รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะเดื่อ

อุดมวิชช์ พลเยี่ยม

ทวีสิริ มาลาพันธุ์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

Chemical composition and Biological activity of Ficus hispida Linn.

Udomwish Polyium

Thaweesiri Malaphan

This Research in Funded by
Institute of Research and Development
Rajamangala University of Technology Phra Nakorn
Fiscal Year 2010

ชื่อเรื่อง : **องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะเดื่อ**

ผู้วิจัย : **ผศ. อุดมวิชช์ พลเยี่ยม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.พระนคร**

นางสาวทวีสิริ มาลาพันธุ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ฤทธิ์ทางชีวภาพของมะเดื่อการสกัดใช้เทคนิค Sequential Extraction และใช้วิธีการหมักแบบ Maceration โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบ 12 ชนิดทำการทดสอบเซลล์มะเร็งในช่องปาก (human mouth carcinoma : KB) เซลล์มะเร็งปอด (human small cell lung cancer : NCI-H187) เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer : MCF-7) ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*) ใช้วิธี Microculture Radioisotope Technique การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค(Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB)ใช้วิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA)

ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากส่วนของมะเดื่อ ส่วนใหญ่ มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ทั้งมะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และมะเร็งในช่องปาก สารสกัดจากส่วนของมะเดื่อไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และ สารสกัดจากส่วนของมะเดื่อ บางส่วน แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ในการวิจัยต่อไปควรมีการศึกษาถึงระดับโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งส่วนของมะเดื่อที่มาจาก ราก เมล็ด ใบ ดอก และผล เพื่อจะได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรไปทำให้บริสุทธิ์และพัฒนาต่อยอดการวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

Title : **Chemical composition and Biological activity of Ficus hispida Linn.**

Researcher : **Udomwish polyium, Thaweesiri Malaphan**

Faculty of Science and Technology, RMUTP

ABSTRACT

To study the effect biological activity of a fig tree extract using Sequential Extraction and use of fermentation Maceration using solvent 3 types of hexane, ethyl acid state, and methanol to extract 12 Chanin made. tested oral cancer cells (human mouth carcinoma: KB) lung cancer cells (human small cell lung cancer: NCI-H187), breast cancer (breast cancer: MCF-7) anti-malarial. (Anti-malaria; Plasmodium falciparum) Microculture Radioisotope Technique used to test anti-tuberculosis (Anti-Mycobacterium. tuberculosis. anti-TB) to the Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA).

The results showed that extracts of the fig tree has anti-cancer Including breast cancer, lung cancer and oral cancer. Extracts of the fig tree does not have anti-tuberculosis and extracts of the fig tree shows some anti-malarial. In further research should study the molecular and biological activity of the fig tree from the roots, seeds, leaves, flowers and fruit to the biological activity of the data for a selection of extracts from medicinal plants to make. Purification and further develop research in the next commercial.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่ององค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะเดื่อนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 ของสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์จุฑามาศ พีระพัชระ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้สนับสนุนการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คณบดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการทางเคมีอินทรีย์ในการทดลอง เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTECH) ที่ให้คำปรึกษาและการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัย

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	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**4**
2.1 พืชสมุนไพร	4
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร	6
2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร	8
2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	18
2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	20
2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร	28
2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	35
2.8 ลักษณะทั่วไปของมะเร็ง	36
2.9 ลักษณะทั่วไปของวัณโรค	45
2.10 ลักษณะทั่วไปของมาลาเรีย	49
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	60

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	**63**
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	63
3.2 พืชสมุนไพร และจุลชีพ	64
3.3 วิธีการทดลอง	64
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	69
3.5 ระยะเวลาการทดลอง	69
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	69
บทที่ 4 ผลการทดลอง	**70**
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง	70
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค	74
4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย	75
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	**76**
5.1 สรุปผลการทดลอง	76
5.2 อภิปรายผล	78
5.3 ข้อเสนอแนะ	78
บรรณานุกรม	**79**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี	28
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ	70
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ	72
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ	73
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ	74
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ	75

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อน จึงทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ จากความหลากหลายทางชีวภาพดังกล่าวทำให้มีพืชสมุนไพรเป็นจำนวนมาก ซึ่งพืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมาแต่โบราณและสืบทอดต่อมาจนเกิดเป็นยากลางบ้านหรือยาแผนโบราณในปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญต่อการนำพืชสมุนไพรมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่นในอุตสาหกรรมยา มีการค้นพบยาชนิดใหม่ๆ จากการค้นพบองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาแล้วนำมาใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาและสังเคราะห์ยาตามกรรมวิธีทางเภสัชกรรม เช่น ยาต้านมาลาเรีย ยาฆ่าแมลง ยารักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีการใช้สมุนไพรในรูปอาหารเสริมสุขภาพ (Health foods) และใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง เช่นกรดแอลฟาไฮดรอกซี(AHAs) ที่สกัดจากผลไม้เป็นต้น (รัตนา อินทรานุปกรณ์ , 2547 : 1-9) การสกัดสารจากพืชสมุนไพรและการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ประโยชน์นั้นเป็นวิธีหนึ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างมากเพื่อนำมาใช้หาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ๆ จากพืชชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นที่ได้รับความสนใจทำการศึกษาและวิจัยเป็นอย่างมาก และเป็นการนำสมุนไพรในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด (สุภาพ บุณยะรัตเวช, 2523 :118 และรัตนา อินทรานุปกรณ์ , 2547 : 63-79) การตรวจสอบคุณสมบัติของสารสกัดในการต้านจุลินทรีย์โดยการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายๆชนิดนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถชี้บ่งถึงประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างจำเพาะ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรไปทำให้บริสุทธิ์และพัฒนาต่อไป

ประกอบกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) ซึ่งเน้นการพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมโดยให้ความสำคัญกับการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น โดยใช้หลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญในการจัดการองค์ความรู้และสร้างภูมิคุ้มกันส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชนรวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ(Biological activity) ชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข ในการป้องกันและการรักษาโรค โดยการนำมะเดื่อมาสกัดและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และ ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย เพื่อเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพของพืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งนำไปเป็นยา อาหารเสริมหรือเครื่องสำอาง และนำไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสกัดสารสำคัญของมะเดื่อ
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของมะเดื่อ
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของมะเดื่อ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือมะเดื่อ*(Ficus sp.)* ส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือ ราก เปลือก เมล็ดและ ใบ

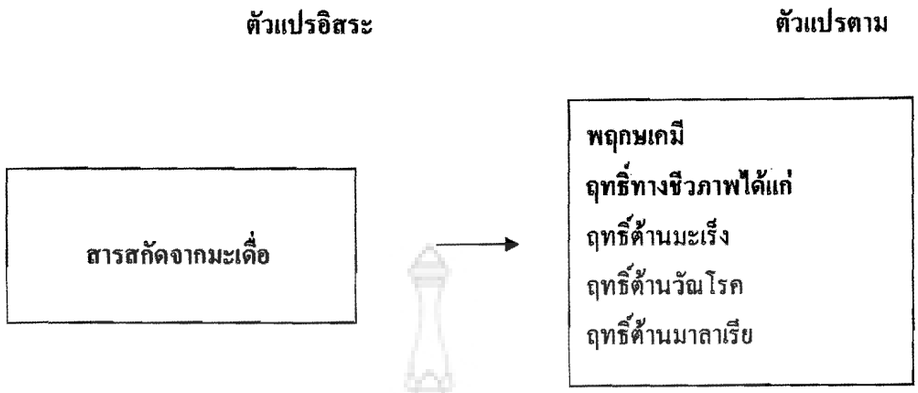
2. เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัยคือ เซลล์มะเร็งในช่องปาก (Oral cavity cancer : KB) เซลล์มะเร็งในปอด(small cell lung cancer : NCI-H187) และเซลล์มะเร็งในเต้านม (breast cancer : MCF-7)

3. เชื้อวัณโรค เชื้อวัณโรคที่ใช้ในการวิจัยคือ *Mycobacterium tuberculosis* ($H_{37}Ra$)

4. เชื้อมาลาเรีย เชื้อมาลาเรีย ที่ใช้ในการศึกษา คือ *Plasmodium falciparum*

5. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย



1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ด้านคุณสมบัติทางชีวภาพในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์ต้านมาลาเรีย สำหรับนำไปพัฒนาเป็นยาและเครื่องสำอาง เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรไทยซึ่งจะนำไปสู่การผลิตเชิงอุตสาหกรรมและเชิงพาณิชย์ต่อไป

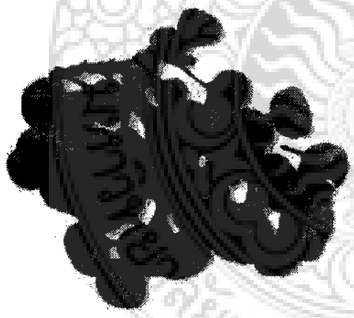
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่ององค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะเดื่อ คณะผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 พืชสมุนไพร
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร
2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร
2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร
2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
2.8 ลักษณะทั่วไปของมะเร็ง
2.9 ลักษณะทั่วไปของวัณโรค
2.10 ลักษณะทั่วไปของมาลาเรีย
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัยคือ มะเดื่อ ข้อมูลอนุกรมวิธานที่สำคัญของพืชสมุนไพรประกอบด้วยชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อวงศ์ ชื่อพื้นเมือง ลักษณะทั่วไป ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และประโยชน์ดังนี้



http://scratchpad.wikia.com/

1. ชื่อ มะเดื่อปล้อง

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

3. ชื่อวิทยาศาสตร์ Ficus hispida Linn. f.

4. วงศ์ MORACEAE

5. แหล่งที่พบ พบทุกภาคของประเทศ

6. ประเภทไม้ ไม้ยืนต้น

7. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น ไม้ยืนต้นขนาดกลางสูงประมาณ 5-10 เมตร ลำต้นเดี่ยวตั้งตรงเปลือกหนา กิ่งแขนงแตกเป็นพุ่มทรงกลมทึ้งต้น มีน้ำยางสีขาว ลำต้นมีรอยควั่นเป็นปล้องหรือเป็นข้อๆ คล้ายข้อไม้ไผ่ตลอดจนถึงกิ่ง

ใบ ใบเดี่ยวออกตรงข้ามกัน รูปไข่แกมขอบขนานหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ ผิวสากหนืดมือ คล้ายใบย่อยมีขนนาบกับแผ่นใบสีเขียวสด

ดอก มีสีเหลืองแกมเขียว ออกช่อกระจุกแน่น เจริญอยู่ในฐานรองดอกกลมกลวงเหมือนลูกแพร์ แกมรูปไข่กลับกว้าง ดอกย่อยแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกันเป็นสีชมพูอ่อน

ผล กลมแป้นขนาดเล็กติดเป็นกลุ่มแน่น 10-15 ผล สีเขียวสดเมื่อแก่มีสีน้ำตาลปนเขียว

8. ส่วนที่ใช้บริโภค ผลอ่อน

9. การขยายพันธุ์ เมล็ด ตอนกิ่ง

10. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เจริญเติบโตได้ดีในดินทุกชนิด อยู่ตามป่าโปร่งป่าดิบเขาทั่วไป

11. ฤดูกาลที่ใช้ประโยชน์ ตลอดปี

12. การปรุงอาหาร ผลอ่อน รับประทานเป็นผักจิ้มร่วมกับน้ำพริก

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

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร

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

2.2.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

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

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

1. พืชสมุนไพรที่จะนำมาสกัด ต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง เพราะพืชหลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันหรือมีชื่อพ้องกัน โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่หายากและขาดแคลน ต้องตรวจสอบอย่างรอบครอบ
2. การเลือกเก็บพืชสมุนไพรที่สมบูรณ์ มีอายุตามชนิดของพืช สามารถออกดอกออกผลที่มีจำนวนมากพอ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มากพอดังนี้
   2.1 รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโต หากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย
   2.2 เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่
   2.3 ใบและดอก เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน
   2.4 ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร
   2.5 ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือเมื่อสุกเต็มที่ ตามชนิดของพืชสมุนไพร
   2.6 เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก
3. เก็บตัวอย่างให้ถูกฤดูกาลของพืชแต่ละชนิด เช่น พวก ขิง ข่า กระชายดำ จะมีเหง้าอยู่ใต้ดิน

ในฤดูฝนเหง้าจะมีน้ำปริมาณมาก ทำให้มีปริมาณสารระเหยต่ำ ดังนั้นจึงควรเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้งจะได้ปริมาณสารระเหยที่มากกว่า

4. วิธีการเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสมต่อการนำไปแยกสกัดสาร พืชบางชนิดต้องสกัดสด หรือบางชนิดต้องสกัดแห้ง

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

6. ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าและผลิตภัณฑ์ ต้องระวัง สิ่งปลอมปน การใช้ชื่ออื่นมาอ้าง และชื่อพ้องกัน

7. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วต้องการทำตัวอย่างแห้ง ต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์

2.2.3 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. การเตรียมตัวอย่างแบบสด พืชสมุนไพรสดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง

2. การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง เป็นการป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

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

4. พืชสมุนไพรแห้งควรเก็บในที่แห้ง มืด เย็น และมีอากาศหมุนเวียนและหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน

2.2.4 การทำให้สมุนไพรตัวอย่างมีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชสมุนไพรต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชสมุนไพรที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

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

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

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

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

ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรนั้นมีข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์ การเลือกตัวทำละลาย การเลือกวิธีการสกัด วิธีการสกัด และการทำสารสกัดให้เข้มข้น

2.3.1 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) เอธิลอะซีเตด (ethyl acetate) ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (chloroform) ปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane) สารสกัดหยาบที่จะนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อาจละลายในตัวทำละลายได้ยาก ควรกรองสารละลายของสารสกัดหยาบเพื่อ แยกเป็นส่วนของตะกอนและส่วน ของสารละลาย (filtrate)หรือหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเป็นส่วนของตะกอนและส่วนลอย (supernatant) นอกจากนี้ยังสามารถสกัดแยกส่วนของสารสกัดหยาบด้วยการใช้ตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เข้ากัน เช่น น้ำ กับเอธิลอะซีเตด หรือคลอโรฟอร์มกับไดคลอโรมีเธนหรือเฮกเซน เป็นต้น โดยทำการสกัด ด้วยกรวยแยก จากนั้นจึงนำแต่ละ ส่วนมาแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดอื่น 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 ด้วยตัวทำละลาย

ผสมที่แยกออกเป็นสองชั้นได้ 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 วิธีกำจัดโปรตีนออกจากสารสกัดทางชีวภาพมักทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เข้ากับน้ำได้ เช่น เมธานอล เมื่อทำสารสกัดในชั้นเมธานอลให้แห้งสนิท (ปราศจากน้ำ) แล้ว จึงจะสกัดสารสกัดที่ได้นั้นซ้ำอีกครั้ง ด้วยเมธานอลเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีโปรตีนติดมาด้วย เพราะโปรตีนจะละลายมากับน้ำในระหว่างกระบวนการสกัด นอกจากนี้ ยังสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้ด้วยการกรองผ่าน ultrafiltration membrane โดยใช้แรงดันสุญญากาศหรือแรงหมุนเหวี่ยง 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 คุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกันด้วย จึงเป็นเหตุให้มี optical activity ในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ (plane polarized light) ได้แตกต่างกัน 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 จากนั้นจึง

แยกต่อไปด้วย conventional reversed-phase chromatography หรือคอลัมน์ที่บรรจุ immobilized chiral stationary phase (CSP)

2.3.2 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

2.3.3 วิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 85-89) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. มาเซอเรชัน

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในตัวทำละลายที่เหมาะสม จะทำเป็นเวลานาน 7 วัน หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างที่หมักผงสมุนไพรอยู่นั้นควรเขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกาก (marc) ออกจากตัวทำละลาย วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายน้อย และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะสมกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย เมื่อสารในสุมนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจนสมบูรณ์

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

2. เพอร์โคเลชัน

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

ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงปล่อยตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วที่พอเหมาะ พร้อมกับเติมตัวทำละลายใหม่ลงไปเรื่อยๆ อย่าให้แห้งเก็บเพอร์โคเลตจนการสกัดสมบูรณ์โดยการตรวจสอบจากเพอร์โคเลตส่วนสุดท้าย นำเพอร์โคเลตที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

วิธีเพอร์โคเลชันจัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารจะใช้เพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายตัว และให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าหากัน

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง

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

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลืองแต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน 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 และมีกลิ่นผิด

ไปจากธรรมชาติได้ จึงนำวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ต้นทุนการผลิตสูงกว่าวิธีการกลั่น

2.3.4 การเลือกวิธีการสกัด

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

1. ธรรมชาติของสมุนไพร โดยพิจารณาดังนี้

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

1.2 ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในตัวทำละลาย ถ้าละลายได้ง่ายใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้ยากใช้วิธีเพอร์เลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

1.3 ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด

หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีง่ายๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. ความต้องการการสกัด

หากต้องการสารสกัดเจือจาง ควรใช้ใช้วิธีมาเซอเรชัน แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

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

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การระเหย

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

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ

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

3. การทำให้แห้ง

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

4. อัลตราฟิลเทรชั่น

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

2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

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

สารที่พบในพืชประกอบด้วย สารปฐมภูมิ (Primary Constituents) และสารทุติยภูมิ (Secondary Constituents) สารปฐมภูมิประกอบด้วยแป้ง โปรตีน ไขมัน เซลลูโลส ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารที่พืชสร้างจาก Intermedial basic metabolism มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ มีโครงสร้างง่ายๆไม่ซับซ้อน 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 บางชนิดนำมาใช้ในการเตรียมยาจำพวกอิมัลชั่นในทางเภสัชกรรม เช่น กัมอะเคเชีย (gum acacia) และกัมทรากาคานท์ (gum tragacanth)

9. สารอื่นๆ

ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เอ็นไซม์ วิตามิน เรซิน และบาลซัม

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

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

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหล่านี้ไม่จำเพาะเจาะจง และการให้ผลบวกก็เป็นเพียงการบอกถึงประเภทของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางชนิดเท่านั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสร้างคล้ายกันแต่เป็นสารต่างกลุ่มกันจะให้ผลบวกลวง ในอีกแง่หนึ่งการให้ผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเข้มข้นต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไม่พอต่อการตรวจสอบด้วยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี ดังนี้

2.5.1 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 ในทางตรงกันข้ามอัลคาลอยด์ไม่ทุกชนิดที่อาจพบได้ในสารสกัดจากพืชจะให้ผลบวกกับสารทดสอบเหล่านี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างทางเคมี

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

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

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 ฟอง

รูปหกเหลี่ยมจะคงอยู่นานกว่า 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 วิธีที่นิยมใช้กันมาก คือวิธีที่ใช้กระดาษพิเครท เนื่องจากสามารถตรวจหากรดไฮโดรไซยานิกได้แม้ว่ามีปริมาณน้อยขนาด 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

การตรวจหาไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ในพืชตัวอย่างควรทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกัน แต่ใช้ภาวะเงื่อนไขที่แตกต่างกัน เช่น หลอดทดลองหนึ่งมีการเติมเอนไซม์อิมัลซิน(emulsion) กับ (linamarase) ลงไป แต่อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องเติม เพื่อให้แน่ใจว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกจริง เนื่องจากพืชบางชนิดถึงแม้จะมีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบจริง แต่อาจขาดเอนไซม์เบตา-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) เป็นตัวดูดซับหรือมีเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบได้ (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) ถ้าหากเป็นไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ จะสังเกตเห็นจุดสีเหลืองปรากฏขึ้นบนพื้นสีแดง

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 จะเกิดปฏิกิริยากับแมกนีเซียมโดยมีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นช่วยละลายแมกนีเซียมและเร่งปฏิกิริยา 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-ไดเทอร์-บิวทิว-พารา-ครีซอลในเอทานอล (2,6-di-tert-butyl-p-cresol in ethanol) ใช้ตรวจสอบเพนตาไซคลิกไทรเทอร์พีนอยด์ (pentacyclic trirerpenoids) ให้สีม่วง หรือใช้น้ำยากรดคลอโรซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ไทรเทอร์พีนอยด์ให้สีแดง เป็นต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2.5.2 การตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 77-79) กล่าวไว้สรุปได้ดังนี้

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

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

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

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

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

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

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

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547 : 77-79

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

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

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

1. Solid phase extraction (SPE)

Solid phase extraction เป็นการแยกสารโดยให้สารที่สนใจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่สารที่ไม่สนใจหรือไม่ต้องการจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะสาร ที่สนใจให้ออกจากคอลัมน์ในภายหลัง โดยทั่วไปสารที่สนใจจะจับอยู่กับวัฏภาคคงที่ (Stationary phase)ซึ่งเป็นสารดูดซับ (adsorbent) ที่มีรูปร่างเป็นเม็ดเล็ก (bead) หรือเรซิน (rasin) ซึ่งอาจเป็น normal 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 ใช้ศึกษาความเหมือนกันของสารเนื่องจากสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันจะจับกับวัฏภาคคงที่ได้เหมือนกันและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนกันอีกด้วย จึงช่วยในการจัดสินใจว่าสารสกัดหยาบที่แยกด้วย SPEมาแล้วจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่เคยแยกได้หรือไม่ 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 สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของวัฏภาคคงที่ คือ normal phase TCL และ reverse phase TCL หากเป็น normal phase TCL สารที่มีขั้วต่ำจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วสูง ในขณะที่ reverse phase TCL สารที่มีขั้วสูงจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วต่ำ โดยทั่วไปนิยมทดลองแยกตัวอย่างด้วย TCL เพื่อหาค่า R_f ที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะทำการแยกจริงด้วย column chromatography (CC) ค่า R_f ที่ดีจะต้องเป็นค่าที่ไม่ทำให้สารที่สนใจติดค้างอยู่จุดเริ่มต้นหรือเคลื่อนที่ด้ำกลเกินไปจนใกล้หรือคิดตัก solvent front เมื่อหาสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เหมาะสมแล้วจึงนำตัวอย่างที่ต้องการแยกในปริมาณสูงขึ้นมาแยกในคอลัมน์ต่อไป อย่างไรก็ตามไม่สามารถนำสภาวะหรือสัดส่วนขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จาก TCL มาใช้กับ CC ได้โดยตรง เนื่องจากคอลัมน์เป็นการเคลื่อนที่แบบสองทิศทางและมีสมดุลเกิดขึ้นในคอลัมน์ แต่ TCL นั้นมีสมดุลระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตลอดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อต้องการนำสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ใน TLC ไปใช้ในการแยกสารด้วย CC จึงแนะนำให้ลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC ลงเล็กน้อย(ในกรณี

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

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

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

โดยทั่วไปแล้ววัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวมักเกิดพันธะเคมีกับตัวรองที่เฉื่อย (inert support) ได้เป็น bonded phase ซึ่งหมายถึงพันธะที่คงตัว เช่น พันธะระหว่าง silanol group (Si-OH) บน silica support กับ chlorosilane ซึ่งสารจำพวก silane มักเป็นสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain)ที่มีคาร์บอนมาเชื่อมต่อกันยาวประมาณ 1,2,6, 8 หรือ 18คาร์บอน ดังนั้น bonded phase chromatography หรือ modified partition chromatography 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) อย่างไรก็ตามหากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กำลังแยกอยู่นั้นมีขั้วต่ำและไม่ชอบน้ำ 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 โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนได้และจะถูกชะออกมาก่อนในขณะที่โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่สุดจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดเล็กที่สุดได้ ที่ว่างใน cross-linked polymer ทำหน้าที่เสมือนวัฏภาคคงที่ ซึ่งโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สุดจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดเล็กและไหลออกมาในทิศทางตรง ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างเม็ดเล็ก โมเลกุลที่มีขนาดรองลงมาจะมี diffusible volume มากกว่าทำให้ถูกชะออกมาได้หลายทิศทางและใช้เวลาในการชะออกมาจากคอลัมน์นานกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ โมเลกุลที่เล็กที่สุดสามารถแทรกเข้าไปในรูพรุนขนาดเล็กที่สุดได้และจะถูกชะออกมาทีหลังสุด size exclusion chromatography เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายมากและไม่ทำลายโครงสร้างทางเคมีของสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการแยกชีวโมเลกุลที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่าง กันมาก เช่น ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออกจากเมแทบอไลท์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ามาก 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) อย่างไรก็ตามไม่

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

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2546 : 56-65) กล่าวถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชกรรมและการใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษาสรุปได้ดังนี้

2.7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

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

2.7.2 Bio-assaying

1. หลักในการคัดเลือกวัสดุจากพืชสมุนไพร เช่น การสกัดสารและการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารก่อนจะศึกษาผลทางชีวภาพ การวางแนวทางการดำเนินงานตามเงื่อนงำจากการประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในยาสมุนไพรและความเชื่อตามขนบธรรมเนียม การตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีววิทยา ชีวเคมี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีและกายภาพ

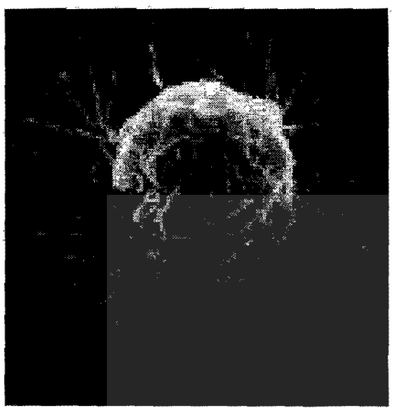
2. วิธีการคัดเลือกทางเภสัชวิทยา เป็นการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรีย เห็ดรา โปรโตซัว การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาโรคเช่น โรคมะเร็ง การอักเสบ วิธีการเบื้องต้นที่ใช้เช่น Brine shrimps, Antibacterial screening, Hippocratic screening เป็นต้น

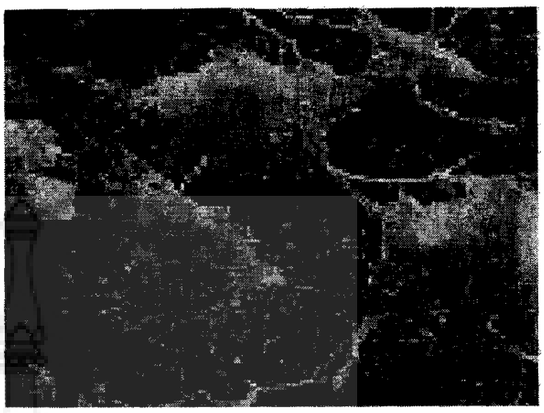
2.7.3 การสำรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนา

การศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความหลากหลายของผลทางชีวภาพและสูตรโครงสร้างของสรออกฤทธิ์และเป้าหมายด้านเภสัชกรรมในการบำบัดรักษาที่ชัดเจน โดยอาศัยการพัฒนาในหลายสาขาวิชา เช่น พันธุกรรม ชีวโมเลกุล วิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิคที่ทันสมัย

2.8 ลักษณะทั่วไปของมะเร็ง

2.8.1 ที่มาของคำว่ามะเร็ง





http://www.cccthai.org/index.php

คำว่ามะเร็ง หรือ Cancer มาจากคำศัพท์ในภาษากรีกว่า Carcinus หรือ Karkinos ที่แปลว่า ปู ซึ่งหมายถึง "กระบวนการไร้ระเบียบ ไม่มีอะไรมาขัดขวางการใช้อำนาจควบคุม" ที่ใช้คำนี้ อาจเป็นเพราะลักษณะการโตของก้อนมะเร็ง จะมีส่วนยื่นเข้าไปในเนื้อเยื่อปกติโดยรอบเหมือนขาปู (ฉะนั้นสัญลักษณ์ของมะเร็งหรือเครื่องหมายต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง จึงมักใช้รูปปูเป็นเครื่องหมาย) สำหรับแขนงวิชาที่ศึกษาเกี่ยวกับมะเร็ง เรียกว่า "Oncology" ซึ่งมาจาก Onkos ในภาษากรีก แปลว่า Tumor หรือ Mass

2.8.2 คำศัพท์พื้นฐานบางคำ

มีคำศัพท์พื้นฐานบางคำที่จำเป็นควรทราบ ดังนี้

- **ก้อนเนื้องอก (Tumor)** หมายถึงก้อนเนื้อ (Mass) หรือก้อนที่บวมขึ้นมา (Swelling) ซึ่งอาจจะเป็นก้อนเนื้อ ที่ไม่อันตราย (Benign) หรือ ก้อนเนื้อร้าย (malignant)

- **ก้อนเนื้องอกที่ไม่อันตราย (Benign)** หมายถึง ก้อนเนื้อที่ไม่มีแนวโน้มที่จะแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ

- **ก้อนเนื้อร้าย (Malignant)** หมายถึง ก้อนเนื้อ ซึ่งมีความสามารถในการกระจาย หรือแพร่กระจายปยังอวัยวะอื่นๆ

2.8.3 ความหมายของมะเร็ง

สำหรับความหมายของ 'มะเร็ง' มีการให้ความหมายดังนี้

1. มะเร็ง หมายถึง โรคชนิดหนึ่ง ซึ่งมีลักษณะของการแบ่งเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ และเซลล์เหล่านี้ มีความสามารถที่จะลุกลามเข้าไปในเนื้อเยื่ออื่นๆ โดยวิธีการใดวิธีการหนึ่งเช่น เจริญเติบโตโดยตรงเข้าไปในเนื้อเยื่อข้างเคียง (Invasion) หรือการอพยพเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังตำแหน่งที่ไกลๆ (Metastasis) การเจริญเติบโตแบบไม่เป็นระเบียบของเซลล์นี้ อาจมีสาเหตุที่เกิดขึ้นภายหลัง หรือเป็นกรรมพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์ของ DNA ภายในเซลล์ มีการทำลายข้อมูลของยีน ซึ่งเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของเซลล์ การเคลื่อนย้าย และการควบคุมความปกติของการแบ่งตัวของเซลล์

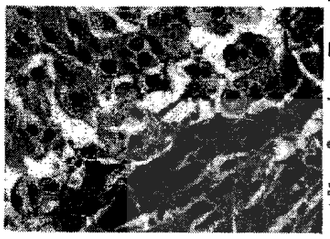
2. โดยปกติ อวัยวะและเนื้อเยื่อของร่างกาย จะประกอบด้วยส่วนที่มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมเล็กๆ เรียกว่า 'เซลล์' เซลล์ที่อยู่ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย อาจจะมีลักษณะและหน้าที่การทำงานแตกต่างกันออกไป แต่ส่วนใหญ่การสร้างหรือผลิตตัวเองขึ้นมาใหม่ จะเป็นในแบบเดียวกัน เซลล์จะเริ่มแก่และตายไปในที่สุด และเซลล์ตัวใหม่ ก็จะเริ่มผลิตขึ้นมาแทนที่ โดยปกติ การแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ จะมีการควบคุมและเป็นไปตามลำดับขั้นตอน แต่ถ้ากรรมวิธีนี้ไม่สามารถควบคุมได้ ด้วยเหตุผลใดก็ตาม เซลล์ก็จะทำการแบ่งตัวต่อไปตามลำดับจนพัฒนาขึ้นมาเป็นก้อนที่เรียกว่า Tumor ก้อนนี้ อาจเป็นก้อนที่ไม่อันตราย (Benign Tumor) หรืออาจเป็นก้อนเนื้อร้าย (Malignant Tumor) ก็ได้ และมะเร็ง ก็คือชื่อของก้อนเนื้อร้ายนี้เอง การเรียกชื่อของมะเร็ง ให้เรียกชื่อจากจุดที่เริ่มต้นเป็น เช่น เริ่มเป็นที่มะเร็งเต้านม แล้วแพร่กระจายไปที่ตับ แต่จะยังคงเรียกว่า มะเร็งเต้านมอยู่ ไม่ใช่มะเร็งตับ

2.8.4 ประเภทของมะเร็ง

มะเร็งมีมากมายกว่า 200 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

1. Carcinoma
2. Sarcoma
3. Lymphoma
4. Leukemias
5. Melanoma

1. มะเร็งกลุ่ม Carcinoma

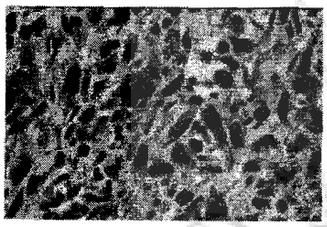


(ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วย จะอยู่ในประเภทนี้) หมายถึง มะเร็งซึ่งมาจากเซลล์เยื่อบุผิวของอวัยวะทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ซึ่งเซลล์เยื่อบุผิวของร่างกายมี 4 ชนิดใหญ่ได้แก่

- Glandular คือ กลุ่มของเซลล์เยื่อบุผิวที่สร้างสารคัดหลั่ง
- Squamous คือ กลุ่มของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีลักษณะแบนบางหลายเหลี่ยม
- Transitional คือ เซลล์เยื่อบุผิวที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ตามการขยายและหดตัวของอวัยวะนั้นๆ จะพบในอวัยวะ เช่น ท่อทางเดินปัสสาวะ
- Pseudostratified คือ เซลล์เยื่อบุผิวที่เรียงตัวหลายชั้นเทียม จะพบในอวัยวะ เช่น ปอด

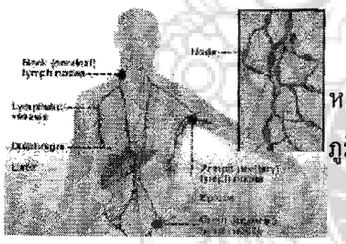
มะเร็งสามารถเกิดขึ้นได้จากเซลล์เยื่อบุอวัยวะชนิดต่างๆ เหล่านี้ ตัวอย่างเช่น มะเร็งเต้านม (Breast Carcinoma) ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์เยื่อบุของต่อมสร้างน้ำนม

2. กลุ่ม Sarcoma



หมายถึง มะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่ออ่อน(Soft Tissue) ของร่างกาย หรือเนื้อเยื่อเสริม (Supportive Tissue) ซึ่งได้แก่ ไขมัน กล้ามเนื้อ เส้นประสาท และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน นอกจากนี้ ยังรวมถึงกระดูกและกระดูกอ่อนด้วย

3. กลุ่ม Lymphoma

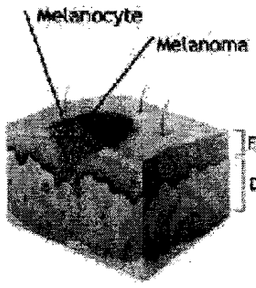


หมายถึง มะเร็งที่พัฒนามาจากต่อมน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อของระบบภูมิต้านทาน

4. กลุ่ม Leukemias

หมายถึง มะเร็งของระบบโลหิต เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่อยู่ในไขกระดูก (Bone Marrow)

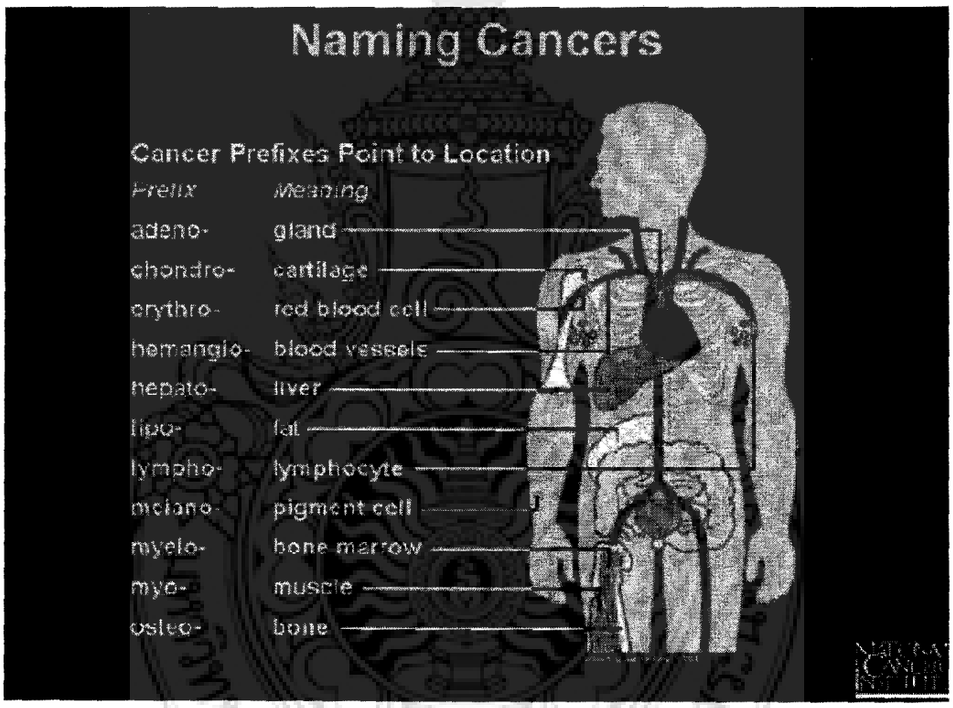
5. กลุ่ม Melanoma



หมายถึง มะเร็งที่มาจากเซลล์ผลิตเม็ดสี (Melanocytes) ซึ่งจะพบตามผิวหนัง ไฝ (Mole) คือการเจริญเติบโต ของเซลล์เม็ดสีประเภทไม่เป็นอันตราย

2.8.5 การตั้งชื่อมะเร็ง

นักวิทยาศาสตร์จะใช้ชื่อทางเทคนิคเพื่อแยกชนิดต่างๆ ของมะเร็งประเภท Carcinomas, Sarcomas, Lymphomas และ Leukemias โดยทั่วไปชื่อต่างๆ เหล่านี้ จะใช้คำนำหน้าตามชื่อของชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้อง เช่น นำหน้าด้วยคำว่า "Osteo" หมายถึง กระดูก ดังนั้นมะเร็งที่เกิดขึ้นที่กระดูกจะเรียกว่า Osteosarcoma ในทำนองเดียวกัน นำหน้าคำด้วย "Adeno" หมายถึง ต่อม ดังนั้นมะเร็งของเซลล์ต่อม จึงเรียกว่า Adeno carcinoma เช่น Breast Adenocarcinoma



http://www.cccthai.org/index.php

2.8.6 ความรุนแรงของมะเร็ง

ในทางพยาธิวิทยา จะแบ่งความรุนแรงของมะเร็งออกเป็น 4 ขั้น ตามการจำแนกลักษณะของเซลล์มะเร็ง (Differentiation) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กล่าวคือ ตั้งแต่ขั้นที่มีการจำแนกลักษณะของเซลล์ชัดเจน (Well Differentiation) ซึ่งถือว่ามีความรุนแรงน้อย จนกระทั่งถึงขั้นที่ 4 ที่เซลล์ไม่มีการจำแนกลักษณะเลย (Undifferentiation) ซึ่งมีความรุนแรงมาก

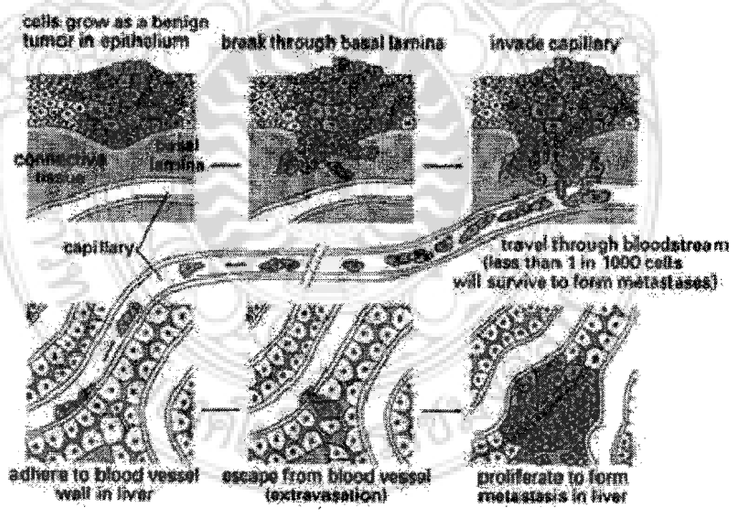
ในด้านการรักษา มีการแบ่งความรุนแรงของมะเร็งตามระยะของโรค โดยอาศัยการลุกลามของโรคออกไปเป็นระยะๆ ดังนี้

- ระยะที่ 1 มะเร็งยังจำกัดอยู่เฉพาะในที่เริ่มเป็น
- ระยะที่ 2 มะเร็งลุกลามถึงเนื้อเยื่อข้างเคียง หรือลุกลามทะลุผ่านอวัยวะที่เป็นโพรง
- ระยะที่ 3 มะเร็งลุกลามถึงต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง
- ระยะที่ 4 มะเร็งแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ

2.8.7 มะเร็งมีการแพร่กระจายอย่างไร

โดยทางกระแสเลือด เซลล์มะเร็งจะหลุดเข้ากระแสเลือด แล้วไปเจริญเติบโตในอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ กระดูก สมองเป็นต้น

โดยทางกระแสน้ำเหลือง เซลล์มะเร็งหลุดเข้าหลอดน้ำเหลืองแล้วไปเจริญเติบโต ในต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง ทำให้ต่อมน้ำเหลืองมีขนาดโตได้มาก ๆ จากต่อมน้ำเหลืองนี้เอง เซลล์มะเร็งอาจจะแพร่กระจาย เข้าสู่หลอดเลือดอีกทอดหนึ่งได้



โดยการฝังตัวของเซลล์มะเร็ง (Implantation) โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากตำแหน่งเดิม ไปเจริญที่ส่วนอื่น อาจจะเป็นการหลุดโดยธรรมชาติ หรือโดยมีการกระตุ้น เช่น จากการผ่าตัด เป็นต้น **โดยการไปจับหรือรวมตัวตามพื้นผิวของผนังเยื่อบุ (Transcoelomic)** โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากก้อนมะเร็ง ไปงอกตามพื้นผิวของเยื่อบุต่างๆ เหมือนกับต้นกาฝาก ที่แพร่จากกิ่งไม้กิ่งหนึ่งไปยังกิ่งติดๆ กัน เช่น ตามพื้นผิวของเยื่อบุช่องท้อง ช่องปอด เป็นต้น

http://www.cccthai.org/index.php

2.8.8 การแบ่งตัวของเซลล์

ยีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์

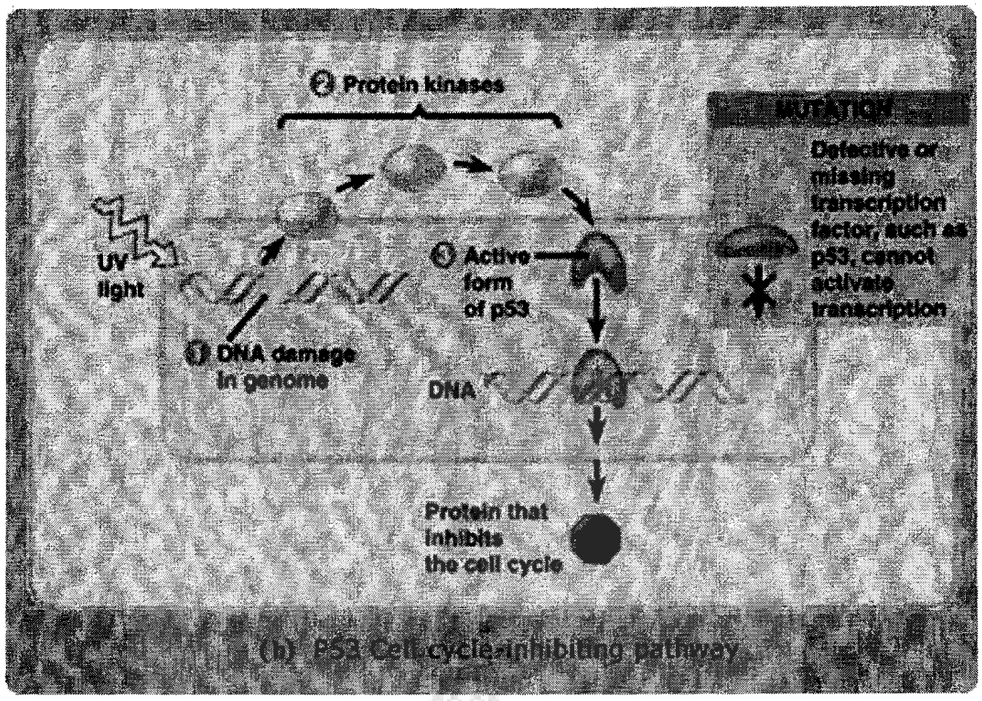
การที่เซลล์มะเร็ง แบ่งเซลล์ไปได้เรื่อยๆ โดยไม่สามารถควบคุมได้ แสดงว่า กลไกการควบคุมการแบ่งเซลล์มีความผิดปกติ โดยปกติยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- ยีนที่ทำงานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์
- ยีนที่ทำงานโดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์

1. ยีนที่ทำงานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์

อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Tumor Suppressor Gene ยีนกลุ่มนี้ มีลักษณะการทำงานที่สำคัญคือ เมื่อยีนทำงาน เซลล์จะหยุดการแบ่งตัว ยีนจะหยุดการแสดง ออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนกลุ่มนี้สูญเสียหน้าที่ ไม่สามารถแสดงออกได้ เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด เปรียบเสมือนการขับรถโดยไม่มีเบรกคอยห้ามล้อ จึงหยุดรถไม่ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร



http://www.cccthai.org/index.php

ตัวอย่างยีนชนิดนี้ ได้แก่ p53 gene โดยมีการทำงาน ดังนี้ เมื่อเซลล์ถูกแสงอัลตร้าไวโอเลต ซึ่งอาจทำให้ DNA เกิดความเสียหายได้ p53 gene จะทำงานโดยสร้าง Transcription Factor โดยหยุดเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซม DNA ที่แตกหักเสียหาย ก่อนที่จะปล่อยให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ซึ่งมีการสังเคราะห์ DNA ใหม่ ในกรณีที่ DNA แตกหักเสียหายจนไม่อาจซ่อมแซมให้กลับดังเดิมได้ p53 จะกำหนดให้เซลล์ตาย (Apoptosis) ในภาวะที่เซลล์ขาด p53 เซลล์ไม่สามารถหยุดการแบ่งเซลล์ ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซม DNA ที่แตกหักเสียหาย ก่อนที่จะปล่อยให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ซึ่งใช้ DNA ที่แตกหักเสียหายนั้นเป็นต้นแบบในการสร้าง DNA ใหม่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น ภาวะขาด p53 จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่ง ที่ทำให้เกิดเป็นมะเร็ง บางคนจึงเรียก p53 ว่า ผู้พิทักษ์พันธุกรรม (Guardian of the Genome)

2. ยีนที่ทำงานโดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์

อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Proto Oncogene ยีนกลุ่มนี้มีลักษณะการทำงานที่ตรงกันข้ามกับ Tumor Suppressor Gene กล่าวคือ ยีนส์จะแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนหยุดการแสดงออก เซลล์จะหยุดการแบ่งตัว ดังนั้น การเกิดการกลายพันธุ์ จนยีนแสดงออกมาตลอดเวลา เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด เปรียบเสมือนกับการขับรถโดยเหยียบคันเร่งตลอดเวลา ทำให้หยุด

รถลำบากยืนกลุ่มแรกๆ ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับมะเร็ง คือ Oncogene ยีนนี้ พบครั้งแรกในไวรัสก่อมะเร็ง ตัวอย่างเช่น Rous Sarcoma Virus (RSV) ซึ่งเป็น RNA Virus เมื่อเข้าไปในเซลล์แล้ว จะใช้เอนไซม์สร้าง DNA ขึ้นจาก DNA ของตนเอง DNA นี้ เรียกว่า Provirus สามารถแทรกตัวเข้ากับ DNA ของเซลล์ แล้วทำให้เซลล์เป็นเซลล์มะเร็งได้

2.8.9 มะเร็งเกิดขึ้นได้อย่างไร

อาจจะสรุปได้ว่า มีเหตุส่งเสริมที่สำคัญ 2 อย่างร่วมกัน อันจะทำให้เซลล์นั้นๆ ทำงานผิดปกติไป คือ

- เหตุส่งเสริม หรือเหตุที่ขึ้นอยู่กับภาวะภายในร่างกาย
- เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายนอกร่างกาย

เหตุส่งเสริมหรือที่ขึ้นอยู่กับภาวะภายในร่างกาย

1. ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของแต่ละบุคคล โดยปกติเซลล์มะเร็งสามารถสร้างสารต่างๆ ออกมาในรูปของโปรตีน และโพลีเปปไทด์ (Polypeptides) หลายๆ ชนิด ซึ่งจะพบได้ที่พื้นผิวหรือผนังของเซลล์มะเร็ง เรียกว่า Tumor Associated Antigen -TAA) หรือ Tumor Specific Transplantation Antigen - TSTA) ตามปกติ ร่างกายของคนเรา สามารถจะรับรู้แอนติเจนชนิดนี้ จึงสามารถสร้างภูมิคุ้มกัน หรือแอนติบอดีที่จะมาต้านแอนติเจนนี้ได้ จะโดยสาเหตุใดก็ตามที่ร่างกายไม่สามารถจะค้นพบ หรือไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต้านแอนติเจนนี้ได้ ก็จะเกิดเซลล์มะเร็งขึ้น

2. เชื้อชาติ มะเร็งบางชนิด จะพบมากในเฉพาะบางเชื้อชาติ เช่น มะเร็งโพรงหลังจมูก พบมากในชาวจีน เป็นต้น

3. เพศ มะเร็งบางชนิดพบมากในเพศชาย เช่น มะเร็งปอด มะเร็งตับ แต่มะเร็งบางชนิดพบมากในเพศหญิง เช่น มะเร็งเต้านม

4. อายุ มะเร็งบางชนิดพบมากในคนอายุน้อย เช่น มะเร็งของเนื้อเยื่อที่เรียกว่า Sarcoma ในขณะที่มะเร็งของเยื่อบุที่เรียกว่า Carcinoma จะพบมากในคนอายุมาก และมะเร็งบางชนิดจะพบเฉพาะในเด็กเท่านั้น เช่น มะเร็งของลูกตาชนิดเรติโนบลาสโตมา (Retinoblastoma)

5. กรรมพันธุ์ (Genetics)

6. ความผิดปกติต่างๆ เช่น ในกรณีที่เป็นไฝ หรือปานดำ มีโอกาสจะกลายเป็นมะเร็งผิวหนังเมลาโนบาชนิดร้าย (Malignant Melanoma)

เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายนอกร่างกาย

1. สารกายภาพต่างๆ (Physical Agents) ส่วนใหญ่เกิดจากการระคายเรื้อรัง เช่น ฟันปลอมที่ไม่กระชับ เวลาเคี้ยวอาหาร จะมีการเสียดสีกับเหงือกหรือเพดานปาก อาจจะทำให้เกิดมะเร็งของเหงือกหรือเพดานปากได้ การกระทบกระแทก การคลอดบุตรหลายๆ คน หรือการมีกระบังลมหย่อน

ในหญิงสูงอายุ ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกได้ง่าย รังสีต่างๆ เป็นต้น

2. สารเคมี (Chemical Agents)

3. ฮอร์โมน (Hormone)

4. เชื้อไวรัส มีไวรัสหลายชนิด เป็นสาเหตุทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ ไวรัสเหล่านี้เรียกว่า "ไวรัสที่ทำให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็ง" (Oncogenic Viruses, Tumour Viruses) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของกรดนิวคลีอิก คือ ไวรัสดีเอ็นเอ และไวรัสอาร์เอ็นเอ เมื่อไวรัสเข้าไปในเซลล์แล้ว ก็จะมีการเพิ่มจำนวน (Productive Infection) หรืออาจจะไม่เพิ่มจำนวนก็ได้ แต่จะสามารถทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงในรูปร่างไปได้ (Transformation) จากการที่ยีนหรือ DNAของไวรัส (Viralgnome หรือ Viral DNA) ไปแทนที่ DNA ของเซลล์
สำหรับในคน ไวรัสอาจจะเป็นสาเหตุ หรือเกี่ยวข้องกับมะเร็งบางชนิด เช่น Epstein-Barr Virus มีความสัมพันธ์กับมะเร็งโพรงหลังจมูก และมะเร็งของต่อม น้ำเหลืองเบอร์คิดต์ (Burkitt's Lymphoma) หรือ Herpes Simplex Virus ชนิดที่ 2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะเร็งปากมดลูก มะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิด เป็นต้น

5. สารพิษ (Toxin)

6. พยาธิบางชนิด เช่น พยาธิใบไม้ในตับ

7. ภาวะขาดอาหาร

2.8.10 กลไกการเกิดมะเร็ง

การเกิดโรคมะเร็งเป็นขบวนการหลายขั้นตอน มีกลไกที่สลับซับซ้อน ที่ทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตจากเซลล์มะเร็งเพียงเซลล์เดียว กลายเป็นก้อนมะเร็งขึ้นมา ต่อมา จะมีการลุกลามเฉพาะที่ และเกิดการแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นในที่สุด

ปัจจุบัน พอจะสรุปขบวนการของการเกิดมะเร็งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ

1. ขบวนการเริ่มต้นโดยมีตัวกระตุ้น (Initiator) เป็นตัวที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ทำความเสียหาย หรือทำลายยีน (Gene) ที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ตามปกติ เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ซึ่งใช้เวลาหลายปี

2. ตัวกระตุ้นเสริม (Promoter) เมื่อเซลล์ปกติที่เกิดการกลายพันธุ์ได้รับสิ่งกระตุ้นเสริมซ้ำแล้วซ้ำเล่า ทำให้เกิดการเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งขึ้น(ณิชาภัทร อิสระกุลฤทธา อ้างถึงใน http://www.cccthai.org/index.php)

2.9 ลักษณะทั่วไปของวัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรัง ทำให้มีการอักเสบในปอด ซึ่งในผู้ใหญ่มักจะพบส่วนใหญ่เป็นที่ปอด ในเด็กอาจเป็นที่อวัยวะอื่นร่วมด้วย เช่น ต่อมน้ำเหลือง เยื่อหุ้มสมอง กระดูก

2.9.1 สาเหตุ

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็น acid fast bacillus (AFB) ย้อมติดสีแดง ซึ่งจะมีอยู่ในปอดของผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษา

2.9.2 ประเภทของวัณโรค

Classification System for TB		
Class	**Type**	**Description**
0	No TB exposure Not infected	No history of exposure Negative reaction to tuberculin skin test
1	TB exposure No evidence of infection	History of exposure Negative reaction to tuberculin skin test
2	TB infection No disease	Positive reaction to tuberculin skin test Negative bacteriologic studies (if done) No clinical, bacteriologic, or radiographic evidence of TB
3	TB, clinically active	*M. tuberculosis* cultured (if done) Clinical, bacteriologic, or radiographic evidence of current disease
4	TB Not clinically active	History of episode(s) of TB **or** Abnormal but stable radiographic findings Positive reaction to the tuberculin skin test Negative bacteriologic studies (if done) **and** No clinical or radiographic evidence of current disease
5	TB suspect	Diagnosis pending TB disease should be ruled in or out within 3 months

2.9.3 ระบาดวิทยา

เด็กมักจะได้รับเชื้อจากผู้ใหญ่ที่เป็นวัณโรคระยะแพร่เชื้อ โดยเชื้อจะออกมากับการไอ จาม ทำให้เชื้อกระจายในอากาศ ในห้องที่ทึบอับแสง เชื้อวัณโรคอาจมีชีวิตอยู่ได้ถึง 1 สัปดาห์ ถ้าเสมหะที่มีเชื้อลงสู่พื้นที่ไม่มีแสงแดดส่อง เชื้ออาจอยู่ได้ในเสมหะแห้งได้นานถึง 6 เดือน เชื้อจะกระจายอยู่ในอากาศ และเข้าสู่ร่างกายทางการหายใจเอาเชื้อเข้าไป บางครั้งเชื้ออาจผ่านจากแม่ไปยังลูกในท้องโดยผ่านทางรกได้

ส่วนใหญ่โรคนี้จะเป็นกับเด็กที่มีฐานะยากจน อยู่ในชุมชนแออัด ผู้ที่ติดเชื้อแต่ไม่มีอาการ และตรวจไม่พบวัณโรคในปอดโดย X-rays จะทราบว่าติดเชื้อวัณโรคได้โดยการทดสอบทูเบอร์คิวลินจะให้ผลบวก ผู้ป่วยวัณโรคในผู้ใหญ่ส่วนใหญ่จะเคยติดเชื้อมาในระยะเด็ก ปัจจัยเสี่ยงที่จะทำให้ผู้ติดเชื้อเกิดมีอาการของโรคได้แก่ การติดเชื้อในวัยทารก และในวัยหนุ่มสาว การสัมผัสกับผู้ติดเชื้อ(ได้รับเชื้อเพิ่มขึ้น) ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะการติดเชื้อ HIV ผู้ติดยาเสพติด และโรคขาดอาหาร

2.9.4 ระยะฟักตัว

จากเมื่อแรกรับเชื้อจนถึงเมื่อให้ผลทดสอบทูเบอร์คิวลินเป็นบวกประมาณ 2-10 สัปดาห์ ระยะที่มีโอกาสเกิดอาการของโรคได้มากที่สุดคือ ในสองปีแรกหลังติดเชื้อโดยทั่วไปแล้วถ้าไม่ได้รับการรักษาเชื้อที่เข้าไปจะซ่อนตัวอยู่เงียบๆ โดยไม่ทำให้เกิดอาการของโรค ถ้าร่างกายอยู่ในสภาพที่แข็งแรงดี ถ้าสุขภาพทรุดโทรมลงหรือมีภาวะเสี่ยงต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น เชื้อที่สงบนิ่งอยู่ก็จะออกมาทำให้เกิดอาการของโรคได้ ในระยะห่างจากการได้รับเชื้อเข้าไปเป็นเดือนหรือเป็นปีก็ได้

2.9.5 อาการและอาการแสดง

ส่วนใหญ่ของเด็กที่ติดเชื้อ จะไม่มีอาการของโรคเมื่อทดสอบทูเบอร์คิวลินได้ผลบวก (ซึ่งเป็นการแสดงว่าเด็กติดเชื้อวัณโรค) การตรวจ X-rays ของปอดก็จะไม่พบผิดปกติในระยะแรก ถ้าเด็กมีสุขภาพและภาวะโภชนาการดี โรคจะยังไม่เกิดขึ้นทันทีเมื่อได้รับเชื้อ อาการที่จะพบได้เร็วที่สุดประมาณ 1-6 เดือนหลังติดเชื้อ ที่จะพบได้บ่อย คือ มีต่อมน้ำเหลืองโตที่ขั้วปอด ที่คอ และที่อื่นๆ แล้วจึงพบผิดปกติที่ปอดและอวัยวะอื่นๆ

2.9.6 วัณโรคปอด

เด็กเกือบทั้งหมดที่เป็นวัณโรคจะเริ่มต้นเป็นจุดที่ปอดก่อน เด็กจะมีไข้ต่ำๆ เบื่ออาหาร น้ำหนักตัวลดลง บางคนมีอาการไอเรื้อรัง บางคนมีไอซ้อนๆ กันคล้ายไอกรน เด็กโตบางคนอาจบ่นเจ็บหน้าอก และเหนื่อยหอบ ถ้าเป็นมากจะมีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด

2.9.7 วัณโรคเยื่อหุ้มสมอง

ในเด็กโตจะเริ่มด้วยอาการเป็นไข้ 1-2 สัปดาห์ ปวดศีรษะ อาเจียน คอแข็ง ซึมมากจนถึงไม่รู้สึกตัว บางรายอาจมีอาการชัก มีอัตราตายสูงและมีความพิการเหลืออยู่ถ้าได้รับการรักษาช้า

2.9.8วัณโรคของต่อมน้ำเหลือง

จะมีต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ รักแร้ ขาหนีบโต และบางรายจะโตมากจนมีแผลแตกออกมา มีหนองข้นไหลออกมา เป็นแผลเรื้อรัง อาจจะลุกลามมีต่อมน้ำเหลืองโตติดๆ กันหลายเม็ดถ้าไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคโดยเนิ่นๆ แผลจะไม่หาย

2.9.9การวินิจฉัยโรค

ในผู้ที่มีอาการเข้าได้กับวัณโรค การวินิจฉัยที่แน่นอนได้จากการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* จากน้ำล้างกระเพาะ (gastric wash) ในตอนเช้า ทั้งนี้เพราะเด็กมักจะกลืนเสมหะที่มีเชื้อวัณโรคลงในกระเพาะเวลากลางคืน หรือจากเสมหะ จากน้ำในเยื่อหุ้มปอด น้ำไขสันหลัง (ในรายเยื่อหุ้มสมองอักเสบ) เนื่องจากเชื้อวัณโรคเจริญเติบโตช้า ดังนั้นการเพาะเชื้อต้องใช้เวลานานถึง 10 สัปดาห์ ปัจจุบันมีวิธีที่อาจใช้เวลาเพียง 2-3 สัปดาห์ หรือสั้นกว่านี้ การทดสอบทูเบอร์คิวลิน เป็นวิธี skin test ที่ทำได้ง่ายที่สุดในการตรวจสภาวะของการติดเชื้อวัณโรคในผู้ที่ไม่มีอาการ การทดสอบที่ให้ผลบวกแสดงว่ามีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* โดยทั่วไปแล้วในเด็กส่วนใหญ่หลังจากได้รับเชื้อแล้ว 3-6 สัปดาห์ จึงจะให้ปฏิกิริยาทูเบอร์คิวลินเป็นบวก บางรายอาจนานถึง 3 เดือนได้ และปฏิกิริยาบวกนี้จะคงอยู่ตลอดไป ถึงแม้จะได้ยารักษาวัณโรคแล้วก็ตาม

2.9.10การรักษา

ปัจจุบันมียารักษาวัณโรคที่ได้ผลดีหลายชนิด การรักษาจะให้ยาร่วมกันอย่างน้อย 3 ชนิด เพื่อลดอัตราการดื้อยา และเพิ่มประสิทธิภาพของยา ยาที่ใช้ได้แก่ Streptomycin, Pyrazinamide, Rifampin, Isoniacid, Ethambutol การรักษาจะได้ผลดีถ้ามารับการรักษาเสียแต่ระยะเริ่มแรก และจะต้องกินยาอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 เดือน และจะต้องดูแลให้พักผ่อนและให้อาหารที่มีโปรตีนสูงและมีไวตามิน เพื่อช่วยเพิ่มความต้านทานโรค

2.9.11การแยกผู้ป่วย

ผู้ป่วยเด็กโดยทั่วไปไม่จำเป็นต้องแยก ถ้าได้รับยารักษาวัณโรคแล้ว เพราะเด็กมักไม่พบมีแผลในปอด และไม่ค่อยจะไอมาก โดยเฉพาะเด็กเล็กจะกลืนเสมหะลงในกระเพาะในเด็กโตหรือผู้ใหญ่ที่มีแผลในปอด (cavities) และตรวจแยกเชื้อ *M. tuberculosis* ได้จากเสมหะ ให้แยกประมาณ 1-2 เดือน จนแน่ใจว่ามีผลจากยา ซึ่งจะทราบได้จากการตรวจเพาะเชื้อจากเสมหะได้น้อยลง อาการไอน้อยลง ต้องไม่ให้ผู้ป่วยบ้วนเสมหะลงตามพื้น ต้องใช้น้ำยาฆ่าเชื้อทำลายเชื้อในเสมหะ

2.9.12 การป้องกัน

1. หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับผู้ป่วยที่กำลังมีอาการไอ และยังไม่ได้รับการรักษา

2. ในผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการ โดยเฉพาะในเด็กอายุต่ำกว่า 4 ปี ที่ตรวจได้ผลทูเบอร์คิวลินบวก แพทย์จะพิจารณาให้ยาป้องกัน Isoniacid นาน 2-3 เดือน

3. ให้วัคซีน BCG ป้องกัน ในประเทศที่มีโรควัณโรคชุกชุม องค์การอนามัยโลกแนะนำให้เริ่มให้ BCG วัคซีนตั้งแต่แรกเกิด วัคซีน BCG ถึงแม้จะมีประสิทธิผลแตกต่างกันจากการศึกษาในที่ต่างๆ ตั้งแต่ต่ำกว่าร้อยละ 50 ไปจนถึงร้อยละ 80 แต่ที่ได้ผลชัดเจน คือ ป้องกันวัณโรคชนิดรุนแรงแบบแพร่กระจาย และวัณโรคเยื่อหุ้มสมอง ในประเทศไทยให้วัคซีน BCG เมื่อแรกเกิด

2.9.13 การค้นหาผู้ป่วย

การค้นหาผู้ป่วย เนื่องจากเด็กมักจะได้รับเชื้อมาจากผู้ใหญ่ที่สัมผัสดังนั้น เมื่อพบผู้ป่วยวัณโรคจึงต้องสอบสวนค้นหาโรคในผู้ใกล้ชิดให้พบ และให้การรักษาเพื่อป้องกันการแพร่เชื้อไปยังผู้อื่น

2.9.14 การรักษา

ในปัจจุบัน โรควัณโรคเป็นโรคที่รักษาให้หายขาดได้ โดยใช้ระยะเวลาการรักษาสั้นที่สุด 6 เดือน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการปฏิบัติตัวของผู้ป่วยเองว่ากินยาครบตามที่แพทย์สั่งหรือไม่ ถ้ากินๆหยุดๆอาจทำให้มีโอกาสเสี่ยงต่อวัณโรคดื้อยา (MDR TB,XDR TB) ได้ จะทำให้ระยะเวลาการรักษายาวนานและการรักษายากมากยิ่งขึ้น

ยาวัณโรคในปัจจุบันหลักๆจะมีอยู่ 4 ชนิดคือ

1. Isoniazid
2. Rifampicin
3. pyrazinamide
4. Ethambutol

ยาที่กล่าวมาในข้างต้นนี้มีผลข้างเคียงของยาทุกตัว จึงต้องอยู่ในการควบคุมดูแลของแพทย์ ถ้าซื้อหรือหามารับประทานเองอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต

2.10 ลักษณะทั่วไปของมาลาเรีย

มาลาเรีย (Malaria) เป็นโรคหรือสภาวะติดเชื้อในคนที่มีสาเหตุมาจากโปรโตซัว Genus Plasmodium คำว่า malaria มาจากภาษาอิตาเลี่ยน mal+aria แปลว่า bad air ถ้าเรียกตามหลักการเรียกชื่อโรคนี้ทางวิทยาศาสตร์ ควรเรียกว่า Plasmodiosis แต่คำนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้กัน ส่วนในประเทศไทยก่อนที่จะรู้จักคำว่า มาลาเรีย มีชื่อที่ใช้เรียกโรคนี้ ได้แก่ ไข้ป่า ไข้จับสั่น ไข้ป่าง ไข้ร้อนเย็นและไข้ดอกสัก เชื้อมาลาเรียที่พบในปัจจุบันมีทั้งหมดกว่า 100 ชนิด ในจำนวนนี้มี 22 ชนิด ที่พบในสัตว์ชั้นสูง คือ ลิง และคน นอกนั้นเป็นเชื้อมาลาเรียของสัตว์จำพวกฟันแทะ ค้างคาว สัตว์ปีกและสัตว์เลื้อยคลาน

เชื้อมาลาเรียที่จัดว่าเป็นปรสิตของคนมีเพียง 4 ชนิด ได้แก่

Plasmodium malariae (Laveran, 1880), Quartan malaria

Plasmodium vivax (Grassi and Feletti, 1890), Benign tertian malaria

Plasmodium falciparum (Welch, 1897), Malignant tertian malaria

Plasmodium ovale (Stephens, 1922), Ovale tertian malaria

1. การกระจายทางภูมิศาสตร์

มาลาเรียพบได้ถึงละติจูดที่ 64 องศาเหนือถึง 32 องศาใต้ พบทั้งเขตร้อนและเขตอบอุ่น โดยทั่วไปพบความชุกของเชื้อสูงเรียงตามลำดับดังนี้ *P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale* มาลาเรียพบได้ในกว่า 100 ประเทศ แต่กว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วย อยู่ในแอฟริกา มีผู้เสียชีวิตประมาณปีละล้านคน

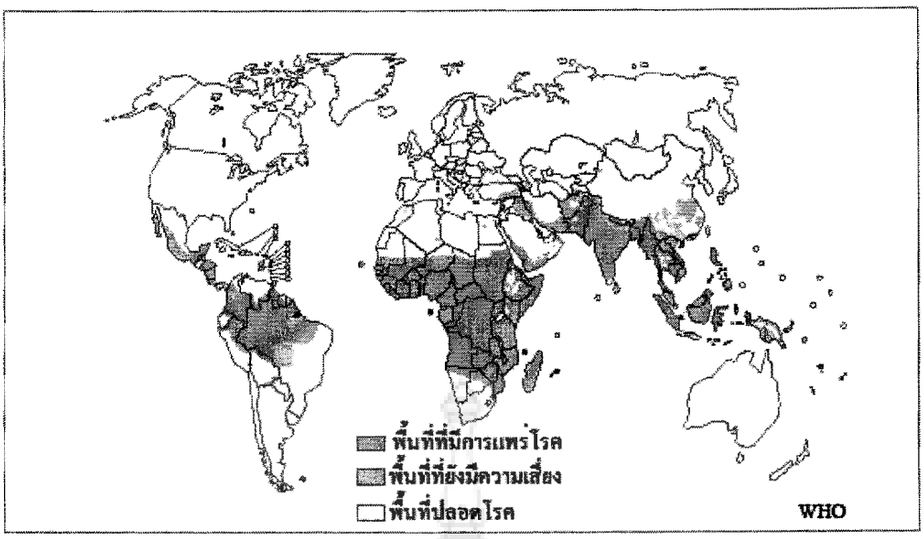
ในประเทศไทยพบโรคชุกชุมแถวชายแดนเนื่องจากสภาพพื้นที่เป็นป่าและมีการเดินทางข้ามไปมาของเพื่อนบ้านซึ่งติดเชื้อ

P. vivax และ *P. malariae* พบได้ทั่วโลกในเขตอบอุ่นและเขตร้อน

P. falciparum พบในเขตร้อนและกึ่งร้อน

ส่วน *P. ovale* พบในเขตร้อนของทวีปอัฟริกาและในเอเชีย

มาลาเรียทั้งสี่ชนิดนี้จะไม่พบในหมู่เกาะฮาวาย และหลายๆ เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์



2. กายรูปวิทยาและวงจรชีวิต

วงจรชีวิตของเชื้อมาลาเรียทั้งสี่ชนิดนี้เหมือนกัน โดยประกอบด้วยระยะใช้เพศ (sexual phase) หรือ sporogony ซึ่งเกิดขึ้นในยุงก้นปล่อง (*Anopheles*) และระยะไม่ใช้เพศ (asexual phase) หรือ schizogony ซึ่งเกิดขึ้นในคน

ในส่วนที่เกิดขึ้นในคนนั้นยังแบ่งเป็น 2 ระยะคือ

ระยะที่เกิดขึ้นในเซลล์ตับ (liver parenchymal cells หรือ hepatocytes) เรียกว่า exoerythrocytic schizogony หรือ tissue schizogony

และระยะที่เกิดขึ้นในเม็ดเลือดแดง เรียกว่า erythrocytic schizogony หรือ blood schizogony

<u>Asexual phase (Schizogony) ในคน</u>

(1) Exoerythrocytic schizogony

เมื่อยุงก้นปล่องที่มีเชื้อมาลาเรียระยะติดต่อที่เรียกว่า sporozoites กัดดูดเลือดคน sporozoites จะเข้าสู่คนโดยปะปนมากับน้ำลายของยุงเข้าสู่กระแสเลือด และหลังจากนั้นประมาณครึ่งชั่วโมง มันจะเข้าไปอยู่ในเซลล์ตับและมีการเจริญเติบโต แบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมากมาย เรียกระยะนี้ว่า schizont ต่อมาประมาณ 8-15 วัน schizont จะแก่และมี merozoites อยู่มากมาย schizont ที่แตกจะปล่อย merozoites เข้าสู่กระแสเลือดเจริญเติบโตต่อไปในเม็ดเลือดแดง

ใน *P. vivax* และ *P. ovale* sporozoites บางตัวจะเจริญอย่างช้า ๆ เรียกว่า hypnozoites ใช้เวลานานหลายเดือนกว่าจะได้ merozoites เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการไข้กลับ (relapses)

โดยปกติระยะเวลาในการเจริญของเชื้อมาลาเรียตั้งแต่ sporozoites เข้าเซลล์ตับจนกลายเป็น merozoites ขึ้นอยู่กับชนิดดังนี้

	P. vivax	*P. malariae*	*P. ovale*	*P. falciparum*
Duration of exoerythrocytic schizogony (days)	6-8	12-16	9	5.5-7
Number of merozoites	10,000	2,000	15,000	40,000

(2) Erythrocytic schizogony

เมื่อ merozoites เข้าไปในเม็ดเลือดแดงจะเจริญเติบโตและแบ่งตัวต่อไป สามารถเห็นได้จากการย้อมสี เช่น Giemsa และ Wright เป็นต้น

การเจริญของเชื้อในเม็ดเลือดแดงแบ่งออกเป็นระยะ trophozoite และ schizont

ระยะ trophozoite เป็นระยะที่กำลังเจริญเติบโต มีนิวเคลียสเดียว มี 2 ระยะคือ

- early trophozoite เป็นระยะที่ merozoite เพิ่งเข้าไปได้ใหม่ ๆ เห็นเป็นรูปร่างคล้ายวงแหวนมี chromatin (nucleus) ติดสีแดงเป็นจุด ไซโตพลาสมติดสีฟ้าหรือน้ำเงิน จึงมักเรียกระยะนี้ว่า "ring form"

- growing trophozoite เป็นระยะที่ต่อจาก ring form โดยไซโตพลาสมและนิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้น มีรูปร่างแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด คือ

P. vivax มีไซโตพลาสมยืดขยายออกไปมาก คล้ายตัวอมีบา จึงมักเรียกว่า amoeboid form ส่วน *P. ovale* ไซโตพลาสมมีการยืดขยายตัวออกไปไม่มากเท่า *P. vivax*

P. malariae มีไซโตพลาสมได้ 3 แบบคือ

- ไซโตพลาสมยืดขยายไม่มากคล้ายของ *P. ovale* มีรูปร่างไม่แน่นอน
- ไซโตพลาสมเป็นแถบยาว มักเรียกว่า band form
- ไซโตพลาสมเป็นวงโค้ง มักเรียกว่า compact form

P. falciparum มีการขยายของไซโตพลาสมแบบค่อนข้างกลม

ในระยะ growing trophozoite นี้ เม็ดเลือดแดงที่เชื้ออาศัยอยู่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีจุด (stippling) สีชมพูขึ้นโดยทั่วไปมีชื่อเรียกดังนี้

ใน *P. vivax* และ *P. ovale* เรียกว่า Schuffner's dots

ใน *P. malariae* เรียกว่า Ziemann's dots

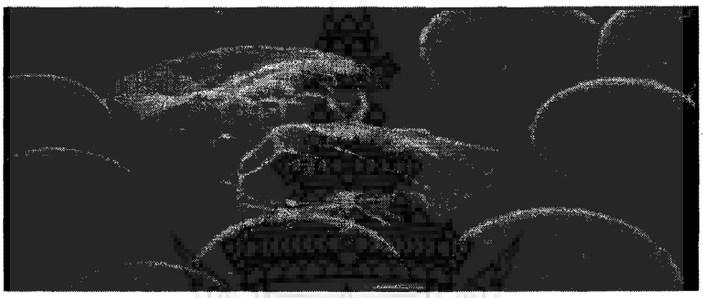
ใน *P. falciparum* เรียกว่า Maurer's dots

อย่างไรก็ตามในฟิล์มเลือดย้อมสีนั้น Schuffner's dots จะเห็นได้ง่ายและเด่นชัดกว่าอย่างอื่น Ziemann's dots มักจะมองไม่เห็นจากการย้อมสีตามปกติ ส่วน Maurer's dots มักเริ่มเห็นในระยะ growing trophozoite

นอกจากนี้ในไซโตพลาสมของเชื้อมาลาเรียจะเริ่มมีเม็ดสีน้ำตาลหรือดำ ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อมาลาเรียกินฮีโมโกลบินแล้วเปลี่ยนเป็น hemozoin เรียกเม็ดสีเหล่านี้ว่า malarial pigment

ระยะ schizont เป็นระยะที่เชื้อมีการแบ่งนิวเคลียสแล้ว เริ่มจากมี 2 ก้อนขึ้นไป นิวเคลียสจะแบ่งตัวไปเรื่อยๆ แต่ยังไม่มีการแบ่งไซโตพลาสม เรียกระยะนี้ว่า immature schizont ต่อเมื่อมีการแบ่งนิวเคลียสครบแล้ว ไซโตพลาสมจึงแยกไปรวมกับนิวเคลียสแต่ละอันกลายเป็น merozoites อยู่ในเม็ดเลือดแดง เรียกระยะนี้ว่า mature schizont จำนวน merozoites มีมากน้อยแตกต่างกันแล้วแต่ชนิด ดังนี้

	จำนวน merozoites
P. vivax	12-24 (ส่วนใหญ่ 16)
P. ovale	4-12 (ส่วนใหญ่ 8)
P. malariae	6-12 (ส่วนใหญ่ 8)
P. falciparum	12-30



รูป เม็ดเลือดแดงที่ถูกเชื้อมาลาเรียทำลาย

ผนังเม็ดเลือดแดงที่มี mature schizont แก่เต็มที่จะแตกและปล่อย merozoites ออกมาเข้าสู่เม็ดเลือดแดงใหม่เป็นการเริ่มวงจร erythrocytic schizogony ซ้ำอีก

ระยะเวลาตั้งแต่ merozoites เข้าไปในเม็ดเลือดแดงแล้วเจริญจนได้ merozoites ใหม่ ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ใน *P. vivax*, *P. ovale* และ *P. falciparum* ส่วน *P. malariae* ใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดอาการไข้มาลาเรีย

merozoites ที่เกิดจาก erythrocytic schizogony บางตัว หลังจากที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดงแล้วแทนที่จะเจริญต่อไปแบบ schizogony กลับเจริญไปเป็นแบบ gametocytogony ได้เซลล์เพศ หรือ gametocyte ซึ่งมี 2 ประเภทคือเซลล์เพศผู้ (male gametocyte or microgametocyte) และเซลล์เพศเมีย (female gametocyte or macrogametocyte) เซลล์เพศจะปรากฏให้เห็นหลังจากที่คนไข้มีอาการแล้ว ประมาณ 4 วัน ใน *P. vivax* และ 8 วัน ใน *P. falciparum*

ลักษณะรูปร่างของเซลล์เพศ *P. vivax*, *P. ovale* และ *P. malariae* จะกลม ส่วนของ *P. falciparum* เมื่อแก่เต็มที่จะมีรูปร่างคล้ายกล้วยหอมหรือพระจันทร์เสี้ยว

Sexual phase (sporogony) ในยุงก้นปล่อง

เมื่อยุงกัดดูดเลือดคนที่มี gametocytes เข้าไปในกระเพาะ (mid gut) ภายใน 5-30 นาที microgametocytes จะมีการแบ่งนิวเคลียสและไซโตพลาสม โดยวิธีที่เรียกว่า exflagellation ได้เซลล์คล้ายสเปิร์ม ประมาณ 6-8 ตัว แต่ละตัวเรียกว่า microgamete ส่วน macrogametocytes จะกลายเป็น macrogamete โดยมีรูปร่างไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก และไม่มีการแบ่งตัว หลังจากผสมพันธุ์กันแล้วได้เซลล์ zygote ต่อจากนั้น 12-24 ชั่วโมง จะกลายเป็น ookinete ซึ่งเคลื่อนไหวได้ช้า ๆ และไชผ่านเซลล์หรือช่องว่างระหว่างเซลล์บุผนังกระเพาะยุง เข้าไปอยู่ระหว่างผนังด้านนอกและด้านในของกระเพาะ เจริญต่อไปเป็นถุงที่เรียกว่า oocyst ซึ่งจะเริ่มเห็นได้ในวันที่ 3 และจะค่อยๆ โตขึ้น จนในที่สุดเกิดมีเซลล์รูปกระสวยเรียกว่า sporozoites อยู่ภายในหลายพันตัว oocyst เมื่อแก่เต็มที่ถุงจะแตกและปล่อย sporozoites เข้าสู่ haemocoel ในที่สุดจะเข้าไปอยู่ในต่อมน้ำลายของยุง พร้อมที่จะถ่ายทอดสู่คนต่อไป

ระยะเวลาที่ยุงเริ่มรับ gametocytes จนกระทั่งมี sporozoites อยู่ในต่อมน้ำลาย กินเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ที่ 25°C แต่ถ้าอุณหภูมิเย็นลง วงจรชีวิต sporogony จะยืดยาวออกไป ถ้าต่ำกว่า 20°C จะไม่เกิด sporogony ใน *P. falciparum* และถ้าต่ำกว่า 16°C จะไม่เกิด sporogony ในมาลาเรียทุกชนิด

3. Course of infection

ระยะเวลาตั้งแต่คนได้รับเชื้อมาลาเรียระยะ sporozoites จากยุงก้นปล่อง ไปจนถึงการเริ่มมีเชื้อปรากฏในกระแสเลือด เรียกว่า prepatent period ซึ่งจะสั้นกว่าระยะ incubation period หรือระยะเวลาที่ได้รับเชื้อจนเริ่มมีอาการ ช่วงระยะเวลาทั้งสองของเชื้อมาลาเรียแต่ละชนิดเป็นดังนี้

	prepatent period (days)	incubation period (days)
P. vivax	11-13	13(12-17) หรืออาจจะเป็นเดือน
P. ovale	10-14	17(16-18) หรือมากกว่า
P. falciparum	9-16	12(9-14)
P. malariae	15-16	28(18-40) หรือมากกว่า

นอกจากการติดเชื้อมาลาเรียโดยถูกยุงก้นปล่องกัดแล้ว คนยังสามารถติดเชื้อมาลาเรียได้จากเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือด เช่น การเติมเลือด ในกรณีเช่นนี้ค่าทั้งสองจะสั้นลงขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ได้รับ

เชื้อมาลาเรียที่อยู่ในเลือดจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ ส่วนใหญ่แล้ว *P. vivax, P. malariae* และ *P. ovale* มักก่อให้เกิดอาการที่ไม่รุนแรงนัก ส่วน *P. falciparum* ประมาณ 50% ของผู้ป่วยจะเสียชีวิตถ้าไม่ได้รับการรักษา เนื่องจากเชื้อทำให้เกิดพยาธิสภาพรุนแรงมาก เมื่อร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นปริมาณเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือดจะลดลงและหายเป็นปกติขึ้นอยู่กับชนิดของมาลาเรีย

	parasitaemia (per microliter)	**duration of infection**
	average/maximum	**average/maximum (years)**
P. vivax	20,000/50,000	2/8
P. ovale	9,000/30,000	1/5
P. malariae	6,000/20,000	4/53
P. falciparum	20,000-50,000/2,000,000	1/4

คนที่เป็นไข้มาลาเรียระยะเริ่มแรกอาจมีอาการคล้ายกับคนเป็นไข้หวัด เช่น ปวดหัว คลื่นไส้ อย่างไรก็ตามการเป็นไข้มาลาเรียแตกต่างจากไข้ทั่ว ๆ ไป โดยมีรูปแบบเฉพาะที่เรียกว่า malaria paroxysm มี 3 ระยะตามลำดับคือ

1. ระยะหนาวสั่น (the cold stage) ผู้ป่วยจะรู้สึกหนาวสั่น อาจถึงกับฟันกระทบกัน อาจมีปวดศีรษะ คลื่นไส้อาเจียน ระยะนี้กินเวลาประมาณ 5-60 นาที

2. ระยะมีไข้ (the hot stage) ผู้ป่วยเริ่มรู้สึกร้อน ทิ้งผ้าห่ม หน้าตาแดง ผิวหนังแห้ง ชีพจรเร็วและแรง หายใจเร็ว ปวดศีรษะรุนแรงขึ้น คอแห้ง คลื่นไส้ บางที่อาเจียน อุณหภูมิสูงถึง 105 ^{o}F ระยะนี้กินเวลาประมาณ 2-6 ชั่วโมง

3. ระยะเหงื่อออก (the sweating stage) ไข้ลดลง มีเหงื่อออกจนเปียกชุ่ม ผู้ป่วยรู้สึกสบายขึ้นและอ่อนเพลียมาก ระยะนี้กินเวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง

หลังพ้นระยะเหงื่อออกแล้ว ผู้ป่วยจะกลับหายเป็นปกติเหมือนไม่มีอะไรเกิดขึ้น สามารถทำงานได้ตามเดิม ซึ่งระยะที่ไม่มีไข้นี้เป็นระยะที่เชื้อในเม็ดเลือดแดงกำลังเจริญเติบโตในระยะ trophozoite ไปจนถึงระยะก่อนที่ mature schizont จะแตก และเมื่อมีการแตกของเม็ดเลือด ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการในระยะหนาวสั่นใหม่ เป็นวงจรอยู่อย่างนี้เรื่อยๆ *P. vivax* และ *P. ovale* มักทำให้เกิดไข้ทุกๆ 2 วัน *P. malariae* เกิดทุกๆ 3 วัน ส่วน *P. falciparum* อาจเกิดทุกวันหรือทุก 2 วัน อย่างไรก็ตามในระยะแรกๆ ของการติดเชื้อ เวลาที่เกิดมีไข้มักไม่แน่นอน เนื่องจากมีเชื้อที่ออกมาจากตับเข้าสู่กระแสเลือดอยู่เรื่อย ๆ

ต่อมาเมื่อมีการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้น อาการของไข้มาลาเรียจะค่อยๆ ลดลง และหายไปเองได้ ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้เรื้อรัง มักมีภาวะโลหิตจาง ม้ามโตหรือบางทีตับโตด้วย

Pernicious malaria หรือไข้มาลาเรียชนิดรุนแรง

นอกจากอาการดังกล่าวข้างต้นแล้ว เชื้อมาลาเรียอาจทำให้เกิดอาการรุนแรงถึงเสียชีวิตได้ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *P. falciparum* ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ ในระยะ growing trophozoite ไปจนถึงระยะ mature schizont และ young gametocyte ทำให้ผนังเม็ดเลือดแดงที่มันอาศัยอยู่ มีการเปลี่ยนแปลงเป็นปุ่มเล็ก ๆ ซึ่งปุ่มนี้สามารถยึดติดกับผนังหลอดเลือดเล็กๆ จนเกิดการอุดตัน ทำให้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้นขาดออกซิเจน อีกประการหนึ่ง การจับกลุ่มของเชื้อที่ติดตามผนังหลอดเลือดนั้น เมื่อมีการทำลายเชื้อด้วยระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้มีการทำลายผนังหลอดเลือดด้วย จึงเกิดมีเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ

อาการของไข้มาลาเรียชนิดรุนแรงอาจแบ่งได้เป็น

1. อาการทางระบบประสาท ที่สำคัญคือ มาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) ซึ่งจะมีอาการปวดศีรษะอย่างรุนแรง คลื่นไส้อาเจียรและอาจมีอาการเพ้อคลั่ง ชัก หรือหมดสติและอาจเสียชีวิต

2. มาลาเรียทางเดินอาหาร บางทีเรียกว่า Algid malaria ซึ่งมีอาการตัวเย็น ท้องเดิน เป็นตะคริว หรืออาจมีอาการช็อคด้วย

3. มาลาเรียของอวัยวะอื่นๆ เช่น ปอดอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบและไตอักเสบ เป็นต้น

ไข้กลับ (Relapse)

หมายถึงการกลับเป็นไข้มาลาเรียขึ้นมาอีก หลังจากได้หายไปโดยไม่มีอาการแล้ว ทั้งๆ ที่ไม่ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายใหม่เลย แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. Recrudescence หรือ short term relapse เป็นไข้กลับที่เกิดจากเชื้อมาลาเรียที่ยังคงมีอยู่ในกระแสเลือด แต่มีจำนวนน้อยมากจนตรวจไม่พบในฟิล์มเลือด และไม่มีอาการ ทั้งนี้เนื่องมาจากการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เชื้อมีปริมาณลดลง ต่อมาเมื่อภูมิต้านทานลดลงเชื้อก็กลับเจริญขึ้นในระยะเวลาสั้นไม่กี่สัปดาห์ หรือเกิดจากได้รับยารักษาแต่ไม่สามารถรักษาให้หายขาด เนื่องจากเชื้อดื้อยาหรือได้รับยาไม่ครบ

2. Recurrent หรือ True relapse หรือ long term relapse เป็นไข้กลับที่เกิดจากเชื้อที่ยังคงมีอยู่ในตับ หรือ hypnozoite โดยใช้เวลานานเป็นเดือน ๆ กว่าจะมีไข้อีก

ไข้กลับแบบแรกนั้น สามารถเกิดได้กับเชื้อมาลาเรียทั้ง 4 ชนิด ส่วนไข้กลับแบบหลังจะเกิดขึ้นเฉพาะกับ *P. vivax* และ *P. ovale*

ไข้น้ำดำ (black water fever)

เป็นอาการของคนที่ได้รับเชื้อ *P. falciparum* ซ้ำหลายๆ ครั้งและได้รับการรักษาด้วยควินินไม่พอเพียง ต่อมาเมื่อได้รับการรักษาด้วยควินินอีกครั้ง ทำให้เกิดอาการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นปฏิกิริยาภูมิแพ้ (autoimmune reaction) ทำให้ปัสสาวะมีสีดำ ปัจจุบันอาการของโรคนี้ไม่พบบ่อยนัก

4. การพิเคราะห์โรค

ประวัติอาการและอาการแสดง รวมทั้งประวัติการเข้าไปในท้องถิ่นที่มีไข้มาลาเรียชุกชุม เป็นการช่วยในการพิเคราะห์โรคทางคลินิกได้วิธีหนึ่ง แต่การพิเคราะห์โรคที่แน่นอนต้องอาศัยการตรวจเลือด

5. การรักษา (chemotherapy)

การรักษาไข้มาลาเรียต้องรักษาอาการทั่วไปควบคู่ไปกับการใช้ยาต่อต้านเชื้อมาลาเรียด้วย การใช้ยาต่อต้านมาลาเรีย (antimalarial drugs) มีวัตถุประสงค์คือ

1. ใช้ป้องกัน (prophylactic use) เช่น ก่อนเข้าไปอยู่ในท้องที่ที่มีมาลาเรียชุกชุม โดยนำยาที่ใช้รักษามาลาเรียมากินอย่างต่อเนื่องแต่ปริมาณจะต่ำกว่าที่ใช้รักษาให้หายขาด เช่น Mefloquine, Chloroquine, Pyrimethamine, Proguanil และ Doxycycline โดยยาจะออกฤทธิ์อย่างช้าๆ ทำลายระยะ tissue schizont ที่อยู่ในตับ หรือที่ออกมาในกระแสเลือด ขึ้นอยู่กับชนิดของยา อย่างไรก็ตามปัจจุบันหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยเกิดปัญหาเชื้อ *P. falciparum* ดื้อต่อยาหลายชนิดทำให้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร และไม่แนะนำให้ใช้

2. ใช้รักษา (therapeutic use)

2.1 เพื่อทำลายเชื้อระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง ยาที่ใช้เรียกว่า blood schizontocides ชนิดของยาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของมาลาเรียและประเทศ สำหรับประเทศไทยปัจจุบันยาที่ใช้รักษา *P. falciparum* โดยทั่วไป คือ Mefloquine ในรายที่เป็นมาลาเรียขึ้นสมองมักใช้ Quinine (ทางสายเลือด) ควบคู่ไปกับ tetracycline นอกจากนี้ยังเริ่มใช้ Artesunate และ Artemether สำหรับยาที่ใช้รักษา *P. vivax*, *P. ovale*, และ *P. malariae* คือ Chloroquine

2.2 เพื่อทำลายเชื้อระยะที่อยู่ในตับ ป้องกันการเกิดไข้กลับ ของ *P. vivax* และ *P. ovale* ยาที่ใช้ เรียกว่า tissue schizontocides ได้แก่ Primaquine

3. ใช้ป้องกันการแพร่เชื้อ (prevent transmission) ยาจะไปทำลายเชื้อระยะ gametocyte ของ *P. falciparum* ในกระแสเลือด ได้แก่ Primaquine

6. ภูมิคุ้มกัน (malaria immunity)

ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อมาลาเรีย แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. Natural immunity เป็นภูมิคุ้มกันที่มีโดยธรรมชาติ

เช่น - เชื้อมาลาเรียของพวกสัตว์ปีกหรือฟันแทะ จะไม่ติดคน

- คนผิวดำที่ไม่มี Duffy blood group จะไม่ติดเชื้อ *P. vivax*

- คนที่มี HbS จะไม่ติด *P. falciparum*

- คนที่เม็ดเลือดแดงขาดแคลนเอนไซม์ G-6-PD มักไม่ติด *P. falciparum* หรือถ้าติดก็มักไม่มีอาการรุนแรง

2. Acquired immunity แบ่งได้เป็น

- Active immunity ได้แก่คนที่เคยได้รับเชื้อมาแล้ว เมื่อได้รับเชื้ออีกมักไม่มีอาการรุนแรง
- Passive immunity ได้แก่ ลูกที่มีแม่เป็นมาลาเรียจะได้รับการถ่ายทอดภูมิคุ้มกันบางส่วนจากแม่ พอคุ้มกันได้ประมาณ 1 ปี

7. การสร้างภูมิคุ้มกันโดยการให้วัคซีน (immunization against malaria)

ปัจจุบันยังอยู่ในขั้นทดลอง อย่างไรก็ตามมีแนวทางในการผลิตวัคซีนดังนี้

1. Sporozoite vaccine เป็นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อ sporozoite ก่อนที่จะเข้าไปในเซลล์ของตับ

2.Merozoite vaccine เป็นการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อระยะที่อยู่ในเลือด โดยเฉพาะทำลาย merozoites ก่อนที่จะเข้าเม็ดเลือดแดง

3. Anti-gamete antibodies (Transmission blocking vaccine) เป็นการสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันไม่ให้เชื้อระยะ gametocyte เจริญเป็น gamete ในยุง

8. วิทยาการระบาดของไข้มาลาเรียในประเทศไทย

เชื้อมาลาเรียในประเทศไทยมีอยู่ทั้ง 4 ชนิดดังที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยมีอุบัติการณ์มากน้อยตามลำดับคือ *P. falciparum* (ประมาณ 50-60 %), *P. vivax* (ประมาณ 50 %), *P. malariae* (น้อยกว่า 1 %) ส่วน *P. ovale* นั้นไม่มีตัวเลขที่แน่นอนแต่พบน้อยมาก ในปีหนึ่ง ๆ มีผู้ป่วยทั่วประเทศนับแสนคน แหล่งที่มีมาลาเรียชุกชุมได้แก่ ตามป่าเขา โดยเฉพาะบริเวณชายแดนด้านพม่า และกัมพูชา ผู้ป่วยมีตลอดทั้งปีแต่จะมีมากในช่วงต้นและปลายฤดูฝน ยุงที่เป็นพาหะสำคัญได้แก่ *Anopheles minimus* และ *An. dirus* ซึ่งเป็นพาหะในป่าเขา ยุงที่เป็นพาหะรองได้แก่ *An.*

maculatus group, *An. aconitus, An. pseudowillmori* และ *An. sundaicus* ชนิดหลังนี้เป็นพาหะตามชายทะเลและเกาะเนื่องจากเพาะพันธุ์ในน้ำกร่อย

9. การป้องกันและควบคุมโรคไข้มาลาเรีย

ปัจจุบันโรคมาลาเรียยังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศในเขตร้อนและกึ่งร้อนที่ยังไม่มีวิธีการที่สามารถกำจัดโรคนี้ได้อย่างจริงจัง เท่าที่ทำได้อยู่ในขณะนี้เป็นเพียงการควบคุมไม่ให้โรคนี้ระบาดเพิ่มมากขึ้นเท่านั้น ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การควบคุมไม่ได้ผลมีหลายประการ แต่ที่สำคัญที่สุดได้แก่สภาพทางภูมิศาสตร์ของประเทศที่เอื้ออำนวยต่อการระบาดของเชื้อมาลาเรียมาก โดยเฉพาะตามป่าเขาในเขตทุรกันดาร นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องการดื้อต่อยาที่ใช้รักษา และการเคลื่อนย้ายประชากร

วิธีป้องกันและควบคุมไข้มาลาเรียมี 4 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. Blocking Man-Vector contact เป็นการป้องกันไม่ให้ยุงมากัด เช่น การนอนในมุ้งธรรมดาหรือมุ้งชุบสารเคมีฆ่าแมลง การใช้สารทากันยุง การติดตั้งมุ้งลวดตามบ้าน เป็นต้น

2. Vector Control เป็นการควบคุมและทำลายยุงทั้งระยะตัวอ่อนและตัวแก่ ที่ใช้กันอยู่ในขณะนี้ได้แก่การใช้สารฆ่าแมลงพ่นตามบ้านและมุ้ง บางแห่งใช้ปลากินลูกน้ำเข้าช่วย

3. Treatment of malaria case เป็นการรักษาผู้ป่วยไม่ให้เป็นแหล่งสะสมและแพร่กระจายเชื้อไปสู่ผู้อื่นได้

4. Drug prophylaxis เป็นการใช้ยากินป้องกันก่อนที่จะเกิดอาการ แต่มักไม่ได้ผลดีดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

10. การวิจัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

วิธีดั้งเดิมและยังเป็นที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปอยู่ในขณะนี้คือ การตรวจหาเชื้อจากฟิล์มเลือดย้อมสีทั้งจากฟิล์มหนาและฟิล์มบาง ย้อมด้วยสี Giemsa นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ มาช่วยในการวินิจฉัยโดยเฉพาะในการศึกษาวิจัยด้านวิทยาการระบาด เช่น การตรวจทาง serology การตรวจค้นหา DNA (DNA probe) และการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป เป็นต้น

ลักษณะของเชื้อมาลาเรียในฟิล์มบาง

P. vivax

- เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่ส่วนมากมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดแดงปกติ
- มี Schuffner dots ทุกระยะ ยกเว้นในระยะ ring form
- มักพบระยะ amoeboid form แทบทุกราย
- ในระยะ mature schizont มี merozoites 12-24 ตัว

P. ovale

ลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับ *P. vivax* แต่ต่างกันที่

- ในระยะ mature schizont มี merozoites 6-12 (8) ตัว
- ระยะ amoeboid form ไม่มีการยืดของไซโตพลาสมมากนัก
- ผนังเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมักแตกเป็นแฉกๆ
- รูปร่างของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่ส่วนใหญ่จะรี

P. malariae

- เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่มักมีขนาดเล็กหรือเท่ากับปกติ
- ไม่เห็น stippling บนผนังเม็ดเลือดแดง
- ไซโตพลาสมไม่เป็นแบบ amoeboid form อาจพบ compact หรือ band form
- ในระยะ mature schizont มี merozoites 6-12(8) ตัว

P. falciparum

- เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้ออยู่มักมีขนาดปกติ
- ในผู้ป่วยส่วนใหญ่จะพบเฉพาะระยะ ring form และ/หรือ gametocyte ที่มีรูปร่างคล้ายกล้วยหอม ยกเว้นในรายที่มีเชื้อจำนวนมาก ๆ หรือในบางสภาวะ เช่น มาลาเรียขึ้นสมองอาจพบระยะ growing trophozoite, และ young gametocyte ร่วมด้วย

ในฟิล์มหนา ย้อมด้วยสี Giemsa

ใช้หลักการเดียวกับการตรวจฟิล์มบาง แต่จะดูลำบากขึ้นเนื่องจากไม่เห็นขอบเขตเม็ดเลือดแดง ขนาดของเชื้อจะดูเล็กกว่าในฟิล์มบางและรูปร่างของเชื้ออาจผิดเพี้ยนไปบ้าง ต้องใช้ประสบการณ์ในการวินิจฉัยอย่างมาก

หมายเหตุ:

1. การใช้ฟิล์มหนาไม่สามารถแยกเชื้อชนิด *P. vivax* กับ *P. ovale* ได้เด็ดขาด แต่โดยทั่วไปในทางปฏิบัติเนื่องจากใช้ฟิล์มหนากันมากและอุบัติการณ์ของ *P. ovale* ในประเทศไทยมีน้อยกว่า *P. vivax* มาก จึงมักรายงานเป็น *P. vivax* เสมอ อีกประการหนึ่งการรักษาก็ใช้แบบเดียวกัน

2. ระยะต่าง ๆ และจำนวนของเชื้อมาลาเรีย ในผู้ป่วยแต่ละรายมักมีไม่เหมือนกันและไม่จำเป็นต้องพบทุกระยะของเชื้อ

3. คนอาจติดเชื้อมาลาเรียได้มากกว่าหนึ่งชนิด (mix infection) ที่พบบ่อยคือ *P. falciparum* กับ *P. vivax* การตรวจจึงควรคำนึงถึงข้อนี้ด้วย

4. ในระยะ ring form บางครั้งอาจเห็นตัวเชื้อติดอยู่ที่ผิวของเม็ดเลือดแดง (Accole form) หรือมี chromatin 2 อัน (double chromatin) หรือมีตัวเชื้อหลายตัวอยู่ในเม็ดเลือดแดง (double or multiple infection) โดยเฉพาะใน *P. falciparum*

5. ความผิดพลาดจากการย้อมสี เช่น สีจางหรือเข้มเกินไป หรือฟิล์มเลือดไม่ดี มักทำให้การวินิจฉัยมีปัญหาได้บ่อยๆ

6. ก่อนที่จะรายงานว่าไม่พบเชื้อ ต้องใช้เวลาตรวจอย่างน้อย 5 นาที สำหรับฟิล์มหนา และ 15 นาที สำหรับฟิล์มบาง

7. คนไข้ที่ได้รับยารักษามาลาเรียมาบ้างแล้ว อาจทำให้รูปร่างของเชื้อมาลาเรียผิดปกติ

8. ถ้ามีความสงสัยในการวินิจฉัยให้เจาะเลือดซ้ำทุก 6 ชม. และปรึกษาผู้รู้

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุมาลี กำจรวงศ์ไพศาล (2545) ศึกษาการตรวจหาสารต้านมาลาเรียจากสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ในประเทศไทยการตรวจกับเชื้อมาลาเรียในจานทดลองพบว่าการที่เชื้อไข้มาลาเรีย พลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม ดื้อต่อยาต้านมาลารียที่ใช้กันอยู่นั้น จึงเป็นความจำเป็นเร่งด่วนในการค้นหายาต้านมาลาเรียใหม่ๆ จากพืชและจุลินทรีย์ เพื่อการรักษาโรคมาลาเรียดื้อยา โครงการนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจกรองหาสารต้านมาลาเรียให้มีประสิทธิภาพสูง และทำการตรวจกรองหาสารต้านมาลาเรียจากพืชและเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์สายพันธ์ต่างๆที่แยกได้จากธรรมชาติและเก็บรักษาโดยศูนย์ไบโอเทค รวมทั้งสารสังเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ ได้ทำการพัฒนาระบบตรวจกรองสารต้านมาลาเรีย และนำมาใช้ในการตรวจกรองฤทธิ์ต้านมาลาเรียจำนวน 16,170 ตัวอย่าง โดยพบว่าร้อยละ 31.8 ของตัวอย่างจากพืชจำนวน 1,915 ตัวอย่างและ ร้อยละ 3.04 ของตัวอย่างจากจุลินทรีย์จำนวน 13,664 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างจากจุลินทรีย์จำนวน 3,276 สายพันธ์ ที่ได้ทำการตรวจกรองใน 5 ปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2539-พ.ศ. 2544) โดยจำแนกตามกลุ่มพบว่า กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่พบต้านมาลาเรียมากกว่าร้อยละ 10-20 ของสายพันธุ์ที่ทอสอบจัดอยู่ในกลุ่ม streptomyces (ร้อยละ 19) soil fungi (ร้อยละ 17) alkaline fungi (ร้อยละ 17) mushroom (ร้อยละ 13) coelomycete (ร้อยละ 12) และ ราแมลง (ร้อยละ 11) ทางศูนย์ฯได้ทำการแยกสารเพื่อหาสารต้านมาลาเรียจากจุลินทรีย์เหล่านี้ไปแล้วหลายชนิดทั้งในกลุ่มของ Cordyceps, Xylaria, Paecelomyces และอื่นๆโดยมุ่งเน้นหาสรต้านมาลาเรียเพื่อการพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียต่อไป

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

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

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

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิวของสารสกัดและน้ำหมักของพืชไทย พบว่าสารสกัดและน้ำหมักจากเปลือกมังคุด กระชายดำ มะขามป้อม มะเกี๋ยง ขมิ้นชันและใบบัวบก สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Propionibacterium acnes* ได้ดีแตกต่างกัน โดยสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม เปลือกมังคุด กระชายดำ ขมิ้นชัน ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม กัดเปลือกมังคุด ขมิ้นชัน กระชายดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้คือ

น้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มะขามป้อม กระชายดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุดเท่านั้น และเมื่อนำน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) โดยวิธี Broth dilution พบว่า ค่า MIC ของ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 1.5625 % และ *Propionibacterium acnes* เท่ากับ 6.25 %

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

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

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้อบ
2. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
5. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
6. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
7. ชุดกรองสาร

3.1.2 สารเคมี

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
2. ethanol
3. Methanol
4. Hexane
5. Ethylacetate
6. Rifampicin
7. Streptomycin
8. Isoniazid
9. Ofloxacin

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.2 พืชสมุนไพร และจุลชีพ

3.2.1 มะเดื่อ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Ficus hispida Linn. f.
ชื่อวงศ์ : MORACEAE

3.2.2 เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

1. เซลล์มะเร็งในช่องปาก (human mouth carcinoma : KB)
2. เซลล์มะเร็งปอด(human small cell lung cancer : NCI-H187)
3. เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer : MCF-7)

3.2.3 เชื้อวัณโรค

เชื้อวัณโรคที่ใช้ในการวิจัยคือ *Mycobacterium tuberculosis* (H_{37}Ra)

3.2.5 เชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรีย ที่ใช้ในการศึกษา คือ *Plasmodium falciparum*

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. ทำการสำรวจอนุกรมวิธานของพืชสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ มะเดื่อและรับรองพืชสมุนไพรตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์(Voucher Specimens)
2. นำส่วนของมะเดื่อ มาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C
3. นำส่วนของมะเดื่อที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารพืชสมุนไพร

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

1. ส่วนของมะเดื่อ ที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 0.5 Kg แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือเฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2. นำของผสมมากรองแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °C จะได้สารสกัดหยาบ(Crude extract) ของชั้นเฮกเซน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นต่อไป

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

3.3.3 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี

1. Cardiac glycosides: ภายในโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย steroids nucleus, unsaturated lactone ring และ rare sugar ทั้งสามส่วนนี้มีความสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแต่ละส่วนในโครงสร้างทำได้ดังนี้

1.1 Steroid nucleus ใช้วิธี Liebermann-Burchard test ให้สีฟ้าหรือเขียว สารทดสอบต้องแห้งและปราศจากน้ำ

1.2 Unsaturated lactone ring ตรวจสอบด้วย Kedde reagent หรือ Raymond reagent ให้สีม่วงน้ำเงิน หรือ Baljet reagent ให้สีส้มแดง

1.3 Deoxy sugar ตรวจสอบด้วย Killer-Kailiani test ให้วงแหวนสีม่วงแดงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลว

ทั้งนี้สารประกอบหลายชนิดในกลุ่ม sesquiterpene lactones และ cardiac glycosides ที่มีโครงสร้างเป็น unsaturated lactones จะให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย Kedde reagent, Baljet reagent และ Legal reagent

2. Saponin glycosides: สารในกลุ่ม saponins มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิวเมื่อละลายน้ำจึงเกิดฟองได้ มีโครงสร้างหลัก 2 ชนิด คือ steroidal saponins และ triterpenoid saponins การตรวจสอบเบื้องต้น ทางพฤกษเคมีของสารในกลุ่มนี้

อาศัยการเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ ฟองรูปหกเหลี่ยมจะคงอยู่นานกว่า 15 นาที และคุณสมบัติการทำให้เม็ดเลือดแดง แตกออก นอกจากนี้ยังตรวจสอบด้วย Liebermann-Burchard test โดย steroidal saponins ให้สีฟ้า-เขียว ในขณะที่ triterpenoid saponins ให้สีม่วงแดง

3. Anthraquinone glycosides: สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยส่วนของ aglycone ของ anthraquinones และน้ำตาล ซึ่ง anthraquinones มีคุณสมบัติละลายได้ดีในด่างแล้วเกิดเป็นสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึงไฮโดรไลซ์ anthraquinone glycosides ด้วยกรดหรือด่าง หรือ $FeCl_3$ หรือ sodium dithionate ให้กลายเป็น aglycone ของ anthraquinones แล้ว จึงสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทดสอบกับด่างจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกว่า Borntrager test

4. Flavonoids: ฟลาโวนอยด์แบ่งออกเป็น typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids

การตรวจสอบสารในกลุ่มนี้ ทำได้ดังนี้

4.1 Shibata's reaction หรือ Cyanidin test เป็นการตรวจสอบโครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์ หากมีโครงสร้างเป็นbenzo-pyrone ที่เป็นโครงสร้างส่วนสำคัญใน flavones, flavonols, flavanones, flavanonols และ isoflavones จะเกิดปฏิกิริยากับแมกนีเซียมโดยมีกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นช่วยละลายแมกนีเซียมและเร่งปฏิกิริยาได้ผลบวกเป็นสารละลายสีส้ม แดง หรือชมพู

4.2 Pew test ใช้หลักการเดียวกันกับ cyanidin test แต่ใช้สังกะสีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลบวกจะให้สารละลายเป็นสี ส้ม -แดง แต่สีที่เกิดขึ้นจางกว่าวิธี cyaniding test

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

4.4 Bromine water เป็นการตรวจสอบสารในกลุ่ม proanthocyanidins ที่เป็นองค์ประกอบใน condensed tannins ผลบวกเกิดตะกอนสีเหลือง ซึ่ง flavonoids กลุ่มอื่นๆ

4.5 Molisch's test เป็นการทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต หากพบน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ glycosides จะพบวง แหวนสีม่วงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลว และในบางครั้งพบสีม่วงกระจายอยู่ทั่วไปในชั้นล่างที่เป็นชั้นกรดซัลฟิวริก เข้มข้น

4.6 การตรวจสอบโดยใช้สารละลายกรดและด่าง จะพบว่าฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงสีได้ตามสภาพความ เป็นกรดหรือด่าง หากเป็นสารกลุ่ม anthocyanins เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สีม่วง หรือน้ำเงิน หากเป็นสารกลุ่ม chalcones และ aurones เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สี ส้มหรือแดง ทั้งนี้สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะให้ผลบวกกับ Shinoda test และกรดซัลฟิวริก ในขณะที่สารพวก polyphenols ชนิดอื่นก็สามารถให้ผลบวกลวงกับสารทดสอบเหล่านี้

5. Tannins: เป็นสารจำพวก polyphenols แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1). hydrolyzable tannins ที่โครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วย phenolic acids และน้ำตาล เมื่อต้มในกรดหรือใช้เอนไซม์จะกลายเป็นกรดและน้ำตาล 2). condensed tannins มีโครงสร้างเป็น oligomer หรือ polymer ที่มี monomer

เป็น catechins (flavan-3-ol) ซึ่งอาจจัดเป็นproanthocyanidins ของ flavonoids เมื่อนำไปต้มกับกรด จะเกิดตะกอนสีแดงที่เรียกว่า phloba phene จึงเรียกสารเหล่านี้ว่า phlobatannins และ 3). pseudotannins เป็นสารเชิงเดี่ยวมีขนาดโมเลกุลเล็ก แทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานและตกตะกอนอัลคาลอยด์ได้ จึงทำให้อัลคาลอยด์หมดฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแทนนินอาศัยการเกิดตะกอนระหว่างแทนนินกับ gelatin, lead acetate, zinc acetate หรืออัลคาลอยด์ ได้

5.1 การตรวจสอบด้วย gelatin สารจำพวก true tannins จะเกิดตะกอนคงตัวกับ gelatin แต่สารจำพวกpseudotannins จะเกิดตะกอนที่ไม่คงตัว

5.2 การตรวจสอบด้วย bromine water หากเป็น condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine

5.3 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%) ในน้ำหรือเอทานอล

5.4 การตรวจสอบด้วย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น พบว่า condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. Coumarins: เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น benzo-□-pyrone หรือ phenylpropanoid lactone หรือ benzopyran-2-one ตรวจสอบด้วยการนำสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์มาละลายในเอธานอล แล้วกรอง จากนั้นนำไปชุบด้วยกระดาษ กรอง แล้วจึงหยดด้วย 10% NaOH จะพบการเรืองแสงที่ long wave UV (365 nm)

7. Cyanogenic glycosides: ทดสอบด้วยวิธี Grignard test และ Guaiac-copper sulfate paper

8. Alkaloids: อัลคาลอย์เป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล true alkaloids ต้องมี ไนโตรเจนอยู่ใน 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 ซึ่งมักพบได้ในสารสกัดจากพืช ในทางตรงกันข้ามอัลคาลอยด์ไม่ทุกชนิดที่อาจพบได้ในสารสกัดจากพืชจะให้ผลบวกกับสารทดสอบเหล่านี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างทางเคมี (structural idiosyncrasy

9. Sterols: สามารถทดสอบสเตอรอลด้วย Liebermann-Buchard test และ Salkowski reaction

10. Carbohydrates: สามารถตรวจสอบคาร์โบไฮเดรตได้ด้วย Molisch's test (การเกิดวงแหวนสีม่วงที่รอยต่อระหว่างชั้น ของเหลวกับ Molisch reagent) และ Aniline acetate reaction

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) (อ้างจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)โดยใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ใช้ 0.5 % DMSO เป็น Negative control IC_{50} of Positive control คือ Ellipticine=0.325 μg/ml, Doxorubicine=0.147 μg/ml โดยทำการแปลผลดังนี้

ถ้าสามามารถต้านมะเร็งได้น้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ถ้าสามามารถต้านมะเร็งได้มากกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และจะรายงานผลเป็นค่า % inhibition

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB) (อ้างจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดยใช้วิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA) และ ใช้ Negative control เป็น 0.5 % DMSO MIC of Positive control คือ Rifampicin = 0.003-0.012 μg/ml, Streptomycin=0.156-0.313 μg/ml Isoniazid=0.023-0.046 μg/ml, Ofloxacin=0.391-0.781 μg/ml โดยทำการแปลผลดังนี้

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และจะรายงานผลเป็นค่า MIC (μg/ml)

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรีย (Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*, K1 Stain) (อ้างจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)โดยใช้วิธี Microculture Radioisotope Technique และ ใช้ Negative control เป็น 0.1% DMSO (Dimethyl sulfoxide) IC_{50} of Positive control คือ Dihydroartemisinine = 4.4 nM โดยทำการแปลผลดังนี้

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (μg/ml)

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2553 – 30 กันยายน 2554

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

1. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
2. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การสกัดสารสำคัญจากมะเดื่อ ใช้วิธีการหมักแบบ Maceration และเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบทั้งหมดจำนวน 12 ชนิด ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ผลการทดลองเป็นดังนี้

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (human small cell lung cancer : NCI-H187) ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ

สารสกัด		human small cell lung cancer : NCI-H187
		% inhibition
ใบ	Hexane	91.2
	Ethylacetate	90.5
	Methanol	90.6
ราก	Hexane	90.8
	Ethylacetate	51.7
	Methanol	89.8
ผล	Hexane	90.3
	Ethylacetate	86.1
	Methanol	70.5
เปลือก	Hexane	90.9
	Ethylacetate	91.2
	Methanol	40.9

ตารางที่ 4.1 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ พบว่ามีสารสกัดจำนวน 11 ชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งปอด(% inhibition มากกว่า 50) คือสารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากรากชั้นเฮกเซน สารสกัดจากรากชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเฮกเซน สารสกัดจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากผลชั้นเมทานอล สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต ยกเว้นสารสกัดจากเปลือกชั้นเมทานอล

สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุดคือ สารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์การยับยั้ง ร้อยละ 91.2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ

สารสกัด		KB-Oral cavity cancer
		% inhibition
ใบ	Hexane	94.97
	Ethylacetate	94.88
	Methanol	92.44
ราก	Hexane	88.95
	Ethylacetate	8.82
	Methanol	88.32
ผล	Hexane	16.39
	Ethylacetate	45.32
	Methanol	81.28
เปลือก	Hexane	94.99
	Ethylacetate	94.93
	Methanol	52.09

ตารางที่ 4.2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากมะเดื่อพบว่ามีสารสกัดจำนวน 8 ชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งในช่องปาก (% inhibition มากกว่า50) คือสารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากรากชั้นเฮกเซน สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเมทานอล สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน สารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต และสารสกัดจากเปลือกชั้นเมทานอล ยกเว้นสารสกัดจากรากชั้นเอทิลแอซิเตตสารสกัดจากผลชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต

สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุดคือ สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์การยับยั้งร้อยละ 94.99

4.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม (**breast cancer : MCF-7**) ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ

สารสกัด		**breast cancer : MCF-7**
		% inhibition
ใบ	Hexane	91.94
	Ethylacetate	78.43
	Methanol	48.45
ราก	Hexane	35.58
	Ethylacetate	68.00
	Methanol	65.21
ผล	Hexane	8.22
	Ethylacetate	29.57
	Methanol	74.47
เปลือก	Hexane	66.94
	Ethylacetate	61.05
	Methanol	34.57

ตารางที่ 4.3 แสดงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ พบว่ามีสารสกัด จำนวน 11 ชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (% inhibition มากกว่า 50) คือสารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากรากชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเมทานอล สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต ยกเว้นสารสกัดจากรากชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเฮกเซน สารสกัดจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต และสารสกัดจากเปลือกชั้นเมทานอล

สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุดคือ สารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์การยับยั้ง ร้อยละ 91.94

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB) ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ

สารสกัด		Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB
		% inhibition
ใบ	Hexane	-24.0
	Ethylacetate	-14.4
	Methanol	-33.6
ราก	Hexane	-12.8
	Ethylacetate	-17.2
	Methanol	-10.3
ผล	Hexane	-32.4
	Ethylacetate	-33.5
	Methanol	-12.5
เปลือก	Hexane	17.5
	Ethylacetate	20.4
	Methanol	21.8

ตารางที่ 4.4 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ของสารสกัดสารจากมะเดื่อพบว่า สารสกัดจำนวน 12 ชนิด ไมมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค สารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากรากชั้นเฮกเซน สารสกัดจากรากชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเฮกเซน สารสกัดจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากผลชั้นเมทานอล สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต และสารสกัดจากเปลือกชั้นเมทานอล

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*, K1 Stain) ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ

สารสกัด		Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*, K1 Stain
		% inhibition
ใบ	Hexane	-
	Ethylacetate	-
	Methanol	5.57
ราก	Hexane	-
	Ethylacetate	-
	Methanol	2.48
ผล	Hexane	-
	Ethylacetate	-
	Methanol	-
เปลือก	Hexane	-
	Ethylacetate	6.30
	Methanol	

ตารางที่ 4.5 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ของสารสกัดสารจากมะเดื่อ พบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียคือสารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล และสารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (human small cell lung cancer : NCI-H187) พบว่ามีสารสกัด จำนวน 11 ชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งปอด (% inhibition มากกว่า 50) คือสารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากรากชั้นเฮกเซน สารสกัดจากรากชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเฮกเซน สารสกัดจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากผลชั้นเมทานอล สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต ยกเว้นสารสกัดจากเปลือกชั้นเมทานอล

สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุดคือ สารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์การยับยั้ง ร้อยละ 91.2

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) พบว่า มีสารสกัดจำนวน 8 ชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งปอด(% inhibition มากกว่า50) คือสารสกัดจากใบชั้น เฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากรากชั้นเฮกเซน สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเมทานอล สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน สารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต และสารสกัดจากเปลือกชั้นเมทานอล ยกเว้นสารสกัดจากรากชั้นเอทิลแอซิเตตสารสกัดจากผลชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต

สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุดคือ สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์การยับยั้ง ร้อยละ 94.99

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม (**breast cancer : MCF-7**) พบว่ามีสารสกัด จำนวน 11 ชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งปอด(% inhibition มากกว่า 50) คือสารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากรากชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเมทานอล สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต ยกเว้นสารสกัดจากรากชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเฮกเซน สารสกัดจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต และสารสกัดจากเปลือกชั้นเมทานอล

สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุดคือ สารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน มีฤทธิ์การยับยั้ง ร้อยละ 91.94

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB) พบว่า สารสกัดจำนวน 12 ชนิด ไมมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค สารสกัดจากใบชั้นเฮกเซน สารสกัดจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากรากชั้นเฮกเซน สารสกัดจากรากชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล สารสกัดจากผลชั้นเฮกเซน สารสกัดจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต สารสกัดจากผลชั้นเมทานอล สารสกัดจากเปลือกชั้นเฮกเซน และสารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต และสารสกัดจากเปลือกชั้นเมทานอล

5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 12 ชนิด ที่ได้จากการสกัดจากส่วนของมะเดื่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*, K1 Stain) พบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียคือสารสกัดจากใบชั้นเมทานอล สารสกัดจากรากชั้นเมทานอล และสารสกัดจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต

5.2 อภิปรายผล

การสกัดสารสำคัญจากมะเดื่อ ใช้วิธีการหมักแบบ Maceration และเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบทั้งหมดจำนวน 12 ชนิด ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย จากผลการศึกษามีประเด็นที่เป็นข้อสังเกตดังนี้

1. สารสกัดจากส่วนของมะเดื่อ ส่วนใหญ่ มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ทั้งมะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และมะเร็งในช่องปาก
2. สารสกัดจากส่วนของมะเดื่อ ไม่มี ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค
3. สารสกัดจากส่วนของมะเดื่อ บางส่วน แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยต่อไปควรมีการศึกษาถึงระดับโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งส่วนของมะเดื่อที่มาจาก ราก เมล็ด ใบ ดอก และผล เพื่อจะได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรไปทำให้บริสุทธิ์และพัฒนาต่อยอดการวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บรรณานุกรม

1. เกสร นันทจิต. 2541 . **ฤทธิ์ต้านจุลชีพของรากหญ้าแฝก.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

2. เกสร นันทจิต. 2545. **ฤทธิ์ต้านจุลชีพของใบขันทองพยาบาท.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

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

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

6. ชฎารัตน์ ดวงรัตน์. 2544. **ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองของสารสกัดจากต้นกระทุ่มน้ำ.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

18. วัชรี คุณกิตติ และคณะ. 2547. **การพัฒนาและประเมินผลทางคลินิกของเวชภัณฑ์จากว้านว่านหางจรเข้ ส่วนสกัดจากใบบัวบก ใบฝรั่ง และใบข่อยเพื่อใช้รักษาโรคในช่องปาก.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

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

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

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

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

24. ราชบัณฑิตยสถานจัดพิมพ์. 2538. **อนุกรมวิธานพืช อักษร ก ฉบับราชบัณฑิตยสถาน.** เพื่อนพิมพ์.

25. Arina C.U.Uys. et al.2002. **Antimalarial Compounds from *Parinari capensis*.** ***Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 12 2167-2169.***

26. Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** American Journal Clinical Pathology 45:493-6.

27. Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Food Science Technology 28:25-30.

28. Brien JO, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem,* 267, 2000, 5421-5426

29. Changsen C, Franzblau SG, Palittapongarnpim P. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screeinig for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, 2003, 3682-3687.

30. Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 42, 1998, 344-347.

31. Javanmardi, J., C. Stushnoff, E. Locke, and J. M. Vivanco. 2003. **Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions**. Food Chemistry 83:547-550

32. Sithisarn,P., Supabphol,R. and Gritsanapan,W.,2005. **Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209)**, Journal of Ethnopharmacology, 99,109–112.

33. SaiRam, M., et al. 2000. **Anti-microbial activity of a new vaginal Contraceptive NIM-76 from neem oil (Azadirachta indica)**, Journal of Ethnopharmacology, 71, 377–382.

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

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

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

36. http://localbio.mnre.go.th/html/search%20project/umnardcharoen/2549/ pathumrachawongsa-kampone-moo9.html

37. http://www.dnp.go.th/Pattani_botany/

38. http://picasaweb.google.com/lh/photo/

39. http://www.wangtakrai.com/panmai/images/panmai/341.jpg

40. http://www.nongno-rmu.org/index.php

41. Beaver PC, Jung Rc and Cupp EW. Clinical Parasitology, 9th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, USA. 1984. 825 pp.

42. Beck JW and Davies JE. Medical Parasitology, 3rd ed., The C.V. Mosby Company, Toronto, USA. 1981. 355 pp.

43. Brown HW and Neva FA. Basic Clinical Parasitology, 5th ed. Appleton-Century-Crofts/Norwalk, Connecticut, USA. 1983. 339 pp.

44. Bruce-Chwatt LJ. Essential Malariology. William Heinemann. Medical Books Ltd., London, UK. 1980. 354 pp.