการใช้สารกำจัดวัชพืช (Herbicide) และสารกำจัดแมลง (Insecticide) ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่สารเหล่านี้มีการตกค้างอยู่ในพืชผักและสัตว์เลี้ยง ดังนั้นการใช้สารเคมีทางการเกษตรจึงมีแนวโน้มที่จะลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ แล้วเพิ่มการใช้สารเคมีที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ สารจากจุลินทรีย์ ฮอร์โมน และสารสกัดจากพืช

ประเทศไทยเป็นประเทศมีความหลากหลายทางชีวภาพ(Biodiversity) ได้แก่ความหลากหลายของพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ และแร่ธาตุนานาชนิด การนำทรัพยากรดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรอีกทางหนึ่ง การค้นหาสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้ในการกำจัดวัชพืชเป็นวิธีการใช้ธรรมชาติยับยั้งธรรมชาติด้วยกันที่เรียกว่าอัลลีโลพาธี อัลลีโลพาธี (Allelopathy) มาจากภาษากรีก 2 คำคือ Allelon หมายถึงซึ่งกันและกัน และ pathos หมายถึงเดือดร้อนหรือทำให้เกิดอันตราย Molish ให้ความหมายของ Allelopathy ไว้ว่าเป็นปฏิกิริยาชีวเคมีระหว่างพืชทุกชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ซึ่งจะมีผลทั้งทางด้านการยับยั้งและการกระตุ้นปฏิกิริยาชีวเคมี นอกจากนี้ยังหมายถึงผลกระทบในทางที่เป็นอันตรายของพืชชนิดหนึ่งที่มีต่อการงอก การเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืชอีกชนิดหนึ่งซึ่งอาจจะมีผลดีในทางกระตุ้น(stimulatory) รวมถึงผลเสียในการยับยั้ง (inhibitory) สารอัลลีโลพาธิกในพืชส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ โดยเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารกลุ่มฟีนิลโพรเพน และสารกลุ่มพอลิคีโทด์กับกลุ่มพอลิอะเซทิลีน การปล่อยสารอัลลีโลพาธิกออกจากพืชที่เป็นผู้ผลิตได้โดยวิธีการต่าง เช่นการระเหย การปลดปล่อยออกทางราก การชะล้างโดยฝน และจากกระบวนการย่อยสลายซากพืช ในพืชต่างชนิดกันจะสร้างสารอัลลีโลพาธิกต่างกันด้วย นอกจากนี้ในเนื้อเยื้อพืช และส่วนของพืชที่ต่างกันจะสร้างสารอัลลีโลพาธิกได้ในปริมาณที่ต่างกันด้วย การที่สารอัลลีโลพาธิกจากพืชชนิดหนึ่งได้นั้นจะต้องมีการปลดปล่อยสารออกจากพืชที่เป็นผู้ผลิตออกสู่สภาพแวดล้อมด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การระเหย (volatilization) เป็นการปลดปล่อยสารอัลลีโลพาธิกออกสู่บรรยากาศรอบๆ ต้นพืชแล้วไปมีผลกระทบต่อพืชอื่นๆ รวมทั้งแมลงด้วย การปลดปล่อยออกทางราก (exudation) ในธัญพืชบางชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรน์ และข้าวฟ่างจะมีการปลดปล่อยสารอัลลีโลพาธิกออกสู่สภาพแวดล้อมที่เป็นดินหรือน้ำโดยทางรากการชะล้างโดยฝน (leaching) โดยที่น้ำฝน น้ำจากการชลประทาน และน้ำค้างจะเป็นตัวกลางในการนำ และชะล้างเอาสารอัลลีโลพาธิกจากต้นพืชผู้ผลิตไปยังพืชอื่น หรือลงไปในดินหรือน้ำ และโดยการย่อยสลายของซากพืช (decomposition) สารอัลลีโลพาธิกซึ่งถูกปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมและเมื่อพืชอื่นได้รับสารเข้าไปจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยผลทางตรงจะเป็นผลที่มีต่อลักษณะต่างๆของการเจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลีซึมของพืช ส่วนผลทางอ้อมนั้นจะเป็นผลที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน สภาพของธาตุอาหาร การเปลี่ยนแปลงประชากร และกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็นอันตรายและเป็นประโยชน์

ผลของสารอัลลิโลพาธิกนั้นอาจเกิดจากผลรวมจากสารหลายชิดทำปฏิกิริยาร่วมกัน มีผลกระทบต่อกระบวนการหนึ่งหรือหลายกระบวนการในลักษระพร้อมๆ หรือต่อเนื่องกัน อัลลีโลพาธีเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบนิเวศ โดยเฉพาะระบบนิเวศเกษตรได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางทั้งระหว่างพืชปลูกต่อพืชปลูก พืชปลูกต่อวัชพืช วัชพืชต่อพืชปลูก และวัชพืชต่อวัชพืชเพื่อนำมาพัฒนาต่อการเกษตร

ดังนั้นการวิจัยเรื่องการพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช จึงเป็นแนวทางการนำสารสกัดสารจากพืชสมุนไพรมาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชในนาข้าว ด้วยการนำพืชสมุนไพรมาสกัด ตรวจสอบสารเคมี และนำไปใช้ยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าว ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ และเป็นการเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพของพืชสมุนไพรไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการงอกของวัชพืช
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของวัชพืช

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช โดยนำการทดสอบการยับยั้งการการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าว มีขอบเขตของการวิจัยดังนี้

1. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา คือ ตะบัน และมะพอก
   ตะบัน ชื่อวิทยาศาสตร์: *Xylocarpus gangeticus* Parkins. วงศ์ : MELIACEAE
   มะพอก ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Parinari anamense* Hance วงศ์ : CHRYSOBALANACEAE
2. ส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาคือ ใบ
3. วัชพืชในนาข้าวที่ใช้ในการศึกษาคือ หญ้ารังนก
   หญ้ารังนก ชื่อวิทยาศาสตร์ *Chloris barbata* Sw. วงศ์ : GRAMINEAE
4. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล
5. การวิจัยนี้ทำการศึกษาทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ตัวแปรอิสระ		ตัวแปรตาม
สารสกัดจากพืชสมุนไพร	→	การยับยั้งการงอกของวัชพืช การยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

เป็นองค์ความรู้สำหรับการวิจัย และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติด้วยการใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมวัชพืชในนาข้าว และเป็นข้อมูลในการวิจัยเพื่อพัฒนาต่อยอดสู่การวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องการพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช คณะผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 การงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช
2.2 วัชพืชในนาข้าว
2.3 พืชสมุนไพร
2.4 การเตรียมพืชสมุนไพร
2.5 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร
2.6 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
2.7 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
2.8 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช

2.1.1 ความหมายของการงอก

การงอกของเมล็ดหมายถึง การงอกและพัฒนาการของต้นอ่อน เริ่มตั้งแต่เมล็ดพันธุ์มีกระบวนการต่างเกิดขึ้นในเมล็ดที่กำลังอยู่ในระยะพัก จนถึงระยะที่ต้นอ่อนเจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นต้นกล้าที่ถึง ขั้นที่โครงสร้างที่สำคัญของส่วนต่างๆของต้นอ่อน ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่าจะสามารถเจริญเติบโตต่อไปเป็นต้นพืชที่ปกติ ภายใต้สภาพแวดล้อมในดินที่เหมาะสม

2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด

1. น้ำ เมล็ดที่เจริญเติบโตเต็มพร้อมจะเก็บเกี่ยวภายในเมล็ดจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบเหลืออยู่น้อยมาก เมื่อเมล็ดพันธุ์จะงอก น้ำเป็นปัจจัยแรกที่จะกระตุ้นให้เมล็ดเกิดปฏิกิริยาเคมีและกระบวนการเมแทบอลิซึม เริ่มจากเมล็ดพันธุ์ดูดน้ำเข้าไปทำให้เปลือกเมล็ดอ่อนนุ่ม ทำให้เมล็ดพองโต เนื่องจากการขยายของผนังเซลล์และโพรโทพลาสต์ เมื่อเปลือกเมล็ดอ่อนนุ่มทำให้รากแทงผ่านเปลือกได้ เมล็ดพันธุ์พืชแต่ละชนิดต้องการน้ำสำหรับการงอกแตกต่างกัน บางชนิดหากได้รับน้ำมากเกินไปจะทำให้เมล็ดขาดออกซิเจนที่ใช้สำหรับหายใจและทำให้เมล็ดเน่า ในบางชนิด การที่เมล็ดพันธุ์ได้รับน้ำมากๆอาจจะทำให้เมล็ดเข้าสู่สภาวะพักตัวใหม่ สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ความหนาของเปลือก สารที่เคลือบอยู่ที่ผิวเปลือก ความเข้มข้นของน้ำ อุณหภูมิ และการสุกแก่ของเมล็ดที่ต่างกัน เป็นต้น

2. ออกซิเจน เมล็ดที่กำลังงอกต้องการพลังงาน ซึ่งได้จากกระบวนการออกซิเดชันโดยใช้ออกซิเจนจากการหายใจ เมล็ดพันธุ์ที่กำลังงอกจะมีอัตราการหายใจสูง เมื่อเทียบกับการหายใจช่วงอื่น และมีกิจกรรมการสลายและเผาผลาญอาหารที่เก็บสะสมไว้ เมล็ดพันธุ์โดยทั่วไปจะงอกในสภาพบรรยากาศปกติที่มีออกซิเจนประมาณ 20เปอร์เซ็นต์และคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 0.03 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็มีเมล็ดพันธุ์พืชหลายชนิดที่งอกได้ในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำกว่าปกติ เช่น พืชที่งอกได้ในน้ำ

3. อุณหภูมิ มีความสำคัญมากต่อการควบคุมและอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชตามมา ด้วยความแตกต่างของชนิดและถิ่นกำเนิดของพืช ทำให้พืชมีความต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกที่แตกต่างกัน เช่น พืชเขตหนาว เอนไซม์และปฏิกิริยาชีวเคมีในเมล็ดพันธุ์พืชเขตหนาวยังทำงานได้เมื่ออุณหภูมิใกล้จุดเยือกแข็ง และเมล็ดยังสามารถงอกได้ในขณะที่ที่จุดเยือกแข็งจะเป็นอันตรายสำหรับการงอกของเมล็ดพันธุ์พืชเขตร้อน ถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม ซึ่งเกินกว่าที่เมล็ดพันธุ์จะสามารถงอกได้ เมล็ดบางชนิดอาจจะมีการพักตัวหรือบางชนิดอาจจะเสียชีวิตได้ ดังนั้น เมล็ดพันธุ์แต่ละชนิดจะมีระดับอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดที่เมล็ดจะสามารถงอกได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามเมล็ดพันธุ์ยังมีการปรับตัวต่อช่วงอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดในรอบวัน คือ ถ้าอุณหภูมิกลางคืนและกลางวันมีความแตกต่างกันมาก เมล็ดพันธุ์จะงอกได้ดีกว่าการได้รับอุณหภูมิที่สม่ำเสมอตลอดเวลา เช่น หญ้า blue grass จะงอกได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง

2.1.3 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในระหว่างการงอกของเมล็ด

เมื่อเมล็ดได้รับปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการงอก เมล็ดจะมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพมีขั้นตอนดังนี้

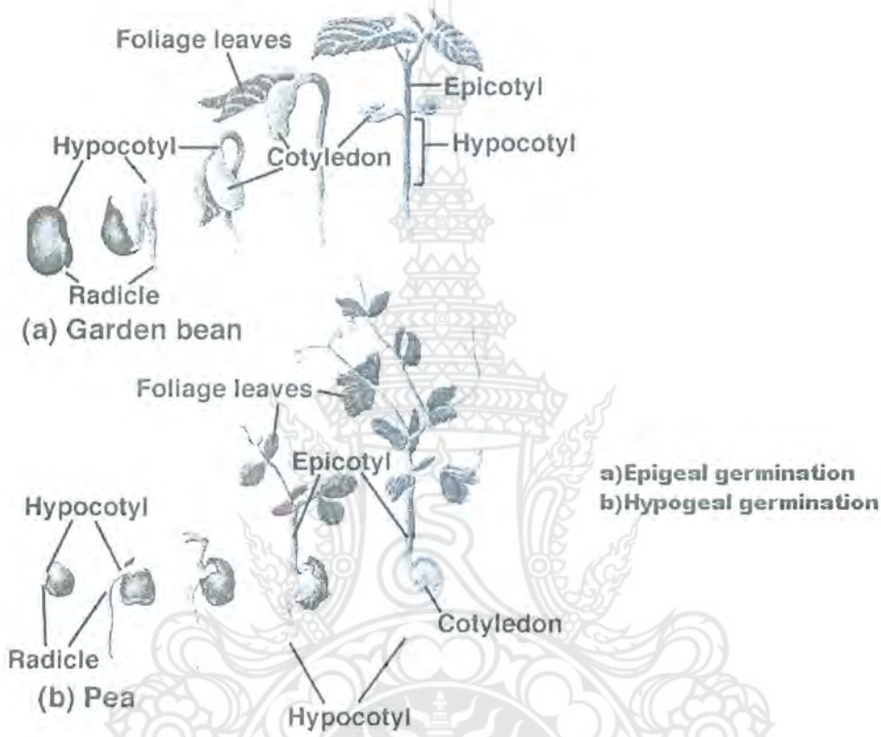
1. เมล็ดพองโต โดยทั่วไปเมล็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่ เมล็ดจะแข็ง เนื่องจากภายในเมล็ดมีความชื้นต่ำมาก เมื่อเมล็ดได้รับน้ำเข้าไปโดยผ่านช่องเปิดธรรมชาติที่มีอยู่ เช่น ไฮลัม (hilum) หรือบาดแผลที่เกิดขึ้นที่บริเวณเปลือกเมล็ด เป็นต้น จะทำให้เมล็ดขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเปลือกเมล็ดมีลักษณะอ่อนนุ่ม

2. การเจริญของราก ส่วนแรกที่จะเจริญออกมาจากเมล็ดคือ รากแรกเกิด (radicle) ด้วยบทบาทของน้ำที่ทำให้เปลือกเมล็ดอ่อนนุ่ม จึงทำให้รากแรกเกิดงอกได้สะดวกมากขึ้นรากแรกเกิดเมื่อเจริญพัฒนาต่อไปจะเป็นรากแก้ว เรียกว่า primary root เพื่อความอยู่รอดเมล็ดจะงอกส่วนรากออกมาก่อนเพื่อค้ำจุนต้นกล้า ดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารส่งไปยังใบเลี้ยงและยอดอ่อน เพื่อใช้สำหรับการเจริญเติบโตของต้นกล้าต่อไป

3. การเจริญในส่วนของใบเลี้ยงและยอดอ่อน เมล็ดจะงอกส่วนที่เรียกว่าลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) และลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ออกมา หลังจากนั้น ใบเลี้ยงจะค่อยๆเจริญออกมาและสลัดส่วนของเปลือกเมล็ดทิ้งไป พืชใบเลี้ยงคู่มีใบเลี้ยงสองใบ เมื่อโผล่ขึ้นมาเหนือดิน จะเป็นส่วนแรกที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงในต้นกล้าได้ ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีใบเลี้ยงเพียงใบเดียว ส่วนใหญ่ใบเลี้ยงจะตกค้างอยู่ภายในเมล็ด ทำหน้าที่ดูดอาหารจากเอนโดสเปิร์มส่งไปเลี้ยงต้นอ่อนที่กำลังงอก ส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยง ในพืชใบเลี้ยงคู่จะเห็นได้ชัดเจนกว่าในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิดจะมีลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่มีลักษณะยาวเป็นพิเศษ เรียกว่าปล้องแรก (mesocotyl)

2.1.4 ลักษณะการงอกของเมล็ดพันธุ์ มี 2 แบบ ดังนี้

1. การงอกแบบใบเลี้ยงอยู่เหนือดิน (epigeal germination) คือ การงอกของเมล็ดเมื่อต้นกล้าเจริญเติบโตเต็มที่จะมีใบเลี้ยงชูขึ้นมาเหนือดินดังรูป โดยขั้นตอนแรกของการงอก เมล็ดพันธุ์ดูดน้ำเข้าไป เมล็ดมีลักษณะพองโต รากแรกเกิดแทงทะลุออกมาลงสู่พื้นดิน ต่อมาไม่นาน มีรากแขนงแตกออก ลำต้นใต้ใบเลี้ยงเริ่มปรากฏมีลักษณะโค้งงออยู่เหนือดิน แล้วดึงส่วนของใบเลี้ยงตามขึ้นมาเหนือดิน ใบเลี้ยงนี้จะทำหน้าที่สังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหารเพียงช่วงระยะหนึ่ง แล้วจะเหี่ยวแห้งไป เหลือเพียงลำต้นเหนือใบเลี้ยงที่ปรากฏให้เห็น และจะเจริญไปเป็นใบจริงใบแรกต่อไป เมล็ดพันธุ์พืชที่งอกในลักษณะนี้ส่วนใหญ่ที่เห็นอยู่เหนือดินคือ ส่วนของลำต้นที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง เช่น ถั่วเหลือง (*Glycine max*) ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) และละหุ่ง (*Ricinus communis*)



รูป แสดงการงอกแบบ a) epigeal germination และแบบ b) hypogeal germination
(ที่มา : http://hayatihidup.blogspot.com/2011/08/germination.html)

2. การงอกแบบใบเลี้ยงอยู่ใต้ดิน (hypogeal germination) คือ การงอกของเมล็ดพันธุ์ที่เมื่อเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนแล้วใบเลี้ยงยังไม่โผล่ขึ้นมาเหนือดิน หรือในบางกรณี อาจจะรวมถึงเอนโดสเปิร์มที่ยังตกค้างอยู่ใต้ดินด้วย ขั้นตอนการงอกในลักษณะนี้คือ เริ่มแรกเมล็ดพันธุ์จะดูดน้ำเข้าไป ทำให้เอ็มบริโอและเอนโดสเปิร์มขยายตัว coleorhiza จะแทงทะลุเปลือกออกมา รากปฐมภูมิ (primary root) เจริญออกมาอย่างรวดเร็ว แล้วเนื้อเยื่อหุ้มยอด (coleoptile) จะเจริญโผล่พ้นดินขึ้นมา เมื่อได้รับแสงแดดจึงหยุดการเจริญ ปล่อยให้ยอดอ่อนเจริญแตกใบจริงออกมา ส่วนใหญ่ที่เห็นอยู่เหนือดินคือ ส่วนของลำต้นที่อยู่เหนือใบเลี้ยง (epicotyl) การงอกในลักษณะนี้มักพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) แต่ก็มีพืชใบเลี้ยงคู่บางชนิดที่งอกแบบใบเลี้ยงอยู่ใต้ดิน เช่น ถั่วลันเตา (*Pisum sativum*)

2.1.5 กลไกควบคุมการงอกของเมล็ดพันธุ์

เมื่อเมล็ดพันธุ์แก่เต็มที่ จะมีกลไกในการควบคุมการงอกซึ่งเมล็ดจะสร้างขึ้นมาเพื่อให้สอดคล้องกับสภาวะแวดล้อมและฤดูกาลในธรรมชาติเพื่อความอยู่รอดของต้นอ่อน การควบคุมการงอกของเมล็ดพันธุ์โดยส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นโดยการลดความชื้นภายในเมล็ดลงเมื่อเมล็ดมีการสุกแก่เต็มที่ จึงทำให้เมล็ดพันธุ์ขาดปัจจัยที่สำคัญในการงอกไป นั่นก็คือน้ำ สำหรับโครงสร้างที่ทำหน้าที่ควบคุมน้ำและอากาศที่จะเข้าไปในเมล็ดพันธุ์ก็คือ เปลือกเมล็ด เมล็ดพันธุ์บางชนิดถึงแม้ว่าจะมีปริมาณน้ำในเมล็ดมาก แต่ก็ไม่สามารถงอกได้ เนื่องจากเมล็ดมีกลไกในการป้องกันการงอก เช่น ภายในเมล็ดอาจจะมีสารยับยั้งการงอกอยู่ นอกจากนี้ ยังมีเมล็ดพันธุ์หลายชนิดที่สามารถงอกได้ทั้งๆที่ยังไม่หลุดล่วงออกจากต้นแม่

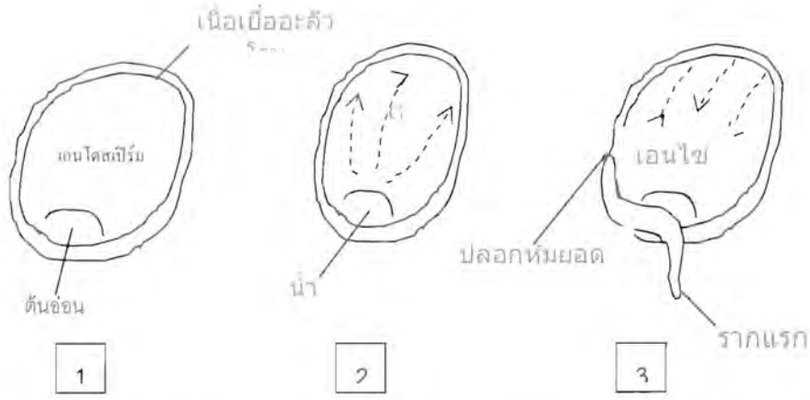
การงอกลักษณะนี้เรียกว่าการงอกคาต้น (vivipary) เช่น ต้นแสม ต้นโกงกาง เป็นต้น โดยเมล็ดจะงอกส่วนรากที่ แข็งแรง มีลักษณะคล้ายฝัก ทิ่มลงในโคลนเบื้องล่างเพื่อฝังตัว ลักษณะที่เกิดขึ้นเป็นการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดของพืช ไม่ให้เมล็ดพันธุ์หลุดลอยไปในบริเวณน้ำลึก

กลไกที่ควบคุมการงอกที่สำคัญอีกแบบคือการพักตัวของเมล็ดถึงแม้ว่าจะมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและมีปัจจัยสนับสนุนการงอกครบ แต่เมล็ดก็ไม่สามารถงอกได้ ซึ่งจะเกิดผลดีต่อเมล็ดคือทำให้เมล็ดงอกได้ในถิ่นที่เหมาะสมต่อความอยู่รอดของต้นอ่อน และการพักตัวจะจำกัดไม่ให้เมล็ดงอกในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน เช่นในฤดูที่มีอุณหภูมิสูงเกินไป มีความชื้นไม่เพียงพอ หรือมีช่วงฤดูฝนที่สั้นเกินไป

2.1.6 บทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์

กระบวนการงอกของเมล็ดขึ้นอยู่กับการทำงานร่วมกันของฮอร์โมนหลายตัว Khan (1975) ได้เสนอแบบจำลองว่า จิบเบอเรลลิน (GA) มีบทบาทหลักในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ ในขณะที่สารยับยั้ง (inhibitor) จะทำหน้าที่รองคือเป็นตัวห้าม และไซโตไคนิน (cytokinin) จะทำหน้าที่เป็นตัวที่หักล้างอิทธิพลของสารยับยั้ง แต่ถ้าเพิ่มสารยับยั้ง คือ abscisic acid (ABA) จะทำให้การกระตุ้นโดย GA ไม่ได้ผล และการเติมไคเนตินจะไปลบล้างอิทธิพลของ ABA

นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเมล็ดพันธุ์ข้าวบาเลย์มีการดูดน้ำ เอ็มบริโอจะมีการผลิตฮอร์โมน GA และ GA จะถูกลำเลียงไปยังชั้น aleurone ซึ่งเป็นชั้นเซลล์หุ้มอยู่รอบๆเอนโดสเปิร์ม และกระตุ้นให้เซลล์ aleulone สร้างเอนไซม์ amylase และ hydrolytic อีกหลายตัว แล้วเอนไซม์เหล่านี้จะถูกส่งออกมาย่อยสลายอาหารที่สะสมอยู่ในเอนโดสเปิร์ม แล้วอาหารที่ย่อยได้จะถูกลำเลียงไปเลี้ยงเอ็มบริโอต่อไป



รูปเมื่อเอ็มบริโอของเมล็ดพันธุ์ข้าวบาเลย์ดูดน้ำเข้าไป GA จากเอ็มบริโอจะถูกส่งไปกระตุ้นเนื้อเยื่อ อะลิวโรน สร้างเอนไซม์ และปลดปล่อยออกมาย่อยอาหารสะสมในเอนโดสเปิร์ม

2.1.7 การเจริญเติบโตของพืช

การเจริญเติบโตของพืชหมายถึงการเพิ่มขนาด จำนวน หรือการเพิ่มของน้ำหนักแห้งของต้นพืช และมีการเปลี่ยนแปลงอวัยวะต่างๆ ไปตามขั้นตอนของพืชนั้น ๆ การเจริญเติบโตเป็นผลมาจากกระบวนการที่สำคัญคือ การสังเคราะห์แสง การหายใจ

2.1.8 การวัดการเจริญเติบโตของพืช

การวัดการเจริญเติบโตของพืชสามารถวัดได้หลายวิธีได้แก่ความสูง จำนวนใบ ขนาดของใบ เส้นรอบวง มวล

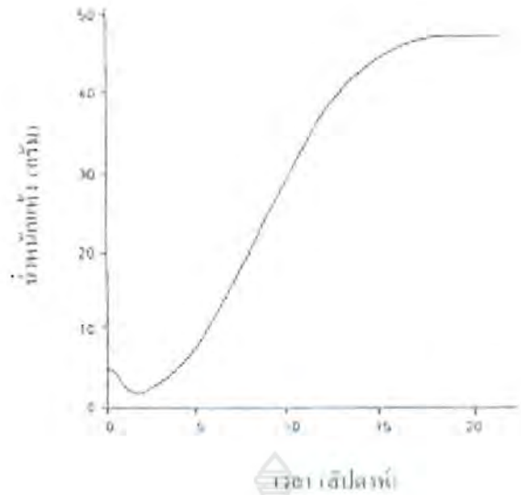
1. การวัดมวล หรือน้ำหนักสดของพืช เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด แต่ผลที่ได้ อาจไม่บ่งถึงการเพิ่มขึ้นของชีวมวลที่แท้จริงทั้งหมดเพราะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเกิดจากเซลล์เก็บสะสมน้ำไว้ในปริมาณมาก ๆ จนเซลล์เพิ่มขนาด

2. การชั่งน้ำหนักแห้งที่แท้จริง วิธีนี้ทำให้พืชตาย ดังนั้นพืชที่ใช้วัดจึงต้องปลูกจำนวนมาก แล้วสุ่มตัวอย่างมาเพียงบางส่วนเพื่อเป็นตัวแทนของพืชทั้งหมดในระยะเวลาต่าง ๆ กัน นำมาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น แล้วจึงสรุปได้ว่าพืชนั้นมีการเจริญเติบโต

3. การวัดความสูงของพืชเป็นวิธีที่นิยมใช้มากพืชบางชนิดมีความสูงจำกัด แต่กิ่ง ตา ดอก ผล และขนาดของลำต้นสามารถเพิ่มขึ้นได้อีก

นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่ๆ เช่น การนับจำนวนใบ การนับวงปี การวัดเส้นรอบวง การวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง เป็นต้น การเลือกวิธีการใดขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการวัด

การเจริญเติบโตของพืชตั้งแต่งอกออกจากเมล็ดจนโตเต็มที่ ออกดอก ออกผล มีลักษณะคล้ายกับ กราฟการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทั่ว ๆ ไป สามารถเขียนกราฟของการเจริญเติบโตเป็นรูปตัว S (S – shaped curve)



http://www.lks.ac.th/student/kroo_aumara/bio01/28.html

2.1.9 หลักการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของพืช

หลักการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของพืช Blackman (1919) กล่าวว่าอัตราการเจริญเติบโตของพืชขึ้นอยู่กับขนาดเริ่มต้นของพืช และ เวลา และเรียกอัตรานี้ว่า Relative growth rate (RGR; R) ดังสมการ

$$W = W_0 \exp^{R.T}$$

การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของพืชแบ่งออกเป็นสองส่วนคืออัตราการสร้างน้ำหนักต่อพื้นที่ผิวใบต่อเวลา Net assimilation rate (NAR; E) และ สัดส่วนของพื้นที่ใบต่อน้ำหนักทั้งหมดของต้นพืช Leaf area ratio (LAR; F)

การวิเคราะห์นี้ได้รับการปรับปรุงโดยนักวิทยาศาสตร์หลาย ๆ ท่านเช่น Briggs *et al*. (1920), Watson (1958), Radford (1967), Evans (1972) และ Hunt (1978) และยังคงความนิยมใช้มาจนกระทั่งปัจจุบัน โดยมักเรียกวิธีนี้ว่า Conventional หรือ Classical growth analysis

เทคนิคนี้ ต้องการการวัดเพียงสองค่าคือ น้ำหนักแห้ง และ พื้นที่ใบ โดยทำการวัดจากต้นพืชตัวอย่างทุก 3 - 7 วัน สำหรับการวัดน้ำหนักแห้งสามารถทำได้อย่างง่ายโดยตัดต้นพืชนำไปอบ แล้วชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้ง ส่วนการวัดพื้นที่ใบสามารถหาจากการลอกรูปภาพใบลงบนกระดาษกราฟ หรือการคำนวณจากค่าความกว้าง ยาวของใบ หรือการใช้ Area meter

Growth analysis สามารถทำจากพืชที่ปลูกเดี่ยว ๆ ในกระถาง หรือจากพืชปลูกในแปลงก็ได้ ในปัจจุบันมีค่าที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คือ Relative growth rate, Net assimilation rate, Leaf area ratio, Specific leaf weight (SLW), Specific leaf area (SLA), และ ค่าสัดส่วนของน้ำหนักแห้งในส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช เช่น Shoot root ratio (S/R), % Leaf dry weight (LWR), % Stem dry weight (SWR), % Root dry weight (RWR) ค่า Leaf area index (LAI) และค่า Leaf area duration (LAD) โดยคำนวณจากสูตรในตาราง

ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรที่ใช้ในการคำนวณ ในการวิเคราะห์วิธี Conventional growth analysis

Derived Quantity	Symbol	Instantaneous Value	Formula for Mean Value over Time Interval $(T_2\text{-}T_1)^b$	Unit
Relative growth rate	RGR, *R*	$1/W * dw/dt$	RGR = (ln $W2$-ln $W1$)/($T2$-$T1$)	$W . W^{-1} . T^{-1}$
Leaf area ratio	LAR, *F*	LA/W	LAR = $(LA_2/W_2+LA_1/W_1)/2$	$A . W^{-1}$
Specific leaf area	SLA	LA/LW	SLA = $(LA_2/W_2+LA_1/W_1)/2$	$A . W^{-1}$
Specific leaf weight	SLW	Lw/LA	SLW = $(Lw_2/LA_2)+(Lw_1/LA_1)/2$	$W . A^{-1}$
Net assimilation rate	NAR, *E*	$1/LA * dw/dt$	NAR = $(W_2\text{-}W_1)/(T_2\text{-}T_1)$ *.(ln LA_2-ln LA_1)/(LA_2-LA_1)	$W . A^{-1} . T^{-1}$
Leaf area index	LAI	LA/P	LAI = $(LA_2+LA_1)/2 * (1/G_A)$	dimensionless
Crop growth rate	CGR	$1/P * dw/dt$	CGR = $1/GA * (W_2\text{-}W_1)/(T_2\text{-}T_1)$	$W . A^{-1} . T^{-1}$
Leaf area duration	LAD	longivity	LAD = $(LA_2+LA_1)(T_2\text{-}T_1)/2$	$A . T$
(leaf area basis)		of leaf		
Leaf area index duration	LAID	longivity of LAI	LAID = $(LA_1+LA_2)(T_2\text{-}T_1)/2$	T
(leaf area index)				
Biomass duration	BMD	None	$BMD = [(W_2+W_1)/2] * (T_2\text{-}T_1)$	$W . T$

. LA = leaf area, LW = leaf weight, G_A = ground area, T = time, W = weight, A = area.

2.2 วัชพืชในนาข้าว

วัชพืชในนาข้าวเป็นมีปัญหาต่อการปลูกข้าว ส่งผลให้ได้ผลผลิตข้าวน้อยกว่าที่ควรจะได้ อีกทั้งยังต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา และการกำจัดวัชพืชในนาข้าว

2.2.1 ประเภทของวัชพืชในนาข้าว

การจำแนกประเภทของวัชพืชในนาข้าวนั้นช่วยให้การวางแผนการป้องกัน และกำจัดวัชพืชอย่างถูกวิธี วัชพืชในนาข้าวมีดังนี้

1. วัชพืชใบแคบหรือวัชพืชตระกูลหญ้า เช่น หญ้าข้าวนก หญ้านกสีชมพู หญ้าแดง หญ้าดอกขาว
2. วัชพืชใบกว้าง มีลักษณะเป็นพวกพืชใบเลี้ยงคู่ ใบกว้าง เช่น ผักปอดนา ผักบุ้ง เทียนนา
3. วัชพืชตระกูลกก ลักษณะทรงต้นคล้ายหญ้า แต่ลำต้นไม่มีข้อ ไม่มีปล้อง ลำต้นเป็นหลอดหรือรูปสามเหลี่ยม ได้แก่ กกทราย กกสามเหลี่ยม กกขนาก หนวดปลาดุก
4. วัชพืชประเภทเฟิร์น ไม่มีเมล็ด ขยายพันธุ์ด้วยส่วนของลำต้น และอับเรณู เช่น ผักแว่น ผักกูดนา
5. วัชพืชประเภทสาหร่าย เป็นพืชชั้นต่ำ ราก ลำต้นและใบไม่แตกต่างกัน เช่น สาหร่ายไฟ

2.2.2 ชนิดของวัชพืชในนาข้าว

2.2.2.1 จำแนกตามวิธีการปลูก

1. นาปักดำ : หญ้าข้าวนก ผักปอดนา ขาเขียด ผักตับเต่า เทียนนา กกทราย กกขนาก หนวดปลาดุก ผักแว่น สาหร่ายไฟ

2. นาหว่านน้ำตม : หญ้าข้าวนก หญ้านกสีชมพู หญ้าดอกขาว หญ้าแดง ผักปอดนา ขาเขียด กกทราย กกขนาก หนวดปลาดุก ผักแว่น

3. นาหว่านข้าวแห้ง : หญ้านกสีชมพู หญ้าดอกขาว หญ้าแดง หญ้าหางหมา หญ้ากุศลา ผักปราบนา ผักบุ้ง เซ่งใบยาว เซ่งใบมน โสน กกทราย กกขนาก หนวดปลาดุก
(ที่มา : http://cbr-rsc.ricethailand.go.th/famer_04.htm)

2.2.2.2 จำแนกตามระบบชลประทาน

1. วัชพืชในนาชลประทาน หญ้าข้าวนก หญ้านกสีชมพู หญ้าแดง หญ้าดอกขาว ผักปอดนา ขาเขียด กกขนาก กกทราย หนวดปลาดุก ผักแว่น

2. วัชพืชในนาน้ำฝน หญ้าข้าวนก หญ้านกสีชมพู หญ้าแดง หญ้าดอกขาว ผักปอดนา ขาเขียด กกขนาก กกทราย ผักแว่น ผักบุ้ง เซ่งใบมน ผักปราบนา เทียนนา หนวดปลาดุก โสนคางคก หญ้าหางหมาจิ้งจอก หญ้าปากควาย หญ้าตีนนก หญ้าแพรก หญ้าชะกาดน้ำเค็ม หญ้าตีนกา หญ้าชันกาศ หญ้ารังนก หญ้ากุศลา ผักเบี้ยหิน ปอวัชพืช สะอีก ผักโขมไร้หนาม โสนหางไก่ ผักงวงช้าง กะเม็ง ถั่วลิสงนา
(http://www.brrd.in.th/rkb/weed/index.php.htm)

2.2.3 การจัดการวัชพืชในนาข้าว

ตารางที่ 2.2 การป้องกันการเกิดวัชพืช

กิจกรรม	วิธีการจัดการ	ผลที่ได้รับ
1.ศึกษาประวัติการแพร่ระบาด	ศึกษาชนิดของวัชพืชที่เกิดในฤดูกาลต่างๆ	จำแนกชนิดของวัชพืชเพื่อเลือกใช้สารป้องกันและกำจัด
2.การใช้เครื่องจักรและเครื่องมือในนา	ทำความสะอาดเครื่องมือที่ต้องลงปฏิบัติงานในนา	ลดปริมาณการแพร่กระจายของเมล็ดวัชพืชที่มาจากแหล่งอื่น ซึ่งติดมากับเครื่องจักร
3.การใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ดี/สะอาด	ตรวจดูความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าว ทำความสะอาดเมล็ดพันธุ์โดยใช้เครื่องเป่าให้เมล็ดวัชพืชหลุดออกไป	ไม่มีเมล็ดวัชพืชติดมากับเมล็ดพันธุ์ ไม่มีวัชพืชอื่นที่ไม่เคยมีในนามาแพร่ระบาด
4.การเตรียมดินที่ดี	มีการไถพื้นที่อย่างพิถีพิถัน ทำลายวัชพืชที่งอกในระหว่างการเตรียมดิน และปรับพื้นที่ให้เรียบสม่ำเสมอ	ไม่มีวัชพืชขึ้นในนา การงอกของเมล็ดข้าวสม่ำเสมอ สามารถควบคุมการให้น้ำได้

ตารางที่ 2.3 การควบคุมวัชพืช

กิจกรรม	วิธีการจัดการ	ผลที่ได้รับ
1.การจัดการน้ำอย่างเหมาะสม	การควบคุมน้ำอย่างมีประสิทธิภาพต้องมีการปรับระดับพื้นที่ให้เรียบตั้งแต่เริ่มเตรียมดิน ใช้ระดับน้ำควบคุมวัชพืชหลังจากข้าวตั้งตัวแล้ว	สามารถทำลายต้นอ่อนของวัชพืชที่ขึ้นมาในระยะแรก ลดปริมาณของวัชพืชในระยะหลังข้าวตั้งตัว
2.การใช้สารกำจัดวัชพืช	ใช้สารกำจัดวัชพืชให้ถูกวิธี สารที่ใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกหลังงอก หรือใช้ทั้งสองชนิดร่วมกัน	สารกำจัดวัชพืชสามารถควบคุมวัชพืชในระยะแรกได้ และสามารถกำจัดวัชพืชที่ขึ้นมาหลังปลูกข้าวได้

2.2.4 หญ้ารังนก

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของลำต้น ของหญ้ารังนก
(ที่มา : http://www.brrd.in.th/rkb/weed)

รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของดอกของหญ้ารังนก
(ที่มา : http://www.brrd.in.th/rkb/weed)

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของเมล็ดของหญ้ารังนก
(ที่มา : http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=CHBA10)

หญ้ารังนก

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Chloris barbata* Sw.
2. วงศ์ GRAMINEAE
3. ชื่อสามัญ swollen finger grass
4. ประเภท/ชีพจักร หญ้า/อายุปีเดียว
5. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเกษตร อายุปีเดียว ลำต้นสูง 87-120 เซนติเมตร ข้อที่แตะพื้นจะแตกราก โคนต้นแบน ข้อมีสีม่วง ใบยาว 5-12 เซนติเมตร กว้าง 3-5 มิลลิเมตร รอยต่อระหว่างใบและกาบใบในบริเวณขอบจะมีขนยาว ลิ้นใบเป็นแผ่นเยื่อบางๆ (membranous entire) สีขาวสั้นมากประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ออกดอกตรงส่วนปลายของลำต้น ช่อดอกยาว 27-30 เซนติเมตร มี 5-10 raceme จัดเรียงอยู่บนจุดเดียวกัน คล้ายรูปนิ้วมือ (digitate) แต่ละ raceme ยาว 6-7 เซนติเมตร ดอกมีขนนุ่มมีสีเขียวปนม่วง และปลายกลีบดอกมีหางยาว 5-6 มิลลิเมตร ออกดอกตลอดปี
6. แหล่งที่พบและเก็บรวบรวมพันธุ์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอสูงเนิน จังหวัดนครราชสีมา ที่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 35-85 เมตร
7. คุณค่าทางอาหาร อายุประมาณ 45 วัน มีค่าวัตถุแห้ง 27-36 เปอร์เซนต์ โปรตีน7.2-8.5 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 0.28-0.34 เปอร์เซนต์ โพแทสเซียม 1.06-1.19 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียม 0.29-0.50 เปอร์เซนต์ ADF 36.1-42.9 เปอร์เซนต์ NDF 65.2-76.9 เปอร์เซนต์ ลิกนิน6.0 เปอร์เซ็นต์ แทนนิน 0.07-0.09 เปอร์เซนต์ มิโมซิน 0.69 เปอร์เซนต์ ออกซาลิกแอซิด 0.04-0.07 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ DMD 42.2 เปอร์เซนต์ (โดยวิธี Nylon bag)

การป้องกันกำจัดเขตกรรม

เมื่อเริ่มฤดูฝนหรือฤดูทำนา ควรรอให้หญ้ารังนกงอกขึ้นมาก่อนแล้วจึงทำการไถดะ หลังจากนั้นเว้นช่วงให้มีฝนตกและหญ้ารังนกงอกมาอีกแล้วจึงไถแปร และหากจะคราดควรจะทิ้งให้หญ้ารังนกงอกมาอีกครั้ง หลังจากนั้นจึงหว่านข้าวแห้งและคราดกลบ สำหรับนาหยอดหลังข้าวงอกให้กำจัดด้วยการใช้จอบถากก่อนที่ใบข้าวจะเจริญเติบโตยาวปกคลุมผิวดินจนหมดโดยทำ 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 หลังข้าวงอก 2 สัปดาห์ และครั้งที่ 2 หลังข้าวงอก 4 สัปดาห์

2.3 พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัยคือ ตะบัน มะเดื่อ ข้อมูลอนุกรมวิธานที่สำคัญของพืชสมุนไพรประกอบด้วยชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อวงศ์ ชื่อพื้นเมือง ลักษณะทั่วไป ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และประโยชน์ดังนี้

2.3.1 ตะบัน

1. ชื่อวิทยาศาสตร์: *Xylocarpus gangeticus* Parkins.
2. ชื่อวงศ์ : MELIACEAE
3. ชื่อพื้นเมือง : ตะบัน oranga mangrove
4. ลักษณะทั่วไป : เป็นพรรณไม้ยืนต้น ลำต้นเปลือกสีดำมีปุ่มตามลำต้นและแตก กิ่งก้านเป็นพุ่มขนาดเล็กกว่าตะบูน ใบมีสีเขียวเข้มไม่ผลัดใบ ดอกขนาดเล็ก ผลคล้ายตะบูนมีขนาดทั่วไปเล็กกว่า

5. ประโยชน์ : ใช้เผาทำถ่านที่ให้ความร้อนสูงกว่าไม้ชนิดอื่น เป็นแหล่งอาศัยของสัตว์น้ำ สัตว์ป่านำลำต้นมาทำเสาเข็ม และเป็นโครงสร้างหลักของโรงเรือนที่อยู่อาศัย

http://klongsomboon.sskedarea.net/chai-lan1/p-taboontabun.htm

2.3.2 มะพอก

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Parinari anamense* Hance
2. ชื่อวงศ์ : CHRYSOBALANACEAE
3. ชื่อพื้นเมือง : พอก กระท้อนรอก (ตราด) จัด จั๊ด (ลำปาง) ตะเลาะ เหลอะ (ส่วย สุรินทร์) ตะโลก (เขมร สุรินทร์) ท่าลอก (พิษณุโลก นครราชสีมา ปราจีนบุรี) ประดงไฟ ประดงเลือด (ราชบุรี) มะคลอก (สุโขทัย อุตรดิตถ์) มะมื่อ หมักมื่อ (เหนือ) หมักมอก (พิษณุโลก) หมากรอก (ประจวบคีรีขันธ์)
4. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : สูง 10 – 20 เมตร ลำต้นเปลือกสีน้ำตาลแตกเป็นร่อง กิ่งอ่อนมีขนสีน้ำตาลปกคลุม

ใบ : ใบรูปรีหรือรูปไข่ กว้าง 3 – 6.5 เซนติเมตร ยาว 4 – 10 เซนติเมตร ปลายใบมนหรือแหลม โคนใบ กลมหรือรูปหัวใจตื้นๆขอบใบเรียบ แผ่นใบเหนียวคล้ายแผ่นหนัง ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ด้านล่างมีขนนุ่ม สีขาวหนาแน่น เส้นใบ 12 – 13 คู่ ชัดเจนทั้งสองด้าน

ดอก : ดอกเป็นช่อแบบ panicle ออกที่ปลายกิ่ง มีขนหนาแน่น ดอกขนาดเล็ก ฐานแบบ hypanthium หนา ปลายแยกเป็นกลีบเลี้ยง กลีบดอก 5 กลีบ สีขาว เกสรเพศผู้ 6 – 15 อัน สมบูรณ์ 6 – 7 อัน รังไข่มีขน สีน้ำตาลปกคลุมหนาแน่น

ผล : ผลรูปร่างไม่แน่นอนมักเป็นรูปกลม รีหรือเกือบกลม เมื่อแก่สีน้ำตาลผิวมีจุดสีขาวหรือเทาทั่วไป

5. ประโยชน์ : ด้านสมุนไพร เนื้อไม้ รสเฝื่อนเมา ต้มดื่มแก้ประดงผื่นคันตามตัว แก้ปวดแสบปวดร้อน แก้น้ำเหลืองเสีย น้ำมันจากผลใช้ทากระดาษทำร่ม ผสมกับสมุนไพรอื่น แก้หืด เปลือกต้นประคบแก้ช้ำใน แก้บวม เนื้อไม้ กระพี้สีเหลืองอ่อน แก่นสีชมพูเรื่อ ๆ เนื้อค่อนข้างละเอียด เสี้ยนตรงและสม่ำเสมอ เหนียวพอประมาณ เลื่อยไสกบ ตกแต่งไม่ยาก ใช้ทำกระดาน ฝา ฝ้า ผล เนื้อเยื่อภายในใช้รับประทานได้ เมล็ด เนื้อในเมล็ดใช้รับประทานน้ำมันจากเมล็ด ใช้ทาเครื่องเขินให้เป็นเงา ทากระดาษร่มกันน้ำซึม ใช้เป็นส่วนของสารเคลือบธนบัตร ให้มีความทนทานเป็นเงาและเนื้อกระดาษไม่ติดกัน

(http://www.dnp.go.th/Pattani_botany/ http://www.wangtakrai.com/panmai/)

2.4 การเตรียมพืชสมุนไพร

การเตรียมพืชสมุนไพร (Preparation of Medicinal plants) ประกอบด้วยการคัดเลือกพืชสมุนไพร การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร การเก็บส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพร การเตรียมพืชสมุนไพร การทำให้สมุนไพรมีขนาดเล็ดลง
(http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri02/lesson.htm)

2.4.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

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

2.4.2 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 จะมีเหง้าอยู่ใต้ดินในฤดูฝนเหง้าจะมีน้ำปริมาณมาก 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

2.4.3 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

2.4.4 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 หรือพืชสมุนไพรที่แช่ในแอลกอฮอล์อาจใช้เครื่องปั่น (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

2.5 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

2.5.1 สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์

ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551 : 68-71) กล่าวถึงคุณสมบัติทั่วไปที่ควรทราบก่อนทำการแยกสารดังนี้

1. ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) หรือ ความชอบน้ำ (hydrophilicity)

ความชอบน้ำ (hydrophilicity) หรือความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของสารนั้นพิจารณาได้จากความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลาย ที่มีขั้วสูงไปหาขั้วต่ำตามลำดับ ดังนี้ น้ำ เมธานอล อะซีโตไนไตร(acetonitrile) เอธิลอะซีเตต (ethyl acetate) ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (chloroform) ปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane) สารสกัดหยาบที่จะนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อาจละลายในตัวทำละลายได้ยาก ควรกรองสารละลายของสารสกัดหยาบเพื่อ แยกเป็นส่วนของตะกอนและส่วน ของสารละลาย (filtrate)หรือหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเป็น ส่วนของตะกอนและส่วนลอย (supernatant) นอกจากนี้ยังสามารถสกัดแยกส่วนของสารสกัดหยาบ ด้วยการใช้ตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เข้ากัน เช่น น้ำ กับเอธิลอะซีเตต หรือคลอโรฟอร์มกับไดคลอโรมีเธนหรือเฮกเซน เป็นต้น โดยทำการสกัด ด้วยกรวยแยก จากนั้นจึงนำแต่ละ ส่วนมาแยกให้บริสุทธิ์ ต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดอื่น หรือแบ่งบางส่วนของสารที่แยกได้นั้นมาทดสอบฤทธิ์ทาง ชีวภาพก่อนที่จะแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. pKa

โดยทั่วไปค่าพีเอช (pH) 3 7 และ 10 จะเป็นค่าพีเอชที่แสดงถึงความเป็นกรด กลาง และเบสตามลำดับ การทราบค่า pKa จะทำให้ทราบถึงความคงตัวของสารนั้นที่ค่าพีเอชต่าง ๆ ของสารละลาย อย่างไร ก็ตามในขั้นตอนการแยกสารสามารถปรับความเป็นกรดเบสของสาร ที่อยู่ในรูปสารละลายหรือสารแขวนตะกอนด้วยการหยดกรดหรือด่างเพียง 1 - 2 หยด จากนั้นจึงสกัดแยก ด้วยตัวทำละลายผสมที่แยกออกเป็นสองชั้นได้ สารที่ไม่แตกตัวจะละลายอยู่ในเฟสของ ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic phase) ส่วนสารที่แตกตัวมีประจุเป็นไอออนจะละลายอยู่ในเฟสของน้ำ (aqueous phase)

3. ความคงตัวต่อความร้อน

ความคงสภาพ (stability) มี 2 ประเภท คือ ความคงสภาพทางเคมี (chemical stability) และความคงสภาพทางกายภาพ (physical stability) ความคงสภาพของสารจะลดลงเมื่อเกิดการเสื่อมสลาย (degradation) เนื่องจากกระบวนการต่าง ๆ เช่น hydrolysis, dehydration, isomerization และ racemization, decarboxylation และ elimination, oxidation, photodegradation และ complex interaction รวมทั้งแสงและความร้อน สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่จัดเป็นโปรตีนมักไม่คงตัวต่อความร้อนจึงมักทำให้เกิดปัญหาในการแยกสาร ดังนั้นจึงนิยมแยกสารที่ไม่ใช่โปรตีนเพราะมีความคงตัวสูงกว่า โดยทั่วไปการทดสอบความคงสภาพต่อความร้อนจะใช้วิธีการบ่ม (incubation) สารตัวอย่างที่อุณหภูมิ 80 หรือ 90 องศาเซลเซียส เป็น เวลานาน 10 นาที บนหม้ออังไอน้ำ (water bath) สารที่ถูกความร้อนมักมีคุณสมบัติเปลี่ยนไป เช่น เกิดการเกาะกลุ่มกัน (clotting หรือ aggregation) แสดงว่าความร้อนทำให้สารสลายตัวหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีไปจากเดิม

4. ขนาดโมเลกุล

การแยกสารอาจไม่ได้แยกตามความมีขั้วของสาร แต่อาจแยกตามขนาดของโมเลกุล(size) หรือน้ำหนักโมเลกุล ของสาร เช่น การแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติด้วย Sephadex LH-20 column พบว่าสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะถูกชะ ออกมาจากคอลัมน์ก่อนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เป็นต้น ทั้งนี้การแยกสารตามขนาดโมเลกุลจะมีประโยชน์อย่างมากเมื่อ สารที่เป็นองค์ประกอบในสารผสมมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันแต่มีขั้วใกล้เคียงกันมาก จึงทำให้แยกออกจากกันได้ยากเมื่อ ใช้ normal phase หรือ reverse phase แต่หากแยกสารเหล่านี้ด้วย Sephadex LH-20 ที่อาศัยหลักการแยกสารตามขนาด โมเลกุลจะสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ตามต้องการ ในบางครั้งโปรตีนที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเข้ามารบกวนกระบวนการแยกสาร อีกทั้งโปรตีนมักไม่คงตัวต่อความ ร้อนจึงสลายตัวกลายเป็นสารรบกวนได้ วิธีกำจัดโปรตีนออกจากสารสกัดทางชีวภาพมักทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เข้า กับน้ำได้ เช่น เมธานอล เมื่อทำสารสกัดในชั้นเมธานอลให้แห้งสนิท (ปราศจากน้ำ) แล้ว จึงจะสกัดสารสกัดที่ได้นั้นซ้ำอีกครั้ง ด้วยเมธานอลเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีโปรตีนติดมาด้วย เพราะโปรตีนจะละลายมากับน้ำในระหว่างกระบวนการสกัด นอกจากนี้ ยังสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้ด้วยการกรองผ่าน ultrafiltration membrane โดยใช้แรงดันสูญญากาศหรือแรงหมุนเหวี่ยง ช่วยไล่สารตัวอย่างให้ผ่านไปบนแผ่นกรอง สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเท่านั้นที่จะสามารถผ่านรูของแผ่นกรองไปได้ สำหรับ โปรตีนซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่นั้นไม่สามารถผ่านแผ่นกรองไปได้ อย่างไรก็ตามสารที่จะแยกด้วยวิธีนี้ได้ต้องมีขนาดโมเลกุล ใหญ่กว่า 2000 amu สำหรับสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากจะต้องแยกด้วยวิธีการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis)

ซึ่งสามารถ แยกโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า 2000-3000 amu ได้ โดยสารจะแพร่ผ่าน dialysis tubing ออกมา ยังสารละลายตัวกลางที่อยู่ ภายนอก โดยโปรตีนจะถูกกักเก็บไว้ใน tubing

5. สเตอริโอเคมี

สเตอริโอเคมี(Stereochemistry) เป็นวิชาเคมีที่เกี่ยวกับระยะอะตอมในโมเลกุล ซึ่งมีอิทธิพลต่อการแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และการค้นพบยา เนื่องจากในปัจจุบันมียาหลายชนิดที่จำหน่ายทั่วโลกจัดเป็น chiral drug ดังนั้นเทคนิคในการแยก chiral compound จึงมีความสำคัญมากขึ้น

โดยทั่วไปสามารถแบ่งไอโซเมอร์ (isomer) ออกเป็นหลายชนิดดังแผนภาพที่ 1 นอกจากนี้ยังสามารถแบ่ง stereoisomer ออกเป็น 2 ชนิด คือ enantiomer และ diastereomer โดยที่ enantiomer คือ โมเลกุลที่เป็นภาพกระจกเงา (mirror image) ซึ่งกันและกัน เนื่องจาก enantiomer ทั้งสองมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ เหมือนกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถแยก enantiomer ออกจากกันด้วยวัฏภาคคงที่ชนิด conventional reversed-phase stationary phase ได้ สำหรับ diastereomer ซึ่งโมเลกุลทั้งสองไม่ได้เป็น ภาพกระจกเงาซึ่งกันและกันนั้น มีคุณสมบัติทาง เคมีและกายภาพแตกต่างกันบ้าง จึงสามารถแยกออกจากกันด้วย conventional stationary phase ได้ นอกจากนี้ยัง สามารถแบ่ง diastereomer ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ optically active isomer และ non-optically active geometric isomer โมเลกุลที่มี optical actiชนิดนี้ไม่มีสมมาตร (symmetry) ภายในโมเลกุล ไม่สามารถซ้อนทับ (superimpose) กับโมเลกุลที่เป็นกระจกเงากันได้ โดยทั่วไปโมเลกุลชนิดนี้จะมีหมู่แทนที่โดยรอบ tetrahedral carbon atom ที่แตกต่างกันทั้ง 4 หมู่ ซึ่ง chiral molecule ของ lactic acid ที่มี central stereogenic center จะไม่มีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุล (internal symmetry plane) (รูปที่ 1) ดังนั้น lactic acid จึงมี chiral enantiomeric form 2 แบบ ในทางตรงกันข้าม propanoic acid ซึ่งมีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุลจัดเป็น achiral molecule ความแตกต่างระหว่าง enantiomer ทั้งสอง คือ มีปฏิกิริยากับ chiral molecule ชนิดอื่นได้แตกต่างกัน และมี คุณสมมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกันด้วย จึงเป็นเหตุให้มี optical activity ในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ (plane polarized light) ได้แตก ต่างกัน อย่างไรก็ตาม enantiomer ทั้งสองยังคงมีคุณสมบัติบางอย่างที่เหมือนกัน (identical) เช่น จุดหลอมเหลว การละลาย และข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีบางชนิด เป็นต้น ในปัจจุบันนิยมแยก enantiomer ให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC นอกจากนี้การแยก chiral drug ในเชิงอุตสาหกรรมจะนิยมใช้ simulated moving bed (SMB) chromatography โดยการทำให้เกิด diastereomeric complex จากนั้นจึงแยกต่อไปด้วย conventional reversed-phase chromatography หรือคอลัมน์ที่บรรจุ immobilized chiral stationary phase (CSP)

2.5.2 การเลือกตัวทำละลาย

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 83-84) กล่าวถึงการเลือกตัวทำละลายสรุปได้ดังนี้

1. ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายมีความสำคัญมากที่สุด ซึ่งจะทำให้ทราบว่าสารที่ต้องการละลายหรือไม่ละลายในตัวทำละลายชนิดใด เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งมีโครงสร้างสลับซับซ้อนมากน้อยต่างกันและมีอยู่ในพืชทั้งในสภาพอิสระและรวมตัวกับสารอื่นๆ ในสภาพเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นควรพิจารณาถึงสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญที่ต้องการสกัด นอกเหนือจากความมีขั้วของสาระสำคัญดังกล่าว 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

2.5.3 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 และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะสมกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน 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) วิธีการทำเพอร์โคเลชัน คือนำผงสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายก่อน 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 เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (extracting chamber) สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะวนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลืองแต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และตัวทำละลายที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม 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

2.5.4 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

2.5.5 **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

2.6 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

2.7 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 19-55) และชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ์ กล่าวโดยสรุปดังนี้

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหล่านี้ไม่จำเพาะเจาะจง และการให้ผลบวกก็เป็นเพียงการบอกถึงประเภทของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางชนิดเท่านั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสร้างคล้ายกันแต่เป็นสารต่างกลุ่มกันจะให้ผลบวกลวง ในอีกแง่หนึ่งการให้ผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเข้มข้นต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไม่พอต่อการตรวจสอบด้วยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี ดังนี้

2.7.1 การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการเกิดตะกอน

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

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรต

ใช้ปฏิกิริยามอลลิช (Molisch's test) การเกิดวงแหวนสีม่วงแดงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลวกับ Molisch reagent การตรวจสอบสมบัติการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing agent) ของโมโนแซคคาร์ไรด์ และไดแซ็กคาร์ไรด์ ใช้สารละลายเฟทลิ่ง (Fehling's solution) ถ้ามีจะเกิดตะกอนแดงของคิวปรัสออกไซด์ (cuprous oxide)

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

2. กลุ่มแอลคาลอยด์

อัลคาลอย์เป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล true alkaloids ต้องมีไนโตรเจนอยู่ใน heterocyclic ring และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน สามารถตรวจสอบด้วยน้ำยาทดสอบเบื้องต้น เช่น Dragendorff's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีแดงอิฐหรือสีส้ม Kraut's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีส้มน้ำตาลแดง Marme's reagent (potassium cadmium iodide) เกิด ตะกอนสีขาว และ Hager's reagent (picric acid) เกิดตะกอนสีเหลือง ทั้งนี้สารที่ใช้ตรวจสอบอัลคาลอยด์ เช่น Mayer reagent, Dragendorff reagent, Wagner reagent และ Ammonium reineckate จะให้ผลบวกลวงกับ coumarins, polyphenols, purines, amino acids, proteins และสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมักพบได้ในสาร สกัดจากพืช ในทางตรงกันข้ามอัลคาลอยด์ไม่ทุกชนิดที่อาจพบได้ในสารสกัดจากพืชจะให้ผลบวกกับสารทดสอบเหลานี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างทางเคมี

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

ภายในโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย steroids nucleus, unsaturated lactone ring และ rare sugar ซึ่งมีความสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแต่ละส่วนของโครงสร้างทำได้ดังนี้

1. Steroid nucleus ใช้วิธี Liebermann-Burchard test ให้สีฟ้าหรือเขียว สารทดสอบต้องแห้งและปราศจากน้ำ

2. Unsaturated lactone ring ตรวจสอบด้วย Kedde reagent หรือ Raymond reagent ให้สีม่วง น้ำเงิน หรือ Baljet reagent ให้สีส้ม-แดง

3. Deoxy sugar ตรวจสอบด้วย Killer-Kailiani test ให้วงแหวนสีม่วงแดงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลว ทั้งนี้สารประกอบหลายชนิดในกลุ่ม sesquiterpene lactones และ cardiacglycosides ที่มีโครงสร้าง เป็น unsaturated lactones จะให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย Kedde reagent, Baljet reagent และ Legal reagent

3.2 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์

ซาโปนินไกลโคไซด์เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีโครงสร้างทางเคมีแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของอะไกลโคน (aglycone) คือ สเตียรอยดอลซาโปจินิน (steroidal sapogenin) และไทรเทอร์พีนอยด์ซาโปจินิน (triterpenoid sapogenic) การตรวจสอบเบื้องต้น จากการเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ ฟองรูปหกเหลี่ยมจะคงอยู่นานกว่า 15 นาที และคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดง แตกออก นอกจากนี้ยังตรวจสอบด้วย Liebermann-Burchard test โดย steroidal saponins ให้สีฟ้า-เขียว ในขณะที่ triterpenoid saponins ให้สีม่วงแดง

3.3 กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยส่วนของ aglycone ของanthraquinones และน้ำตาล ซึ่ง anthraquinones มีคุณสมบัติละลายได้ดีในด่าง แล้วเกิดเป็นสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึง ไฮโดรไลซ์ anthraquinone glycosides ด้วยกรดหรือด่าง หรือ $FeCl_3$ หรือ sodium dithionate ให้กลายเป็น aglycone ของ anthraquinones แล้วจึงสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทดสอบกับด่างจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกว่า Borntrager test

3.4 กลุ่มไซยาโนจินิกส์ไกลโคไซด์

ทดสอบด้วยวิธี 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) ถ้าหากเป็นไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์จะสังเกตเห็นจุดสีเหลืองปรากฏขึ้นบนพื้นสีแดง

3.6 กลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์

ฟลาโวนอยด์แบ่งออกเป็น typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids การตรวจสอบสารในกลุ่มนี้ ทำได้ดังนี้

1. Shibata's reaction หรือ Cyanidin test เป็นการตรวจสอบโครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์ หากมีโครงสร้างเป็น benzo-pyrone ที่เป็นโครงสร้างส่วนสำคัญใน flavones, flavonols, flavanones, flavanonols และ isoflavones จะเกิดปฏิกิริยากับแมกนีเซียมโดยมีกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้นช่วยละลายแมกนีเซียมและเร่งปฏิกิริยา ได้ผลบวกเป็นสารละลายสีส้ม แดง หรือชมพู

2. Pew test ใช้หลักการเดียวกันกับ cyanidin test แต่ใช้สังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลบวกจะให้สารละลายเป็นสี ส้ม แดง แต่สีที่เกิดขึ้นจางกว่าวิธี cyanidin test

3. Ferric chloride (FCl_3) test เป็นการตรวจสอบ phenolic group ในโครงสร้าง ซึ่งพบได้ใน flavonoids, tannins, coumarins, quinones และสารที่ประกอบด้วย phenolic group ผลบวกจะเกิดตะกอนหรือสารละลายมีสีเขียว น้ำเงิน หรือดำ

4. Bromine water เป็นการตรวจสอบสารในกลุ่ม proanthocyanidins ที่เป็นองค์ประกอบใน condensed tannins ผลบวกเกิดตะกอนสีเหลือง ซึ่ง flavonoids กลุ่มอื่น ๆ จะให้ผลลบ

5. Molisch's test เป็นการทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต หากพบน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ glycosides จะพบวงแหวนสีม่วงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลว และในบางครั้งพบสีม่วงกระจายอยู่ทั่วไปในชั้นล่างที่เป็นชั้นกรดซัลฟิวริก เข้มข้น

6. การตรวจสอบโดยใช้สารละลายกรดและด่าง จะพบว่าฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงสีได้ตามสภาพความ เป็นกรดหรือด่าง หากเป็นสารกลุ่ม anthocyanins เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สีม่วง หรือน้ำเงิน หากเป็นสารกลุ่ม chalcones และ aurones เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สี ส้มหรือแดง ทั้งนี้สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะให้ผลบวกกับ Shinoda test และกรดซัลฟิวริก 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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2.7.2 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 2.4 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) ให้สีแดงหรือน้ำเงิน
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	น้ำยาเคคเด (Kedde reagent) ให้สีชมพู หรือน้ำเงินอมม่วงกับพวกคาร์ดีโนไลด์ (cardenolide) แอนติโมนีคลอไรด์ (antimony chloride) ให้สีน้ำเงินหรือเรืองแสงสีเหลืองอมเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm กับพวกบิวฟาไดอีโนไลด์ (bufadienolide)

ตารางที่ 2.4 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
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
แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (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 :แอซีโทน : กรดฟอร์มิก (chloroform : acetone : formic acid) 75:16.5 :8.5 หรือ เอทิลแอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate : methanol:water) 100:13.5:10 หรือโทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene: chloroform) 9:11	เนเชอรัล โปรดักส์ (ไดฟีนิลโบริลออกซีเอทิลลามีน) -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

ตารางที่ 2.4 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
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
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

2.8 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

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

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 สามารถแยกออกได้เป็น 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 ที่ดีจะต้องเป็นค่าที่ไม่ทำให้สารที่สนใจติดค้างอยู่จุดเริ่มต้นหรือเคลื่อนที่ต่ำกลเกินไปจนใกล้หรือคิดตัก solvent front เมื่อหาสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เหมาะสมแล้วจึงนำตัวอย่างที่ต้องการแยกในปริมาณสูงขึ้นมาแยกในคอลัมน์ต่อไป อย่างไรก็ตามไม่สามารถนำสภาวะหรือสัดส่วนขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จาก TCL มาใช้กับ CC ได้โดยตรง เนื่องจากคอลัมน์เป็นการเคลื่อนที่แบบสองทิศทางและมีสมดุลเกิดขึ้นในคอลัมน์ แต่ TCL นั้นมีสมดุลระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตลอดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อต้องการนำสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ใน TLC ไปใช้ในการแยกสารด้วย CC จึงแนะนำให้ลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC ลงเล็กน้อย(ในกรณีที่วัฏภาคคงที่เป็น normal phase) และเพิ่มความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน 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 การแบ่งตามลักษณะ

ทางกายภาพของระบบ 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) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของสารที่อาศัยหลักการสกัดระหว่างของเหลวกับของเหลวโดยวัฏภาคคงที่เป็นของเหลวชนิดหนึ่งที่เคลือบอยู่บน solid support เช่น คอลัมน์ของ เซลลูโลสที่เคลือบด้วยน้ำ หรือ silica TLC plate ที่ดูดซับน้ำเอาไว้บนผิวหน้า ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เข้ากันไม่ได้กับของเหลวที่เป็นวัฏภาคคงที่ จึงทำให้เกิดการสกัดระหว่างขั้นของของเหลว (liquid-liquid extraction) ซึ่งเป็นข้อดีของการแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ก็มีข้อเสียคือวัฏภาคคงที่ที่เป็นของเหลวจะถูกชะออกไปจากคอลัมน์พร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ 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 จึงเป็นการแยกสารที่อาศัยหลักการร่วมกันระหว่างการแยกส่วน (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 จึงสามารถชะสารตัวอย่างออกมาตามลำดับโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะการแตกตัวของสารที่มีประจุ 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) ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอออนตรงข้าม (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 โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนได้และจะถูกชะออกมาก่อนในขณะที่โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้โมเลกุลสาร

ตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่สุดจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดเล็กที่สุดได้ 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 เนื่องจากเทคนิคนี้ทำได้ยากและต้องใช้เวลานานมากในการเตรียมลิแกนด์ที่เหมาะสมให้มีปริมาณเพียงพอต่อการแยกสารแต่ละครั้ง หากสารผสมเมื่อเริ่มต้นนั้นซับซ้อนเช่นในกรณีสารสกัดหยาบจากพืชหรือจุลินทรีย์ที่มักมีสารอื่นเข้ามารบกวนการแยกหรือขัดขวางการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์และลิแกนด์ (receptor –ligand interaction) หรือสารเหล่านี้เข้าไปดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับวัฏภาคคงที่ จะทำให้การแยกสารไม่สมบูรณ์ และยิ่งไปกว่านั้นการได้สารกลับคืนมา(recovery) จะขึ้นอยู่กับแรงที่จับกันอย่างผันกลับได้ ซึ่งการรบกวนของสารหลายชนิดอาจขัดขวางการได้สารกลับคืนมาด้วย

4. Gradient high performance liquid chromatography (Gradient HPLC)

Gradient high performance liquid chromatography เป็นเทคนิคการแยกสาร โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงความต่างระดับของความมีขั้ว (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 เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ศิริพร ซึงสนธิพร(2535) ศึกษาผลทางอัลลิโลพาธิคของวัชพืชสาบหมา(Eupatorium adenophorum Spreng.) ต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูกและวัชพืชบางชนิด พบว่าสารสกัดจากวัชพืชสาบหมาสามารถยับยั้งการงอกอย่างรุนแรง (ร้อยละ 80-90) ต่อวัชพืช 8 ชนิดคือ ผักโขมหนาม ผักโขมหัด ปืนนกไส้ กระดุมใบใหญ่ กระหล่ำปลี หงอนไก่ ป่า โสนขน และหญ้าปากควาย

พะเยาว์ สีนวนสลุง (2544) ศึกษาผลของสารอัลลีโลพาธิกจากสาบเสือ (Eupatorium odoratum Linn.) ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชปลูกและวัชพืชบางชนิด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากใบสาบเสือที่มีผลต่อการยับยั้งความงอกดีที่สุด เป็นดังนี้ ตัวทำละลายคือไดคลอโรมีเทน ส่วนของพืชคือใบ พืชที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดคือผักขมหนาม

ดารารัตน์ มณีจันทร์ (2547) ศึกษาผลทางอัลลีโลพาทีของพุทธชาดก้านแดงพบว่าสารสกัดจากใบ กิ่ง ลำต้น ส่งผลต่อการงอกของโสน ไมยรา หญ้าข้าวนก และหญ้าอะตราตัม สารสกัดที่เป็น acidic extract มีผลในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 4 ชนิดได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น การเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัดมีผลให้การงอกและการเจริญเติบโตถูกยับยั้งมากขึ้น

เกล้ายุคล สุจิรา (2547) ศึกษาผลของสารสกัดจากธูปฤาษี (Typha angustifolia Linn.) ต่อการเจริญเติบโตของพืช และการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดและเอทานอลเป็นสารละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด สารสกัดที่มีความเข้นข้น 5000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของรากพืชมากกว่าร้อยละ 80 ของพืชควบคุม ยับยั้งการเจริญของต้นผักกาดขาวปลี หงอนไก่ป่า ก้นจ้ำขาว ดอกใหญ่ ถั่วผี ไมยราบเครือ และสามารถยับยั้งการงอกของผักกาดขาวปลีได้อย่างสมบูรณ์

วิมลพรรณ รุ่งพรหม และ สุปราณี แก้วกระจ่าง (2550) ศึกษาสารยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืชจากรากลำเจียกในนาข้าวของไทย พบว่าสารสกัดเอทิลแอซีเตต ความเข้มข้น 10 mg/ml ของรากลำเจียก *Coix aquatica* Roxb แสดงผลการยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้ดี โดยมีเปอร์เซนต์การยับยั้งการงอกร้อยละ85 ผู้วิจัยจึงทำการแยกสารโดยใช้ฤทธิ์การยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบ เป็นตัวชี้นำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าเมื่อแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโทรกราฟี สามารถแยกสารได้ประกอบ 2 ชนิด เมื่อพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และแมสเปกโทรเมทรี พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวคือ กรดพารา-เมทอกซีเบนโซอิก(p-methoxybenzoic acid, 1) ไซลินดอล บี (cylindol B, 2) สารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิด แสดงการยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยมีร้อยละของการยับยั้งเป็น 75 และ 80 ตามลำดับ

อาทิตยา นุราฤทธิ์ และคณะ (2552) ศึกษาผลของสารสกัดจากใบพืชในวงศ์ Anonaceae 3 ชนิดต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้า หญ้าขจรจบดอกเล็กและหญ้ารังนกพบว่า สารสกัดจากใบลำดวน กระดังงาจีน และน้อยหน่า มีผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของหญ้าขจรจบและดอกเล็กและหญ้ารังนกที่ระดับแตกต่างกัน และมีผลต่อความยาวของราก และความยาวของลำต้นในเปอร์เซนต์ที่สูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

การพัฒนาสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช มีรายละเอียดของการศึกษาดังนี้

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. ตู้อบ
2. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
5. เครื่องทำแสง UV
6. เตาไฟฟ้า
7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
8. ชุดกรองสาร
9. ชุดคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.1.2 สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane)
2. เมทานอล (Methanol)
3. เอทิลแอซิเตต (Ethylacetate)
4. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
5. ซิลิจาเจล

3.2 พืชสมุนไพร และวัชพืช

3.2.1 พืชสมุนไพร

1. ตะบัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Xylocarpus gangeticus* Parkins.

ชื่อวงศ์ : MELIACEAE

2. มะพอก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Parinari anamense* Hance

ชื่อวงศ์ : CHRYSOBALANACEAE

3.2.2 วัชพืช

1. หญ้ารังนก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Chloris barbata* Sw.

ชื่อวงศ์ : GRAMINEAE

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บ และการเตรียมพืชสมุนไพร

1. ทำการสำรวจอนุกรมวิธานของพืชสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ ตะบัน และมะพอก โดยรับรองพืชสมุนไพรตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์ (Voucher Specimens)

2. นำส่วนใบของตะบัน และมะพอก มาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

3. นำส่วนใบของตะบัน และมะพอกที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารพืชสมุนไพร

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากตะบัน และมะพอกใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูง คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับดังนี้

1. ส่วนใบของตะบัน และมะพอก ที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 0.5 กิโลกรัม แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือเฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2. นำของผสมมากรองแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไปประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของขั้นเฮกเซน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นต่อไป

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

3.3.3 การทดสอบการยับยั้งการงอก และการเจริญเติบโตของวัชพืช

วัชพืช โดยนำเมล็ดวัชพืชใส่ลงไปในจานเพาะเมล็ดจำนวน 20 เมล็ดต่อจาน ปิดฝาครอบจานแล้ววาง1. นำสารสกัดที่ได้ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล มาชั่งน้ำหนัก และเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นตามที่กำหนดคือ 1,000 2,000 และ 3,000 ppm โดยทดสอบเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

2. ใส่สารสกัดทุกระดับความเข้มข้นคือ 1,000 2,000 และ 3,000 ppm ลงในจานเพาะจำนวน 5 มิลลิลิตร ซึ่งในจานเพาะรองด้วยกระดาษเพาะเมล็ด ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3. นำจานเพาะที่ใส่สารสกัดแล้วไปใส่ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวละลายระเหยจนหมด ให้เหลือแต่สารที่สกัดได้

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อจานเพาะ นำไปเพาะเมล็ดไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติเป็นเวลา 7 วัน

5. บันทึกผลการงอก โดยนับเมล็ดที่มีรากโผล่พ้นเปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งมีรากยาว 2 มิลลิเมตร วัดความยาวของรากและความยาวของต้นวัชพืช แต่ละจานเพาะทำ 5 ซ้ำ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

นำผลที่ได้มาคำนวณ เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืช โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก = $\{1 - (T/C)\} \times 100$

C แทน จำนวนเมล็ดที่งอกโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน จำนวนเมล็ดที่งอกโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก = $\{1 - (T/C)\} \times 100$

C แทน ความยาวของรากโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน ความยาวของรากโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น = $\{1 - (T/C)\} \times 100$

C แทน ความยาวลำต้นโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน ความยาวลำต้นโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้ง = $\{1 - (T/C)\} \times 100$

C แทน น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

3.3.4 การแยกสาร และการทดสอบ

การแยกสารสกัดจากตะบัน และมะพอกแห้งโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช

3.3.4.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี

นำสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช มาทำการแยกสารโดยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในขั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนี้

1. นำสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดใส่ในขวดเล็ก และละลายด้วยตัวทำละลายชนิดเดิม

2. เตรียมแผ่น TLC ให้มีขนาดพอเหมาะประมาณ 2×5 เซนติเมตร แล้วจุด(spot) สารสกัดที่ละลายแล้วในขั้นตอนที่ 1 ลงบนแผ่น 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 แล้วเตรียมแผ่นกระจกปิดไว้เพื่อให้ขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

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

5. นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

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

7. เตรียมตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.3.4.2 การแยกสารสกัดโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และการทดสอบฤทธิ์ของสาร

เตรียมคอลัมน์แก้วโดยใช้ขาตั้ง (stand) และตัวจับ (clamp) จับคอลัมน์ให้ตั้งฉากกับพื้น อุดปลายคอลัมน์ด้วยสำลีสะอาดจำนวนเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายเฮกเซนลงไปประมาณครึ่งคอลัมน์เปิดก๊อกปิดเปิด (stopcock) ด้านล่างคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อไล่ฟองอากาศและป้องกันสำลีย้อย นำซิลิกาเจล ผสมกับตัวทำละลายเฮกเซนให้เข้ากัน เพื่อห้องกันการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์ แล้วนำไปบรรจุในคอลัมน์ ค่อยๆ บรรจุซิลิกาเจลลงไปให้ติดต่อ และสม่ำเสมอกันพร้อมทั้งเปิดที่ก๊อกปิดเปิดด้านล่างคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านอย่างช้าๆ และค่อยๆ ปรับผิวหน้าให้เรียบโดยการเคาะคอลัมน์เบาๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เมื่อบรรจุซิลิกาเจลเสร็จแล้วก็ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 5 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าซิลิกาเจลจึงปิดที่ก๊อกปิดเปิดด้านล่างของคอลัมน์ นำสารสกัดจากตะบันและมะพอกที่ให้ผลดีที่สุดมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน 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 ทำการเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาครั้งละ 20 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ถูกชะออกมาแต่ละชั้นมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) จากนั้นจึงทำการรวมสารที่เหมือนกันในแต่ละชั้น (fraction) เข้าด้วยกันและนำไปทำการระเหยก่อนนำไปทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชในขั้นตอนต่อไป

3.3.5 การทดสอบการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารแต่ละชั้น

1. นำสารชั้น (fraction) มาชั่งน้ำหนัก และเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นตามที่กำหนดคือ 100 ppm โดยทดสอบเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

2. ใส่สารสกัดทุกชั้น (fraction) ที่ะดับความเข้มข้นคือ 100 ลงในจานเพาะจำนวน 5 มิลลิลิตร ซึ่งในจานเพาะรองด้วยกระดาษเพาะเมล็ด ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3. นำจานเพาะที่ใส่สารสกัดแล้วไปใส่ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวละลายระเหยจนหมด ให้เหลือแต่สารที่สกัดได้

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อจานเพาะ นำไปเพาะเมล็ดวัชพืช โดยนำเมล็ดวัชพืชใส่ลงไปในจานเพาะเมล็ดจำนวน 20 เมล็ดต่อจาน ปิดฝาครอบจานแล้ววางไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติเป็นเวลา 7 วัน

5. บันทึกผลการงอก โดยนับเมล็ดที่มีรากโผล่พ้นเปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งมีรากยาวอย่างน้อย 2 มิลลิเมตร วัดความยาวของรากและความยาวของต้นวัชพืช แต่ละจานเพาะทำ 5 ซ้ำ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

นำผลที่ได้มาคำนวณ เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืช โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก = $\{1 - (T/C)\} \times 100$

C แทน จำนวนเมล็ดที่งอกโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน จำนวนเมล็ดที่งอกโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก = $\{1 - (T/C)\} \times 100$

C แทน ความยาวของรากโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน ความยาวของรากโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น = $\{1 - (T/C)\} \times 100$

C แทน ความยาวลำต้นโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน ความยาวลำต้นโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้ง = $\{1 - (T/C)\} \times 100$

C แทน น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละ

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2554 – 30 กันยายน 2555

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การศึกษาการยับยั้งการงอก และการเจริญเติบโตของหญ้ารังนกซึ่งเป็นวัชพืชในนาข้าว โดยใช้สารสกัดจากใบ ของตะบัน และมะพอก ที่ได้มาจากการหมักแบบ Maceration และเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ผลการทดลองเป็นดังนี้

4.1 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการงอกของวัชพืช

ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชของสารสกัดจากใบตะบัน

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก
Hexane	1,000	53.45
	2,000	65.43
	3,000	68.39
Ethylacetate	1,000	68.78
	2,000	75.44
	3,000	74.09
Methanol	1,000	58.99
	2,000	69.51
	3,000	70.22

จากตารางที่ 4.1 สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบตะบันด้วย Hexane ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะพอก

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก
Hexane	1,000	65.87
	2,000	69.42
	3,000	70.89
Ethylacetate	1,000	59.90
	2,000	60.18
	3,000	63.98
Methanol	1,000	56.89
	2,000	59.01
	3,000	60.44

จากตารางที่ 4.2 สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Methanol ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชต่ำที่สุด

4.2 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของวัชพืช

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชของสารสกัดจากใบตะบัน

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก
Hexane	1,000	65.78
	2,000	67.49
	3,000	66.32
Ethylacetate	1,000	74.96
	2,000	76.59
	3,000	79.01
Methanol	1,000	70.73
	2,000	73.22
	3,000	73.94

จากตารางที่ 4.3 สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบตะบันด้วย Hexane ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชของสารสกัดจากใบตะบัน

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น
Hexane	1,000	65.59
	2,000	64.32
	3,000	66.91
Ethylacetate	1,000	65.28
	2,000	69.72
	3,000	70.15
Methanol	1,000	64.59
	2,000	68.75
	3,000	69.11

จากตารางที่ 4.4 สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบตะบันด้วย Hexane ความเข้มข้น 2,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชของสารสกัดจากใบตะบัน

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้ง
Hexane	1,000	67.03
	2,000	68.94
	3,000	69.07
Ethylacetate	1,000	70.15
	2,000	75.42
	3,000	74.39
Methanol	1,000	74.34
	2,000	75.48
	3,000	77.91

จากตารางที่ 4.5 สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบตะบันด้วย Hexane ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะพอก

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก
Hexane	1,000	71.12
	2,000	79.95
	3,000	78.78
Ethylacetate	1,000	65.45
	2,000	65.99
	3,000	69.80
Methanol	1,000	62.98
	2,000	65.09
	3,000	66.47

จากตารางที่ 4.6 สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Methanol ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะพอก

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น
Hexane	1,000	69.05
	2,000	70.44
	3,000	72.59
Ethylacetate	1,000	64.98
	2,000	70.03
	3,000	69.95
Methanol	1,000	64.43
	2,000	68.11
	3,000	67.81

จากตารางที่ 4.7 สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Methanol ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะพอก

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้ง
Hexane	1,000	73.42
	2,000	78.43
	3,000	76.85
Ethylacetate	1,000	66.59
	2,000	69.43
	3,000	68.12
Methanol	1,000	62.21
	2,000	64.98
	3,000	66.11

จากตารางที่ 4.8 สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Methanol ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชต่ำที่สุด

4.3 ผลของสารแต่ละชั้นต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช

ตารางที่ 4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดชั้น Ethylacetate จากใบตะบัน

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง %	ชั้น (fraction) ของสารสกัดจาก Ethylacetate (100 ppm)				
	F1	F2	F3	F4	F5
การยับยั้งการงอก	75.91	56.32	70.21	49.50	62.27
การยับยั้งความยาวราก	78.32	61.23	69.87	56.21	65.32
การยับยั้งความยาวต้น	79.08	54.12	68.94	52.23	63.55
การยับยั้งน้ำหนักแห้ง	76.99	59.52	68.77	53.96	67.21

จากตารางที่ 4.9 สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ความเข้มข้น 100 ppm ชั้น F1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุด

ส่วนชั้น F4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งต่ำที่สุด

ตารางที่ 4.10 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดชั้น Hexane จากใบมะพอก

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง %	ชั้น (fraction) ของสารสกัดจาก Hexane					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
การยับยั้งการงอก	56.32	48.21	64.28	68.21	51.21	45.39
การยับยั้งความยาวราก	57.84	48.41	64.81	70.29	52.47	46.88
การยับยั้งความยาวต้น	55.02	47.68	67.32	73.24	54.91	47.59
การยับยั้งน้ำหนักแห้ง	56.96	48.09	65.87	73.80	53.38	46.33

จากตารางที่ 4.10 สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ความเข้มข้น 100 ppm ชั้น F4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุด

ส่วนชั้น F6 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งต่ำที่สุด

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการงอกของวัชพืช

1. สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบตะบันด้วย Hexane ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชต่ำที่สุด

2. สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Methanol ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชต่ำที่สุด

5.1.2 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของวัชพืช

1. สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบตะบันด้วย Hexane ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชต่ำที่สุด

2. สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบตะบันด้วย Hexane ความเข้มข้น 2,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชต่ำที่สุด

3. สารสกัดจากใบตะบันด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบตะบันด้วย Hexane ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชต่ำที่สุด

4. สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Methanol ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชต่ำที่สุด

5. สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Methanol ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชต่ำที่สุด

6. สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Hexane ที่มีความเข้มข้น 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชสูงที่สุด ส่วน สารสกัดจากใบมะพอกด้วย Methanol ความเข้มข้น 1,000 ppm มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชต่ำที่สุด

5.3.3 ผลของสารแต่ละชั้นต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช

1. สารสกัดจากใบตะบันด้วย **Ethylacetate** ความเข้มข้น 100 ppm ชั้น F1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุด

ส่วนชั้น F4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งต่ำที่สุด

2. สารสกัดจากใบมะพอกด้วย **Hexane** ความเข้มข้น 100 ppm ชั้น F4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุด

ส่วนชั้น F6 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งต่ำที่สุด

5.2 อภิปรายผล

การศึกษาการยับยั้งการการงอก และการเจริญเติบโตของหญ้ารังนกซึ่งเป็นวัชพืชในนาข้าว โดยใช้สารสกัดจากใบ ของตะบัน และมะพอก ที่ได้มาจากการหมักแบบ Maceration และเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล

จากผลการศึกษามีประเด็นที่นำมาอภิปรายดังนี้

1. สารสกัดจากใบตะบันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 2,000-3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชสูงที่สุด เมื่อนำสารดังกล่าวไปทำการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟฟีพบว่า สารสกัดชั้น F1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกสูงที่สุด เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุด

2. สารสกัดจากใบมะพอกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ Hexane ที่มีความเข้มข้น 2,000-3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชสูงที่สุด เมื่อนำสารดังกล่าวไปทำการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟฟีพบว่า สารสกัดชั้น F4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกสูงที่สุด เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุด

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยต่อไปควรมีการศึกษาการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช โดยทำการแยกสารถึงระดับโมเลกุล และใช้ส่วนของพืชทั้งจากราก เมล็ด ดอก และผล เพื่อจะได้ข้อมูลฤทธิ์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชที่ครบถ้วน เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรไปทำให้บริสุทธิ์และพัฒนาต่อยอดการวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บรรณานุกรม

กรรณิกา สุขนิตย์ สุรินทร์ . 2544. **การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารเคมีในพืช** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสุรินทร์

เกล้ายุคล สุจิรา 2547. **ผลของสารสกัดจากธูปฤาษี (Typha angustifolia Linn.) ต่อการเจริญเติบโตของพืช และการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช.** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดารารัตน์ มณีจันทร์ 2547. **ผลทางอัลลีโลพาทีของพทุธชาติก้านแดง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นรีศา คำแก่น . 2551. **การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : ก็อปปี้บอกซ์.

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

พะเยาว์ สีนวนสลุง 2544 . **ผลของสารอัลลีโลพาธิกจากสามเสือ (Eupatorium odoratum Linn.) ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชปลูกและวัชพืชบางชนิด.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2538. **สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชัย แซ่เซียว. 2531. **ผลทางแอลลิลโลพาธิคของยูคาลิปตัส (Eucalyptus Camaldulensis) ที่มีต่อต้นอ่อนของไมยราบยักษ์.** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิมลพรรณ รุ่งพรหม และ สุปราณี แก้วกระจ่าง **การศึกษาสารยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืชจากราก ลำเจียก** วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร . 38(6)(พิเศษ): 299-302 (2550)

ศิริพร ซึงสนธิพร. 2535. **ผลทางอัลลิโลพาธิคของวัชพืชสาบหมา (Eupatorium adenophorum Spreng.) ต่อการเจริญเติบโตของพืชปลูกและวัชพืชบางชนิด** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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

สืบศักดิ์ อนันต์พัฒนา. 2547. ผลทางอัลลีโลพาทิกของแซนทอกซีลินจากผลกำจัดต้น วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อาทิตยา นุราฤทธิ์ และคณะ (2552) **ผลของสารสกัดจากใบพืชในวงศ์ Anonaceae ต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าหญ้าขจรจบและดอกเล็กและหญ้ารังนก** วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 25 ฉ 1 2552 น115-131

Copeland L. O. and M. B. McDonald. 1995. **Principles of Seed Science and Technology**. 3rd ed. Thomson publishing Company, Mexico.

Beadle, C.L. 1993. **Growth analysis**. In (Hall, D.O. *et al*. Ed.) Photosynthesis and Production in the Changing Environment: A Field and Laboratory Manual. Chapman & Hall : London.