รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

อุดมเดชา พลเยี่ยม
อัญชนา ขัตติยะวงศ์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

Potential of extracts of *Ficus hispida* Linn to controlling germination and growth of weed in rice fields for increase the value of biodiversity and its sustainable use

Udomdeja Polyium

Anchana Kuttiyawong

This Research in Funded by Faculty of Science and Technology

Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

Fiscal Year 2014

ชื่อเรื่อง : ศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

ผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุดมเดชา พลเยี่ยม อาจารย์อัญชนา ขัตติยะวงศ์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทคัดย่อ

การศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อ (*Ficus hispida* Linn) ต่อการยับยั้งการงอก และการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli*) ซึ่งเป็นวัชพืชในนาข้าว โดยนำเปลือก ใบและผลของมะเดื่อ มาแยกสารโดยนำมาหมักและสกัดตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ 9 ชนิด นำสารสกัดหยาบมาการทดสอบประเภทของพฤกษเคมี ทดสอบการยับยั้งการงอก การยับยั้งความยาวราก การยับยั้งความยาวลำต้น และการยับยั้งน้ำหนักแห้งของหญ้าข้าวนก และเลือกสารสกัดหยาบที่มีผลการยับยั้งดีที่สุดมาแยกชั้นโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีจะได้สารแต่ละชั้น(fraction) และนำมาทดสอบการยับยั้งการการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก

ผลการวิจัยพบว่า

1. สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย เมทานอลที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm แสดงการยับยั้งการงอก การยับยั้งความยาวราก การยับยั้งความยาวต้น และการยับยั้งน้ำหนักแห้งในเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูง

2. สารสกัดจากเปลือก ใบ และผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยเมทานอลเมื่อแยกชั้นสารด้วยเทคนิคคอลัมม์โครมาโทกราฟพี่พบว่าเมื่อนำสารสกัดจากของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Methanol ไปแยกชั้นพบว่าสารสกัดชั้น F5 F8 และ F2 แสดงการยับยั้งการงอก การยับยั้งความยาวราก การยับยั้งความยาวต้นและการยับยั้งน้ำหนักแห้งในเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูง

Title : Potential of extracts of *Ficus hispida* for controlling germination and Growth of Weed in Rice Field for Increase the value of biodiversity and its sustainable use

Researcher : Udomdeja polyium (M.Sc) Anchana Kuttiyawong (M.Ed)
Faculty of Science and Technology
Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

ABSTRACT

The potential of extracts of the *Ficus hispida* Linn to inhibit germination and growth of barnyardgrass (Echinochloa crus-galli), a common weed in rice. The bark, leaves and fruit of *F. hispida* isolated by the Maceration and extracted by the polarity of the solvent (Sequential Extraction) with organic solvents such as hexane, ethyl acetate and methanol, when each part of the crude extract was tested the type of phytochemical, tested for germinate inhibition, root length inhibition, stem length inhibition and dry weight inhibition of barnyardgrass and selected extracts with highest inhibition to separation using column chromatography, the fractions tested repeating.

The results showed that

1. Crude methanolic extracts from the bark, leaves and fruit of barnyardgrass at a concentration of 3,000 ppm showed highest inhibited percentage of germinate inhibition, root length inhibition, stem length inhibition and dry weight inhibition.

2. Fractions methanolic extracts from the bark, leaves and fruit of barnyardgrass on a separate with column chromatography found that fractions extracts F5, F8 and F2 showed highest inhibited percentage of germinate inhibition, root length inhibition, stem length inhibition and dry weight inhibition.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรา อมรแก้ว คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัย และอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการทางเคมีอินทรีย์สำหรับการทดลองเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้แก่คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**I**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**II**
กิตติกรรมประกาศ	**III**
สารบัญ	**IV**
สารบัญตาราง	**VI**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**5**
2.1 การงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช	5
2.2 วัชพืชในนาข้าว	14
2.3 พืช	20
2.4 การเตรียมพืช	21
2.5 การสกัดสารจากพืช	23
2.6 สารออกฤทธิ์ในพืช	31
2.7 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืช	33
2.8 เทคนิคการแยกสารจากพืช	41
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	47
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	**50**
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	50
3.2 พืชและวัชพืช	51
3.3 วิธีการทดลอง	51
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	56

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 ระยะเวลาการทดลอง	56
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	56
บทที่ 4 ผลการทดลอง	**57**
4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี	57
4.2 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืช	58
4.3 ผลของสารแต่ละชั้นต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช	62
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	**65**
5.1 สรุปผลการทดลอง	65
5.2 อภิปรายผล	66
5.3 ข้อเสนอแนะ	66
บรรณานุกรม	**67**

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 แสดงรายชื่อวัชพืชร้ายแรง 10 อันดับแรกของโลก	1
ตารางที่ 1.2 แสดงวัชพืชร้ายแรงในประเทศไทย	2
ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรที่ใช้ในการคำนวณ ในการวิเคราะห์วิธี Conventional growth analysis	13
ตารางที่ 2.2 แสดงรายชื่อวัชพืชที่สำคัญในนาข้าว ในแต่ละสภาพการทำนา	16
ตารางที่ 2.3 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี	38
ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี	57
ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชด้วยสารสกัดจากเปลือก ใบ และผล ของมะเดื่อ	58
ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชด้วยสารสกัดจากเปลือก ใบ และผล ของมะเดื่อ	59
ตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชด้วยสารสกัดจากเปลือก ใบ และผล ของมะเดื่อ	60
ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชด้วยสารสกัดจากเปลือก ใบ และผล ของมะเดื่อ	61
ตารางที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดจากเปลือกมะเดื่อด้วย Methanol	62
ตารางที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะเดื่อชั้น Methanol	63
ตารางที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดจากผลมะเดื่อด้วย Methanol	64

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การใช้สารเคมีทางการเกษตรกรรมทั้งการปลูกพืชและการเลี้ยงสัตว์มีการใช้สารเคมีหลายชนิด ได้แก่ สารกำจัดวัชพืช (Herbicide) สารกำจัดแมลง (Insecticide) และปุ๋ยเคมีชนิดต่างๆ ซึ่งสารเคมีดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ ทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในพืชผัก สัตว์เลี้ยง และบริเวณใกล้พื้นที่ที่มีการใช้สารเหล่านั้น ส่งผลให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงที่จะได้รับสารเคมีที่ทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ ดังนั้นในปัจจุบันการใช้สารเคมีทางการเกษตรจึงมีแนวโน้มที่จะลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ แล้วหันมาใช้สารเคมีที่ได้จากธรรมชาติที่เรียกว่า การป้องกันกำจัดโดยชีววิธี (Biological control) ได้แก่ สารจากจุลินทรีย์ ฮอร์โมน และสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ

วัชพืชในนาข้าวมีหลายชนิด ประเทศไทยมีการสำรวจและจำแนกชนิดของวัชพืชที่ถูกจัดเป็นวัชพืชหลัก (major weed) พบว่ามีจำนวนประมาณ 100 ชนิด หญ้าข้าวนกเป็นวัชพืชชนิดหนึ่งที่พบในนาข้าว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv มีชื่อสามัญว่า Barnyard grass หญ้าข้าวนกเป็นวัชพืชร้ายแรง 10 อันดับแรกของโลก (Holm, 1969) และยังเป็นวัชพืชร้ายแรงอันดับต้นของประเทศไทย (พรชัย, 2540)

ตารางที่ 1.1 แสดงรายชื่อวัชพืชร้ายแรง 10 อันดับแรกของโลก

ลำดับ	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	Purple nutsedge	*Cyperus rotundus*
2	Bermuda grass	*Cynodon dactylon*
3	**Barnyard grass**	***Echinochloa crus – galli***
4	Jungll rice	*Echinochloa colonum*
5	Goose grass	*Eluesine indica*
6	Johnson grass	*Sorghum halepense*
7	Guinea grass	*Panicum maximum*
8	Water hyacinth	*Eichhornia crassipes*
9	Cogon grass	*Imperata cylindrica*
10	Lantana	*Lantana camara*

ที่มา : Holm, 1969

ตารางที่ 2 แสดงวัชพืชร้ายแรงในประเทศไทย

ลำดับ	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	ผักโขมหนาม	*Amaranthus spinosus*
2	**หญ้าข้าวนก**	***Echinochloa curs – galli***
3	หญ้านกสีชมพู	*Echinochloa colonum*
4	หญ้าคา	*Imperata cylindrica*
5	หญ้าโขย่ง	*Rottboellia cochinchinensis*
6	แห้วหมู	*Cyperus rotundus*
7	ผักปราบ	*Commelina spp.*
8	ไมยราบยักษ์	*Mimosa pigra*
9	สาบเสือ	*Eupatorium odoratum*
10	ผกากรอง	*Lantana camara*

ที่มา : พรชัย, 2540

การค้นหาสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้ในการกำจัดวัชพืชเป็นวิธีการใช้ธรรมชาติยับยั้งธรรมชาติด้วยกันที่เรียกว่าอัลลีโลพาธี (Allelopathy) โดยคำนี้มาจากภาษากรีก 2 คำคือ Allelon หมายถึงซึ่งกันและกัน และ pathos หมายถึงเดือดร้อนหรือทำให้เกิดอันตราย ทั้งนี้ Molisch (1937) ได้ให้ความหมายของ Allelopathy ไว้ว่าเป็นปฏิกิริยาชีวเคมีระหว่างพืชทุกชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีผลทั้งทางด้านการยับยั้งและการกระตุ้นปฏิกิริยาชีวเคมี นอกจากนี้ยังหมายถึงผลกระทบในทางที่เป็นอันตรายของพืชชนิดหนึ่งที่มีต่อการงอก การเติบโตและพัฒนาการของพืชอีกชนิดหนึ่งซึ่งอาจจะมีผลดีในทางกระตุ้น(stimulatory) หรือมีผลเสียในการยับยั้ง (inhibitory) ทั้งนี้ในพืชต่างชนิดกันจะสร้างสารอัลลิโลพาธิกต่างชนิดกัน และในเนื้อเยื่อพืชและส่วนของพืชที่ต่างกันก็จะสร้างสารอัลลิโลพาธิกได้ในปริมาณที่ต่างกันด้วย สารอัลลิโลพาธิกในพืชส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มแอลคาลอยด์ กลุ่มเทอร์พีนอยด์ กลุ่มฟลาโวนอยด์กลุ่มฟีนิลโพรเพนกลุ่มพอลิคีไทด์และกลุ่มพอลิอะเซทิลีน การปลดปล่อยสารอัลลิโลพาธิกออกจากพืชที่เป็นผู้ผลิตออกสู่สภาพแวดล้อมสามารถทำได้โดยวิธีการต่างๆ เช่น การระเหย การปลดปล่อยออกทางราก การชะล้าง และจากกระบวนการย่อยสลายซากพืช โดยที่การระเหย (volatilization) เป็นการปลดปล่อยสารอัลลิโลพาธิกออกสู่บรรยากาศรอบๆ ต้นพืชในสภาวะแก๊สแล้วไปมีผลกระทบต่อพืชอื่นๆ รวมทั้งแมลง การปลดปล่อยออกทางราก (exudation) สามารถเกิดขึ้นได้ในธัญพืชบางชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรน์ และข้าวฟ่าง ที่พบว่ามีการปลดปล่อยสารอัลลิโลพาธิกออกสู่สภาพแวดล้อมที่เป็นดินหรือน้ำโดยทางราก การชะล้าง (leaching) จะอาศัยน้ำฝน น้ำจากการชลประทาน และน้ำค้างเป็นตัวกลางในการชะและนำพาเอาสารอัลลิโลพาธิกจาก

ต้นพืชผู้ผลิตไปยังพืชอื่น หรือลงไปในดินหรือน้ำ ส่วนการย่อยสลายของซากพืช (decomposition) เป็นการปลดปล่อยสารอัลลิโลพาธิกออกจากเนื้อเยื่อของพืชเมื่อเกิดการย่อยสลาย สารอัลลิโลพาธิกซึ่งถูกปลดปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมแล้วเมื่อพืชอื่นได้รับเข้าไปจะมีผลกระทบต่อการเติบโตได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยผลทางตรงจะเป็นผลที่มีต่อลักษณะต่างๆ ของการเติบโตและกระบวนการเมแทบอลีซึมของพืช ส่วนผลทางอ้อมนั้นจะเป็นผลที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน สภาพของธาตุอาหาร การเปลี่ยนแปลงประชากร และกิจกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็นอันตรายและเป็นประโยชน์ ผลของสารอัลลิโลพาธิกนั้นอาจเกิดจากผลรวมจากสารหลายชนิดทำปฏิกิริยาร่วมกัน มีผลกระทบต่อกระบวนการหนึ่งหรือหลายกระบวนการในลักษณะพร้อมๆ หรือต่อเนื่องกัน

อัลลีโลพาธีเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบนิเวศ โดยเฉพาะระบบนิเวศเกษตร มีการศึกษาปรากฏการณ์นี้อย่างกว้างขวางทั้งระหว่างพืชปลูกต่อพืชปลูก พืชปลูกต่อวัชพืช วัชพืชต่อพืชปลูก และวัชพืชต่อวัชพืช เพื่อนำมาพัฒนาต่อยอดในการใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชในภาคการเกษตรกรรม

ผู้วิจัยจึงนำสารสกัดจากมะเดื่อมาใช้ในการกำจัดหญ้าข้าวนกซึ่งเป็นวัชพืชในนาข้าวในระดับการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยการนำมะเดื่อมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ การตรวจสอบสมบัติทางพฤกษเคมีเบื้องต้น และทดสอบการยับยั้งการงอกและการเติบโตของหญ้าข้าว โดยศึกษาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืช เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในภาคเกษตรกรรม ดังนั้นการวิจัยเพื่อการพัฒนาศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อในการควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าว จึงเป็นประเด็นที่ควรมีการศึกษาเพื่อการพัฒนามูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรในประเทศอย่างยั่งยืนให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

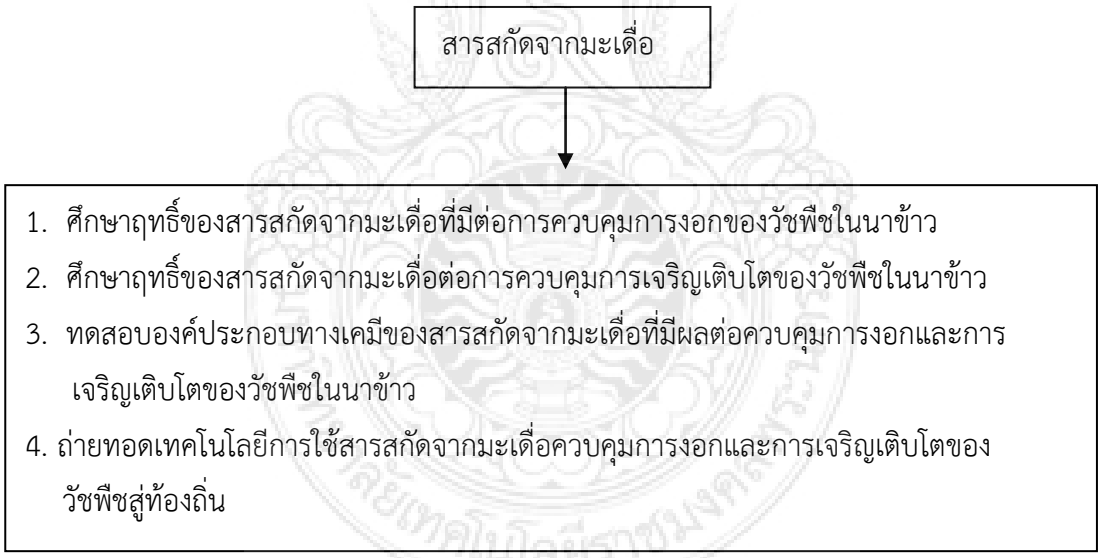
1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากมะเดื่อที่มีต่อการควบคุมการงอกของวัชพืชในนาข้าว
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากมะเดื่อต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าว
3. เพื่อทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากมะเดื่อที่มีผลต่อควบคุมการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าว

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน กำหนดขอบเขตการวิจัยดังนี้

1. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา คือ มะเดื่อ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus hispida* Linn
2. ส่วนของพืชที่ใช้ในการศึกษามี 3 ส่วนดังนี้
   เปลือก ใบ และผล
3. วัชพืชที่ใช้ในการศึกษาคือ
   หญ้าข้าวนก ชื่อวิทยาศาสตร์ *Echinochloa crus-galli (L.) Beauv*
4. สารที่ใช้ในการสกัดมี 3 ชนิดดังนี้
   เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล
5. การวิจัยนี้ทำการศึกษาทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย



1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

เป็นองค์ความรู้สำหรับการวิจัยและการพัฒนาผลิตภัณฑ์เคมีที่ได้จากธรรมชาติสำหรับนำไปใช้กำจัดวัชพืชในนาข้าวเพื่อพัฒนาต่อยอดสู่การวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าว เพื่อเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนคณะผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 การงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช
2.2 วัชพืชในนาข้าว
2.3 พืช
2.4 การเตรียมพืช
2.5 การสกัดสารจากพืช
2.6 สารออกฤทธิ์ในพืช
2.7 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืช
2.8 เทคนิคการแยกสารจากพืช
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของพืช

2.1.1 ความหมายของการงอก

การงอกของเมล็ดหมายถึง การงอกและพัฒนาการของต้นอ่อน เริ่มตั้งแต่เมล็ดพันธุ์มีกระบวนการต่างเกิดขึ้นในเมล็ดที่กำลังอยู่ในระยะพัก จนถึงระยะที่ต้นอ่อนเจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นต้นกล้าที่ถึง ขั้นที่โครงสร้างที่สำคัญของส่วนต่างๆของต้นอ่อน ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่าจะสามารถเจริญเติบโตต่อไปเป็นต้นพืชที่ปกติ ภายใต้สภาพแวดล้อมในดินที่เหมาะสม

2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด

1. น้ำ เมล็ดที่เจริญเติบโตเต็มพร้อมจะเก็บเกี่ยวภายในเมล็ดจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบเหลืออยู่น้อยมาก เมื่อเมล็ดพันธุ์จะงอก น้ำเป็นปัจจัยแรกที่จะกระตุ้นให้เมล็ดเกิดปฏิกิริยาเคมีและกระบวนการเมแทบอลิซึม เริ่มจากเมล็ดพันธุ์ดูดน้ำเข้าไปทำให้เปลือกเมล็ดอ่อนนุ่ม ทำให้เมล็ดพองโต เนื่องจากการขยายของผนังเซลล์และโพรโทพลาสต์ เมื่อเปลือกเมล็ดอ่อนนุ่มทำให้รากแทงผ่านเปลือกได้ เมล็ดพันธุ์พืชแต่ละชนิดต้องการน้ำสำหรับการงอกแตกต่างกัน บางชนิดหากได้รับน้ำมากเกินไปจะทำให้เมล็ดขาดออกซิเจนที่ใช้สำหรับหายใจและทำให้เมล็ดเน่า ในบางชนิด การที่เมล็ดพันธุ์ได้รับน้ำมากๆอาจจะทำให้

เมล็ดเข้าสู่สภาวะพักตัวใหม่ สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ ความหนาของเปลือก สารที่เคลือบอยู่ที่ผิวเปลือก ความเข้มข้นของน้ำ อุณหภูมิ และการสุกแก่ของเมล็ดที่ต่างกัน เป็นต้น

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

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

2.1.3 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างการงอกของเมล็ดพันธุ์

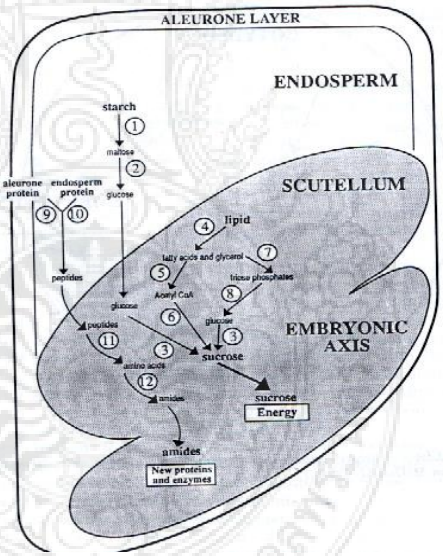
การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการงอกของเมล็ดพันธุ์เกิดได้เนื่องจากมีน้ำเข้าไปกระตุ้น กล่าวคือ เมล็ดพันธุ์เมื่อแก่เต็มที่และแห้งจะอยู่ในสภาวะเงียบ คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น อัตราการหายใจ และการใช้พลังงานภายในเมล็ดพันธุ์เกิดขึ้นน้อยมาก ต่อเมื่อเมล็ดได้รับน้ำเข้าไป ส่งผลให้ขบวนการสังเคราะห์ต่างๆภายในเซลล์เริ่มทำงาน เพราะฉะนั้น ขบานการงอกของเมล็ดพันธุ์จึงเกี่ยวข้องกับขบวนการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ ขบวนการย่อยสลาย และขบวนการลำเลียงสารอาหารที่เก็บสะสมไว้ นำไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอให้สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่ปกติ ซึ่งขบวนการต่างๆสามารถอธิบายได้ดังนี้

1. การสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ สารที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ได้แก่ เอนไซม์ DNA และ RNA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนจะถูกชักนำในการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นด้วยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้มาจาก 2 แหล่งคือ เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นขณะเมล็ดกำลังเจริญเติบโตจะถูกกระตุ้นให้ทำงาน เนื่องจากการเข้าไปของน้ำ เช่น amylopectin และ glucocidase เอนไซม์ 2 ตัวนี้จะปรากฏขึ้นทันทีหลังจากเมล็ดพันธุ์ดูดน้ำ แหล่งที่สองได้จากการเริ่มสังเคราะห์ขึ้นใหม่ โดยผ่านการควบคุมของกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ที่เรียกว่า *de novo* syntersis โดยพบในเซลล์อะลิวโรน (aleulone) ใน

เมล็ดข้าวบาเลย์ เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้น ได้แก่ amylase, ribonuclease, protease และ lipase เป็นต้น พลังงานที่ต้องใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ ได้มาจาก ATP ซึ่งผลิตในไมโทคอนเดรียที่ตื่นตัวภายหลังจากเมล็ดได้รับน้ำเข้ามา การทำงานของไมโทคอนเดรียในการผลิต ATP ทำให้เมล็ดพันธุ์มีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับสภาพที่เมล็ดยังไม่งอก

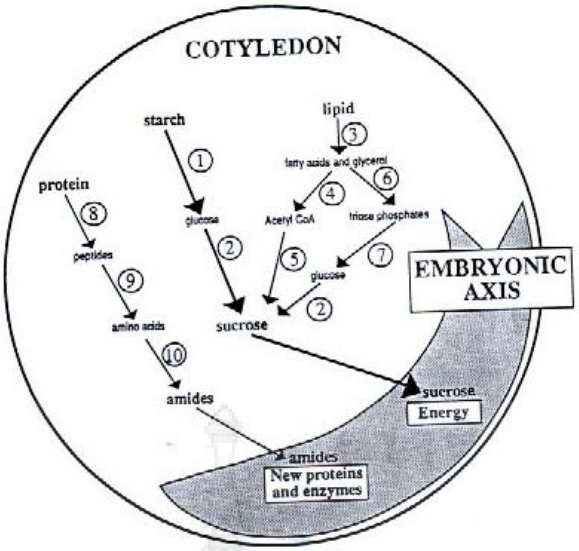
2. การย่อยสลายสารอาหารที่สะสมในเมล็ดพันธุ์ สารอาหารที่เมล็ดพันธุ์เก็บสะสมไว้ในส่วนเนื้อเยื่อสะสมอาหาร ได้แก่ คาร์โบไฮเดรท โปรตีน และไขมัน จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมา คาร์โบไฮเดรทจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ hydrolase เช่น amylase และ phosphorylase จากรูปน้ำตาลที่ละลายไม่ได้เป็นรูปน้ำตาลที่ละลายได้ โปรตีนถูกย่อยโดยเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมาใหม่ในระหว่างการงอกของเมล็ดพันธุ์ ได้กรดอะมิโน ส่วนการย่อยสลายไขมัน จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ lipase ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล การย่อยสลายอาหารที่เก็บสะสมไว้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่แตกต่างกันดังนี้

1) <u>พืชใบเลี้ยงเดี่ยว</u> เก็บสะสมอาหารไว้ในเอนโดสเปิร์ม ได้แก่ แป้ง และโปรตีน ซึ่งเก็บสะสมไว้ในรูปน้ำตาลที่ละลายได้ และเปปไทด์ (peptides) ตามลำดับ ถูกเคลื่อนย้ายไปยังเอ็มบริโอเพื่อสร้างพลังงานและสร้างเอนไซม์เพื่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน



รูปที่ 2.1 การย่อยสลายอาหารที่เก็บสะสมในพืชใบเลี้ยงคู่
ที่มา : Copeland and McDonald, 1995

2) <u>พืชใบเลี้ยงคู่</u> เก็บสะสมอาหารไว้ในใบเลี้ยง (cotyledon) มี 3 ชนิด คือ ลิปิด แป้ง และโปรตีน ลิปิดและแป้งถูกย่อยสลายที่ใบเลี้ยงจนได้เป็นน้ำตาลซูโครส (sucrose) ส่วนโปรตีนจะถูกย่อยสลายกลายเป็นเอไมด์ (amides) ทั้งน้ำตาลซูโครสและเอไมด์ เมื่อถูกย่อยให้มีอนุภาคเล็กลงก็จะเคลื่อนย้ายเพื่อเป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนต่อไป



รูปที่ 2.2 การย่อยสลายอาหารที่เก็บสะสมในพืชใบเลี้ยงคู่
ที่มา : Copeland and McDonald, 1995

ในขั้นตอนนี้ การดูดน้ำและการหายใจจะเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ สำหรับการหายใจซึ่งต้องใช้ออกซิเจน ถ้าหากมีการย่อยไขมันและน้ำมัน จะใช้ออกซิเจนสูงกว่าปกติ

3. การลำเลียงอาหารที่เก็บสะสม ดังนี้

1) <u>คาร์โบไฮเดรท</u> การลำเลียงอาหารสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรทจากที่เคยอยู่ในรูปของน้ำตาลที่ละลายไม่ได้ จะถูกย่อยให้อยู่ในรูปของน้ำตาลที่ละลายได้ ซึ่งเป็นรูปที่สามารถลำเลียงได้

2) <u>โปรตีน</u> จะลำเลียงในรูปของสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายได้ เช่น amino acid โดย amino acid จะถูกลำเลียงไปที่เอ็มบริโอ เพื่อเป็นวัตถุดิบในการสร้างโปรตีนใหม่ ในส่วนที่มีการเจริญเติบโต

3) <u>ลิปิด</u> จะถูกลำเลียงในรูปของกรดไขมันและกลีเซอรอล บางส่วนจะถูกลำเลียงไปเป็นวัตถุดิบในการสร้างสารพวก phospholipid และ glycolipid เพื่อสร้างเมมเบรนของออร์แกเนลล์ และเซลล์ที่จะเกิดขึ้นใหม่

4. การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ ในขณะที่เอ็มบริโอมีการเจริญเติบโต น้ำหนักของต้นอ่อนจะเพิ่มมากขึ้น ส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อสะสมอาหารจะลดลง และการหายใจจะเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อของต้นอ่อน ขณะเดียวกัน ขบวนการเมแทบอลิซึมที่เนื้อเยื่อสะสมอาหารจะลดลง ยกเว้นในส่วนของใบเลี้ยงซึ่งจะทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงได้ ต่อมาจะมีการยืดตัวและการเจริญเติบโตของยอดอ่อนเกิดเป็นใบแรก (primary leaf) และแกนกลางของเอ็มบริโอ ส่วนใต้ใบเลี้ยงจะเติบโตไปเป็นลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ส่วนเหนือใบเลี้ยงจะเจริญเป็นลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) จากนั้น ต้นอ่อนก็จะเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าปกติ

2.1.4 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในระหว่างการงอกของเมล็ด

เมื่อเมล็ดได้รับปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการงอก เมล็ดจะมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ มีขั้นตอนดังนี้

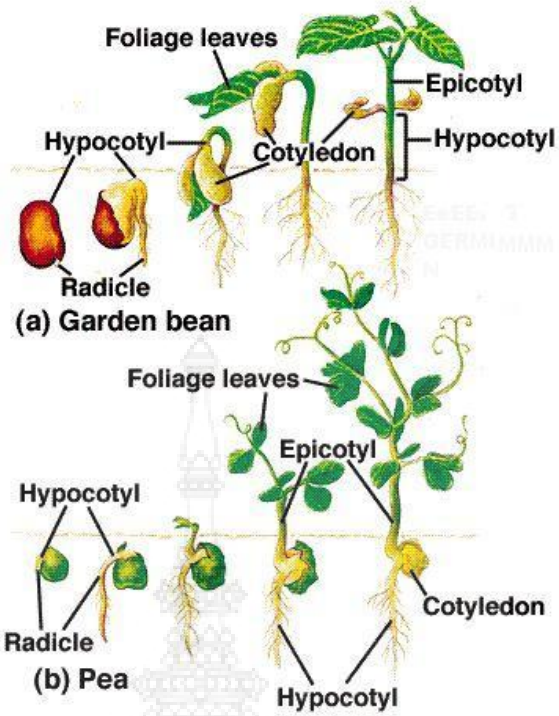
1. เมล็ดพองโต โดยทั่วไปเมล็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่ เมล็ดจะแข็ง เนื่องจากภายในเมล็ดมีความชื้นต่ำมาก เมื่อเมล็ดได้รับน้ำเข้าไปโดยผ่านช่องเปิดธรรมชาติที่มีอยู่ เช่น ไฮลัม (hilum) หรือบาดแผลที่เกิดขึ้นที่บริเวณเปลือกเมล็ด เป็นต้น จะทำให้เมล็ดขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเปลือกเมล็ดมีลักษณะอ่อนนุ่ม

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

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

2.1.5 ลักษณะการงอกของเมล็ดพันธุ์ มี 2 แบบ ดังนี้

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



รูปที่ 2.3 แสดงการงอกแบบ a) epigeal germination และแบบ b) hypogeal germination

(ที่มา : http://hayatihidup.blogspot.com/2011/08/germination.html)

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

2.1.6 กลไกควบคุมการงอกของเมล็ดพันธุ์

เมื่อเมล็ดพันธุ์แก่เต็มที่ จะมีกลไกในการควบคุมการงอกซึ่งเมล็ดจะสร้างขึ้นมาเพื่อให้สอดคล้องกับสภาวะแวดล้อมและฤดูกาลในธรรมชาติเพื่อความอยู่รอดของต้นอ่อน การควบคุมการงอกของเมล็ดพันธุ์โดยส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นโดยการลดความชื้นภายในเมล็ดลงเมื่อเมล็ดมีการสุกแก่เต็มที่ จึงทำให้เมล็ดพันธุ์ขาดปัจจัยที่สำคัญในการงอกไป นั่นก็คือน้ำ สำหรับโครงสร้างที่ทำหน้าที่ควบคุมน้ำและอากาศที่จะเข้าไปในเมล็ดพันธุ์ก็คือ เปลือกเมล็ด เมล็ดพันธุ์บางชนิดถึงแม้ว่าจะมีปริมาณน้ำในเมล็ดมาก แต่ก็ไม่

สามารถงอกได้ เนื่องจากเมล็ดมีกลไกในการป้องกันการงอก เช่น ภายในเมล็ดอาจจะมีสารยับยั้งการงอกอยู่ นอกจากนี้ ยังมีเมล็ดพันธุ์หลายชนิดที่สามารถงอกได้ทั้งๆที่ยังไม่หลุดล่วงออกจากต้นแม่

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

กลไกที่ควบคุมการงอกที่สำคัญอีกแบบคือการพักตัวของเมล็ดถึงแม้ว่าจะมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและมีปัจจัยสนับสนุนการงอกครบ แต่เมล็ดก็ไม่สามารถงอกได้ ซึ่งจะเกิดผลดีต่อเมล็ดคือทำให้เมล็ดงอกได้ในถิ่นที่เหมาะสมต่อความอยู่รอดของต้นอ่อน และการพักตัวจะจำกัดไม่ให้เมล็ดงอกในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน เช่นในฤดูที่มีอุณหภูมิสูงเกินไป มีความชื้นไม่เพียงพอ หรือมีช่วงฤดูฝนที่สั้นเกินไป

2.1.7 บทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์

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

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

รูปที่ 2.4 เมื่อเอ็มบริโอของเมล็ดพันธุ์ข้าวบาเลย์ดูดน้ำเข้าไป GA จากเอ็มบริโอจะถูกส่งไปกระตุ้นเนื้อเยื่ออะลิวโรน สร้างเอนไซม์ และปลดปล่อยออกมาย่อยอาหารสะสมในเอนโดสเปิร์ม

2.1.8 การเจริญเติบโตของพืช

การเจริญเติบโตของพืชหมายถึงการเพิ่มขนาด จำนวน หรือการเพิ่มของน้ำหนักแห้งของต้นพืช และมีการเปลี่ยนแปลงอวัยวะต่างๆ ไปตามขั้นตอนของพืชนั้น ๆ การเจริญเติบโตเป็นผลมาจากกระบวนการที่สำคัญคือ การสังเคราะห์แสง การหายใจ

2.1.9 การวัดการเจริญเติบโตของพืช

การวัดการเจริญเติบโตของพืชสามารถวัดได้หลายวิธีได้แก่ความสูง จำนวนใบ ขนาดของใบ เส้นรอบวง มวล

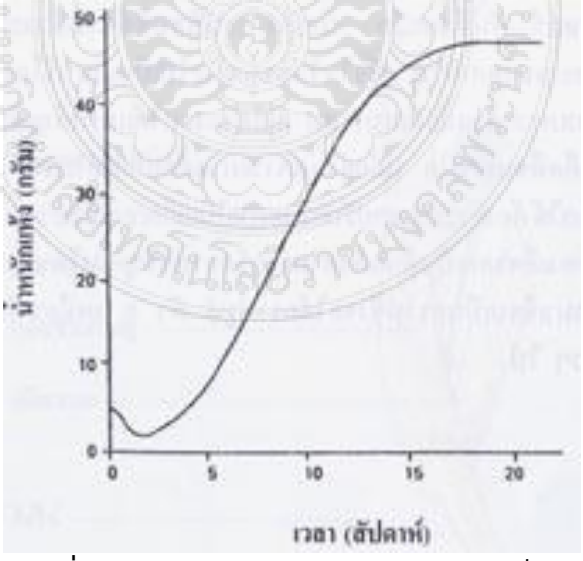
1. การวัดมวล หรือน้ำหนักสดของพืช เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด แต่ผลที่ได้ อาจไม่บ่งถึงการเพิ่มขึ้นของชีวมวลที่แท้จริงทั้งหมดเพราะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเกิดจากเซลล์เก็บสะสมน้ำไว้ในปริมาณมาก ๆ จนเซลล์เพิ่มขนาด

2. การชั่งน้ำหนักแห้งที่แท้จริง วิธีนี้ทำให้พืชตาย ดังนั้นพืชที่ใช้วัดจึงต้องปลูกจำนวนมาก แล้วสุ่มตัวอย่างมาเพียงบางส่วนเพื่อเป็นตัวแทนของพืชทั้งหมดในระยะเวลาต่าง ๆ กัน นำมาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น แล้วจึงสรุปได้ว่าพืชนั้นมีการเจริญเติบโต

3. การวัดความสูงของพืชเป็นวิธีที่นิยมใช้มากพืชบางชนิดมีความสูงจำกัด แต่กิ่ง ตา ดอก ผล และขนาดของลำต้นสามารถเพิ่มขึ้นได้อีก

นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ เช่น การนับจำนวนใบ การนับวงปี การวัดเส้นรอบวง การวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง เป็นต้น การเลือกวิธีการใดขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการวัด

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



รูปที่ 2.5 แสดงกราฟของการเจริญเติบโตเป็นรูปตัว S

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

2.1.10 หลักการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของพืช

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

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

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

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

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

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

ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรที่ใช้ในการคำนวณ ในการวิเคราะห์วิธี Conventional growth analysis

Derived Quantity	Symbol	Instantaneous Value	Formula for Mean Value over Time Interval (T_2-T_1)[b]	Unit
Relative growth rate	RGR, *R*	$1/W * dw/dt$	RGR = (ln *W2*-ln *W1*)/(*T2-T1*)	$W \cdot W^{-1} \cdot T^{-1}$
Leaf area ratio	LAR, *F*	LA/W	LAR = $(LA_2/W_2+LA_1/W_1)/2$	$A \cdot W^{-1}$
Specific leaf area	SLA	LA/LW	SLA = $(LA_2/W_2+LA_1/W_1)/2$	$A \cdot W^{-1}$
Specific leaf weight	SLW	Lw/LA	SLW = $(Lw_2/LA_2)+(Lw_1/LA_1)/2$	$W \cdot A^{-1}$

Net assimilation rate	NAR, *E*	*l/LA * dw/dt*	NAR = $(W_2-W_1)/(T_2-T_1)$ *.(ln LA_2- ln LA_1)/(LA_2-LA_1)	$W . A^{-1} . T^{-1}$
Leaf area index	LAI	*LA/P*	LAl = $(LA_2+LA_1)/2 * (1/G_A)$	dimensionless
Crop growth rate	CGR	*l/P * dw/dt*	CGR = $1/GA * (W_2-W_1)/(T_2-T_1)$	$W . A^{-1} . T^{-1}$
Leaf area duration	LAD	longivity	LAD = $(LA_2+LA_1)(T_2-T_1)/2$	*A . T*
(leaf area basis)		of leaf		
Leaf area index duration	LAID	longivity of LAI	LAID = $(LA_1+LA_2)(T_2-T_1)/2$	*T*
(leaf area index)				
Biomass duration	BMD	None	*BMD* = $[(W_2+W_1)/2] * (T_2-T_1)$	*W .T*

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

2.2 วัชพืชในนาข้าว

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

วัชพืชหมายถึงพืชที่เราไม่ต้องการหรือพืชที่ขึ้นผิดวัตถุประสงค์ เกษตรกรคุ้นเคยกับคำว่าหญ้า จึงเรียกคำนำหน้าวัชพืชว่าหญ้า เช่น หญ้าข้าวนก หญ้าขนหมู เป็นต้น ดังนั้นวัชพืชในนาข้าวจึงหมายถึงพืชอื่นที่ไม่ใช่ข้าวและขึ้นปะปนอยู่กับข้าว พืชมีอยู่ประมาณ 250,000 ชนิด (species) เป็นวัชพืชประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ หรือ 8,000 ชนิด และมีเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่จะมีโอกาสเป็นวัชพืชหลักที่ร้ายแรง และเป็นปัญหาต่อเกษตรกร ซึ่งก็เท่ากับจำนวนประมาณ 250 ชนิด เรียกว่าวัชพืชพวกนี้ว่า major weeds สำหรับในประเทศไทยแล้วนั้น ได้มีการสำรวจและจำแนกชนิดของวัชพืชที่ถูกจัดให้เป็นวัชพืชหลัก ซึ่งโดยสภาพทั่วไปแล้วอาจมีจำนวนประมาณกว่า 100 ชนิด เท่านั้น วัชพืชดังกล่าวเป็นพวกที่พบเสมอในท้องที่ต่าง ๆ แต่ในสภาพท้องถิ่นที่แตกต่างกันที่มีการเพาะปลูกแตกต่างกัน มีการระบาดของวัชพืชที่แตกต่างกัน อาจมีวัชพืชมากกว่าที่รายงาน โดยที่จะมีปัญหาที่แตกต่างกันไป วัชพืชบางชนิดแม้อาจยังไม่เป็นวัชพืชที่เป็นปัญหารุนแรงในการเกษตรในปัจจุบันก็ตามแต่ในอนาคตอาจเป็นวัชพืชหลักก็ได้

คุณสมบัติของวัชพืชที่ถูกจัดว่าเป็นวัชพืชร้ายแรง มีดังนี้

1 มีความสามารถในการเจริญเติบโตดีและรวดเร็ว
2. มีการขยายพันธุ์ แพร่พันธุ์รวดเร็ว มีประสิทธิภาพและมีจำนวนมาก
3. มีความทนทานและปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี
4. มีความสามารถในการแข่งขันสูง
5. มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมอย่างมาก
6. ยากต่อการควบคุม

2.2.2 จำแนกวัชพืช

การจำแนกวัชพืชนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบว่าวัชพืชชนิดนั้นชื่ออะไรจัดเป็นวัชพืชประเภทไหน เพื่อประโยชน์ในการวางแผนป้องกันกำจัดได้ถูกต้องตามหลักในการจำแนกพืชทั่วๆไปนั้นจำแนกพืชออกเป็นหมวดหมู่ตามลำดับคือ Phylum Class Order Family Genus Species ซึ่งนักพฤกษศาสตร์เป็นผู้จำแนกทำให้ได้**ชื่อวิทยาศาสาตร์**(Scientific name)ซึ่งประกอบด้วย Genus และ Species เป็นชื่อสากลที่ใช้กันทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีชื่อสามัญ (Common name) ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย โดยเฉพาะชื่อภาษาไทยนั้นเรียกชื่อแตกต่างไปตามท้องถิ่น เช่น แห้วหมู *(Cyperus rotundus)* อาจจะเรียกว่า หญ้าขนหมู หญ้าหัวจมหรือหญ้าแห้วหมูที่ทำให้เกิดความสับสนเพราะใช้คำนำหน้าว่า “หญ้า” แต่จริง ๆ แล้ว แห้วหมู จัดเป็นวัชพืชตระกูลกก ดังนั้น เพื่อสื่อความหมายให้ตรงกันควรจะเรียกชื่อให้ถูกต้องตามประเภทของวัชพืช

นอกจากจะจำแนกเพื่อได้ชื่อวิทยาศาสตร์แล้วยังมีการจำแนกวัชพืชออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้หลายแบบ เช่น จำแนกตามชีพจร เป็นวัชพืชปีเดียว (annual weed) และวัชพืชข้ามปี (perennial weed) จำแนกตามลักษณะทางพฤษศาสตร์ เป็น แอลจี มอส เฟิร์น วัชพืชใบเลี้ยงคู่ และวัชพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จำแนกตามรูปร่างลักษณะของใบ เป็นวัชพืชใบแคบและวัชพืชใบกว้าง เป็นต้น แต่การจำแนกตามลักษณะการควบคุมเพื่อประโยชน์ในการป้องกันกำจัด

โดยทั่วไปจะแบ่งวัชพืชออกเป็นประเภท ดังนี้

1. วัชพืชใบแคบ (narrowleaf weed) หรือ**วัชพืชตระกูลหญ้า** (Gramineae) บางครั้งอาจเรียกว่า วัชพืชใบแคบตระกูลหญ้า เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลำต้นกลมภายในกลวง มีข้อและปล้อง ใบจะแยกเป็นตัวใบและกาบใบ ตัวใบจะมีความกว้างและยาวแตกต่างกันมาก เส้นใบขนานกันไม่มีรากแก้ว เช่น หญ้าข้าวนก หญ้านกสีชมพู หญ้าดอกขาว หญ้าแดง

2. วัชพืชใบกว้าง (broadleaf weed) ส่วนใหญ่เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ลำต้นอาจมีกิ่งก้านสาขา ตัวใบจะมีความกว้างและยาวแตกต่างกันน้อย เส้นใบสานเป็นร่างแห มีรากแก้ว เช่น ผักปอดนา ผักบุ้งเทียนนา

3. วัชพืชตระกูลกก (sedge) ลักษณะคล้ายวัชพืชตระกูลหญ้า แต่ลำต้นไม่มีข้อไม่มีปล้อง ลำต้นมักเป็นรูปสามเหลี่ยมภายในตัน ใบไม่แยกเป็นกาบใบและแผ่นใบ ใบจัดเรียงตัวบนลำต้นเป็น 3 แถว เช่น กกทราย กกสามเหลี่ยม กกขนาก หนวดปลาดุก

4. วัชพืชประเภทเฟิร์น (fern) เป็นพืชชั้นต่ำ ไม่มีเมล็ด ขยายพันธุ์ด้วยส่วนของต้น และอับเรณู (spore) เช่น ผักแว่น ผักกูดนา

5. วัชพืชประเภทสาหร่าย (algae) เป็นพืชชั้นต่ำ มีรูปร่างอย่างง่ายๆ ประกอบด้วยเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์มาต่อกัน ราก ลำต้นและใบไม่มีความแตกต่างกัน เช่น สาหร่ายไฟ

ตารางที่ 2.2 แสดงรายชื่อวัชพืชที่สำคัญในนาข้าว ในแต่ละสภาพการทำนา

ชนิดวัชพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	สภาพการทำนาที่ชอบขึ้นแข่งขัน		
		นาหว่านข้าวแห้ง	นาดำ	นาหว่านน้ำตม
หญ้าข้าวนก	*Echinochloa crus-galli*		✓	✓
หญ้านกสีชมพู	*Echinochloa colona*	✓		✓
หญ้าดอกขาว	*Leptochloa chinensis*	✓		✓
หญ้าแดง	*Ischaemum rugosum*	✓		✓
หญ้าหางหมา	*Setaria geniculata*	✓		
หญ้ากุศลา	*Panicum cambomgiense*	✓		
ผักปอดนา	*Sphenoclea zeylanica*		✓	✓
ขาเขียด	*Monochoria vaginalis*		✓	✓
ผักตับเต่า	*Mimulus orbicularis*		✓	
ผักปราบนา	*Cyanotis oxillaris*	✓		
ผักบุ้ง	*Ipomoea aquatica*	✓		
เซ่งใบยาว	*Pentapetes phoenicea*	✓		
เซ่งใบมน	*Melochia corchorifolia*	✓		
โสน	*Aeshynomene spp.*	✓		
เทียนนา	*Jussiaea linifolia*		✓	
กกทราย	*Cyperus iria*	✓	✓	✓
กกขนาก	*Cyperus difformis*	✓	✓	✓
หนวดปลาดุก	*Fimbristylis miliacea*	✓	✓	✓
ผักแว่น	*Marsilea crenata*		✓	✓
สาหร่ายไฟ	*Chara zeylanica*		✓	

2.2.3 หญ้าข้าวนก

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Echinochloa crus-galli* (L.) T. Beauv.

ชื่อสามัญ barnyard grass

ชื่ออื่น หญ้าคอมมิวนิสต์, หญ้าพุ่มพวง

ชีพจักร หญ้า/อายุปีเดียว

ข้าวนกเป็นวัชพืชใบแคบ (narrowleaf weed) หรือวัชพืชตระกูลหญ้า (Gramineae) บางครั้งอาจเรียกว่า วัชพืชใบแคบตระกูลหญ้า เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลำต้นกลมภายในกลวง มีข้อและปล้อง ใบจะแยกเป็นตัวใบและกาบใบ ตัวใบจะมีความกว้างและยาวแตกต่างกันมาก เส้นใบขนานกัน ไม่มีรากแก้ว (วัชพืชในนาข้าวและการจัดการ, พีรพล รัตนะ)

ใบอ่อนจะเป็นคลื่นสีเขียวอ่อนถึงสีเขียว เส้นใบสีเขียวอ่อน ใบจะยาวกว่าใบข้าว ดอกเป็นช่อออกดอกได้ตลอดปีเมื่ออายุ 2-3 เดือน ชอบขึ้นในสภาพดินชื้นแฉะความชื้นตั้งแต่ 50 % สามารถงอกใต้น้ำได้ลึก 1-2 เซนติเมตร การขังน้ำไว้ประมาณ 3-7 วัน จะสามารถทำลายการพักตัวของเมล็ดได้ เจริญเติบโตได้ดีในสภาพน้ำขัง

อายุปีเดียว ความสูงประมาณ 120 ซม. รอยต่อระหว่างใบและกาบใบไม่มี ligule ระยะเจริญเติบโตดูคล้ายข้าวมาก เมล็ดงอกพร้อมข้าว ชอบขึ้นในที่ชื้นแฉะความชื้น 75-95% งอกได้ 80 % ความชื้น 50% งอกได้ 75% สามารถงอกได้ในน้ำขังลึก 1-2 ซม. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการงอกคือ 20-30 องศาเซลเซียส pH ที่สามารถงอกได้คือ 4.6-8.4 ออกซิเจน 20% งอกได้ถึง 99% แต่ออกซิเจนต่ำกว่า 1 % ไม่สามารถงอกได้ สามารถงอกได้ที่ความลึก 2-4 ซม. เมล็ดที่ถูกแช่น้ำนาน 3 เดือน จะงอกได้เพียง 1 % แต่เมล็ดที่ถูกฝังในดินนานถึง 30 เดือน ยังสามารถงอกได้ 20-67% ระบาดในนาหว่านน้ำตม แพร่กระจายโดยน้ำ สัตว์ และอุปกรณ์การเกษตร เมล็ดอาจพักตัวนาน 3-4 เดือน (ประสาน, 2540) ผลิตเมล็ดได้สูง 500-20,000 เมล็ด/กอความหนาแน่นเพียง 5 ต้น/ตร.ม. อาจทำให้ผลผลิตข้าวลด 60% (อัมพร, 2540)

2.2.4 การแก่งแย่งแข่งขันของวัชพืชกับพืชปลูก

การแก่งแย่งแข่งขัน (competition) ของวัชพืชกับพืชปลูก เป็นสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตของพืชปลูกลดลงทั้งนี้เพราะวัชพืชก็เหมือนพืชปลูกคือมีความต้องการปัจจัยที่ใช้ในการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน ได้แก่ธาตุอาหาร น้ำ และแสงแดด เมื่อมีวัชพืชขึ้นแก่งแย่งแข่งขัน พืชปลูกได้รับปัจจัยในการเจริญเติบโตไม่เต็มที่ เพราะถูกวัชพืชแย่งบางส่วนไป

ความสามารถในการแก่งแย่งแข่งขันของวัชพืชกับพืชปลูกนั้น โดยทั่วไปแล้ว ในสภาพธรรมชาติวัชพืชจะมีโอกาสและความสามารถในการแข่งขันได้ดีกว่าพืชปลูก ทั้งนี้เพราะวัชพืชมีการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดมาช้านาน และวัชพืชมักจะมีจำนวนและความหนาแน่นสูง

ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงในการแข่งขันของวัชพืชกับพืชปลูก คือ

1. ชนิดของวัชพืช
2. ชนิดของพืชปลูก
3. ปริมาณความหนาแน่นของวัชพืช
4. ช่วงเวลาในการแข่งขันของวัชพืช
5. ปัจจัยภายนอก เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ความชื้น แสงแดด อุณหภูมิ ฤดูปลูกและการจัดการ

2.2.5 ผลเสียหายที่เกิดจากวัชพืช

วัชพืชที่ขึ้นแข่งขันกับพืชปลูกนั้น เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้พืชปลูกได้รับความเสียหายทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังนี้

1. **วัชพืชทำให้ผลผลิตของพืชปลูกลดลง** เนื่องจากวัชพืชแก่งแย่ง ปัจจัยในการเจริญเติบโตของพืชปลูก เช่น น้ำ ธาตุอาหาร และแสงแดด ทำให้พืชปลูกได้รับไม่เต็มที่ ผลผลิตก็ลดลงแต่จะลดลงมากน้อยขนาดไหนขึ้นกับชนิดของพืชปลูก ชนิดของวัชพืชและสภาพแวดล้อม

2. **วัชพืชทำให้คุณภาพของผลผลิตลดลง** ถ้ามีเมล็ดหรือเศษวัชพืชเจือปน จะทำให้ขายผลผลิตได้ราคาต่ำลง นอกจากนี้การปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ ถ้ามีเมล็ดวัชพืชเจือปนเกินกำหนดก็จะไม่ผ่านมาตรฐาน

3. **วัชพืชเป็นที่อาศัยของโรคแมลงและสัตว์ศัตรูพืช** สภาพแปลงปลูกพืชที่มีวัชพืชขึ้นแข่งขันรกรุงรัง อาจทำให้พืชปลูกได้รับผลกระทบทางอ้อม โดยเป็นแหล่งอาศัยของโรค แมลงและสัตว์ศัตรูข้าว ซึ่งจะทำให้เกิดอันตรายแก่พืชปลูก และต้องเพิ่มต้นทุนในการป้องกันกำจัดศัตรูข้าวเหล่านั้นด้วย

4. **วัชพืชทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการแปลงและเก็บเกี่ยว** ถ้ามีวัชพืชขึ้นรกรุงรังเป็นจำนวนมาก ทำให้การเตรียมแปลงลำบาก การจัดการน้ำไม่มีประสิทธิภาพ การเก็บเกี่ยวไม่สะดวก เกิดความล่าช้า

2.2.6 หลักการป้องกันกำจัดวัชพืช

หลักการการป้องกันกำจัดวัชพืชมี 3 อย่าง ดังนี้

1. การป้องกัน (prevention)

เป็นการป้องกันไม่ให้วัชพืชจากที่อื่นแพร่ระบาดเข้ามาในพื้นที่หนึ่งๆ ซึ่งอาจเป็นแปลงปลูกพืชในตำบล อำเภอ จังหวัด ภาค หรือประเทศ ส่วนขยายพันธุ์ของวัชพืชที่สามารถแพร่กระจายจากที่หนึ่งไปยังที่หนึ่งก็ คือ เมล็ด และส่วนขยายพันธุ์อื่นๆ เช่น ราก เหง้า หัว ไหล และลำต้น ส่วนต่าง ๆ เหล่านี้จะมีการแพร่กระจายออกเมื่อมีอายุแก่ และลักษณะพิเศษที่ช่วยในการมีชีวิตอยู่ที่ยาวนาน ตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดดีขึ้น ก็คือ มนุษย์ สัตว์ ลมและน้ำ

2. การควบคุม (control)

การควบคุมเป็นการกระทำที่ลดการรบกวนแก่งแย่งแข่งขันของวัชพืชในการปลูกพืชหรืออีกนัยหนึ่งก็คือ การลดผลเสียหายของวัชพืชที่เกิดแก่พืชปลูกให้น้อยที่สุด ปริมาณการควบคุม จะต้องพิจารณาถึงราคาต้นทุน และปริมาณความเสียหายที่เกิดขึ้น ซึ่งในบางกรณีอาจไม่จำเป็นต้องควบคุมให้สมบูรณ์ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ทำเพียงระดับที่เหมาะสมที่สุดเท่านั้น

3. การทำลาย (eradication)

เป็นการทำลายให้หมดสิ้น ซึ่งหมายถึงการทำให้ส่วนต่าง ๆ ของวัชพืชพวกลำต้น ใบดอก ราก เมล็ด และส่วนขยายพันธุ์อื่น ๆ หมดสิ้นไปในพื้นที่นั้น ๆ อย่างสิ้นเชิง การทำลายวัชพืชให้หมดสิ้น

ไปจากพื้นที่ก็เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่กระจายไปที่อื่น และป้องกันการเพิ่มขยายพันธุ์ในพื้นที่เดิมด้วย วิธีการทำลายอาจกระทำได้หลายแบบ เช่น การใช้เครื่องจักรกล การใช้สารเคมี ตลอดจนการเขตกรรมด้วยวิธีการต่างๆ

2.2.7 วิธีการป้องกันกำจัดวัชพืช

เมื่อมีวัชพืชขึ้นแข่งขันในแปลงปลูกพืช จำเป็นต้องหาทางป้องกันกำจัดเพื่อลดการแก่งแย่งแข่งขัน หรือลดปริมาณให้อยู่ในระดับต่ำกว่า จุดวิกฤต โดยไม่จำเป็นต้องควบคุมให้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ก็ได้ เพราะอาจจะไม่คุ้มทุน วิธีป้องกันกำจัดวัชพืชมีหลายวิธี ซึ่งอาจจะมีข้อดีข้อเสีย ตลอดจนข้อจำกัดแตกต่างกันไป ต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับสถานการณ์

1. **การป้องกันกำจัดโดยวิธีกล** (Mechanical control) เป็นการกำจัดวัชพืชโดยใช้แรงงานคน แรงงานสัตว์ การใช้เครื่องทุนแรง การใช้ไฟเผาและการใช้วัสดุคลุมดิน

2. **การป้องกันกำจัดโดยวิธีเขตกรรม** (cultural control) เป็นการปฏิบัติเพื่อลดปัญหาการแข่งขันจากวัชพืช เช่น การจัดการน้ำ การปลูกพืชคลุมดิน การปลูกพืชหมุนเวียน การปลูกพืชแซมและการจัดการปุ๋ย

3. **การป้องกันกำจัดโดยชีววิธี** (Biological control) เป็นการใช้สิ่งมีชีวิตมาควบคุมวัชพืช เช่น แมลง โรคพืช และสัตว์

4. **การป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมี** (Chemical control) เป็นการใช้สารเคมีมาควบคุมวัชพืช หรือที่เรียกว่า สารกำจัดวัชพืช (herbicide) ปัจจุบันมีการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง สะดวก รวดเร็ว แต่ต้องใช้ให้ถูกวิธีจึงจะได้ผลดี และไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ และสภาพแวดล้อม

5. **การป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน** (Integrated control) การป้องกันกำจัดวัชพืชโดยวิธีใดวิธีหนึ่ง อาจจะไม่สามารถแก้ปัญหาวัชพืชได้อย่างสมบูรณ์ หรือคุ้มค่า เพราะแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียและข้อจำกัดแตกต่างกัน ถ้านำหลายวิธีมาผสมผสานกันอย่างสอดคล้องเหมาะสม จะทำให้การกำจัดวัชพืชได้ผลดีและมีประสิทธิภาพการที่จะเลือกวิธีการใดมาใช้ร่วมกันต้องคำนึงถึงสภาพพื้นที่ ความพร้อมของผู้ใช้ ง่ายต่อการปฏิบัติตลอดจนสภาพทางเศรษฐกิจและสังคม ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงจุดวิกฤตที่จำเป็นต้องกำจัดวัชพืชด้วย (อาทิตย์ กุคำอู และพิสิฐ พรหมนารท. 2545)

2.3 พืช

พืชที่นำมาใช้ในการวิจัยคือ มะเดื่อ ข้อมูลอนุกรมวิธานที่สำคัญของพืชประกอบด้วยชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อวงศ์ ชื่อพื้นเมือง ลักษณะทั่วไป ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และประโยชน์ดังนี้

http://www.bloggang.com/

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

1. ชื่อ มะเดื่อ

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

3. ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus hispida* Linn. f.

4. วงศ์ MORACEAE

5. แหล่งที่พบ พบทุกภาคของประเทศ

6. ประเภทไม้ ไม้ยืนต้น

7. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น ไม้ยืนต้นขนาดกลางสูงประมาณ 5-10 เมตร ลำต้นเดี่ยวตั้งตรงเปลือกหนา กิ่งแขนงแตกเป็นพุ่มทรงกลมทั้งต้น มีน้ำยางสีขาว ลำต้นมีรอยควั่นเป็นปล้องหรือเป็นข้อๆ คล้ายข้อไม้ไผ่ตลอดจนถึงกิ่ง ใบ ใบเดี่ยวออกตรงข้ามกัน รูปไข่แกมขอบขนานหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ ผิวสากหนืดมือคล้ายใบย่อยมีขนนาบกับแผ่นใบสีเขียวสด

ดอก มีสีเหลืองแกมเขียว ออกช่อกระจุกแน่น เจริญอยู่ในฐานรองดอกกลมกลวงเหมือนลูกแพร์แกมรูปไข่กลับกว้าง 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.)

2.4 การเตรียมพืช

การเตรียมพืช (Preparation of Medicinal plants) ประกอบด้วยการคัดเลือกพืช การเก็บตัวอย่างพืช การเก็บส่วนต่างๆ ของพืช การเตรียมพืช การทำให้สมุนไพรมีขนาดเล็ดลง (http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri02/lesson.htm)

2.4.1 การคัดเลือกพืช

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

2.4.2 การเก็บตัวอย่างพืช รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 59-60) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. พืชที่จะนำมาสกัด ต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง เพราะพืชหลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันหรือมีชื่อพ้องกัน โดยเฉพาะพืชที่หายากและขาดแคลน ต้องตรวจสอบอย่างรอบครอบ

2. การเลือกเก็บพืชที่สมบูรณ์ มีอายุตามชนิดของพืช สามารถออกดอกออกผลที่มีจำนวนมากพอ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มากพอดังนี้

2.1 รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโตหากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย

2.2 เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่พืชเจริญเติบโตเติมที่

2.3 ใบและดอก เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน

2.4 ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร

2.5 ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือเมื่อสุกเต็มที่ ตามชนิดของพืช

2.6 เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก

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

4. วิธีการเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสมต่อการนำไปแยกสกัดสาร พืชบางชนิดต้องสกัดสด หรือบางชนิดต้องสกัดแห้ง

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

6. ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าและผลิตภัณฑ์ ต้องระวัง สิ่งปลอมปน การใช้ชื่ออื่นมาอ้าง และชื่อพ้องกัน

7. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วต้องการทำตัวอย่างแห้ง ต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์

2.4.3 การเตรียมตัวอย่างพืช

1. การเตรียมตัวอย่างแบบสด พืชสดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง

2. การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง เป็นการป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

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

4. พืชแห้งควรเก็บในที่แห้ง มืด เย็น และมีอากาศหมุนเวียนและหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน

2.4.4 การทำให้สมุนไพรตัวอย่างมีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

การย่อยพืชให้มีขนาดเล็กลง

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

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

2. พืชสดทำได้โดยการหั่น (slicing) โดยใช้มีด หรือพืชที่แช่ในแอลกอฮอล์อาจใช้เครื่องปั่น (waring blender) เป็นต้น

นอกจากนี้อาจทำการย่อยเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เอนไซม์ (enzyme disintegration) หรือโดยใช้สารเคมี (chemical disintegration)

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

4. การย่อยสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากจนเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์แตกมากเกินไป ซึ่งบางครั้งทำให้สารสกัดขุ่น ขนาดของผงพืชที่เหมาะสมหาได้จากการทดลองซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบสำคัญสูงสุด

2.5 การสกัดสารจากพืช

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)

ในการสกัดสารจากพืชนั้นมีข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์ การเลือกตัวทำละลาย การเลือกวิธีการสกัด วิธีการสกัด และการทำสารสกัด ให้เข้มข้น

2.5.1 สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์

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

1. ความไมชอบน้ำ (hydrophobicity) หรือ ความชอบน้ำ (hydrophilicity)

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

2. pKa

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

3. ความคงตัวตอความรอน

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

4. ขนาดโมเลกุล

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

5. สเตอริโอเคมี

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

โดยทั่วไปสามารถแบงไอโซเมอร (isomer) ออกเปนหลายชนิดดังแผนภาพที่ 1 นอกจากนี้ยังสามารถแบง stereoisomer ออกเปน 2 ชนิด คือ enantiomer และ diastereomer โดยที่ enantiomer คือ โมเลกุลที่เปนภาพกระจกเงา (mirror image) ซึ่งกันและกัน เนื่องจาก enantiomer ทั้งสองมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ เหมือนกัน ดังนั้นจึงไมสามารถแยก enantiomer ออกจากกันดวยวัฏภาคคงที่ชนิด conventional reversed-phase stationary phase ได สำหรับ diastereomer ซึ่งโมเลกุลทั้งสองไมไดเปน ภาพกระจกเงาซึ่งกันและกันนั้น มีคุณสมบัติทาง เคมีและกายภาพแตกตางกันบาง จึงสามารถแยกออกจากกันดวย conventional stationary phase ได นอกจากนี้ยัง สามารถแบง diastereomer ออกเปน 2 กลุม คือ optically active isomer และ non-optically active geometric isomer โมเลกุลที่มี optical actiชนิดนี้ไมมีสมมาตร (symmetry) ภายในโมเลกุล ไมสามารถซอนทับ (superimpose) กับโมเลกุลที่เปนกระจกเงากันได โดยทั่วไป

โมเลกุลชนิดนี้จะมีหมูแทนที่โดยรอบ tetrahedral carbon atom ที่แตกตางกันทั้ง 4 หมู ซึ่ง chiral molecule ของ lactic acid ที่มี central stereogenic center จะไมมีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุล (internal symmetry plane) (รูปที่ 1) ดังนั้น lactic acid จึงมี chiral enantiomeric form 2 แบบ ในทางตรงกันขาม propanoic acid ซึ่งมีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุลจัดเปน achiral molecule ความแตกตางระหวาง enantiomer ทั้งสอง คือ มีปฏิกิริยากับ chiral molecule ชนิดอื่นไดแตกตางกัน และมี คุณสมมบัติทางกายภาพที่แตกตางกันดวย จึงเปนเหตุใหมี optical activity ในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ (plane polarized light) ไดแตก ตางกัน อยางไรก็ตาม enantiomer ทั้งสองยังคงมีคุณสมบัติบางอยางที่เหมือนกัน (identical) เชน จุดหลอมเหลว การละลาย และขอมูลทางสเปกโตรสโกปบางชนิด เปนตน ในปจจุบันนิยมแยก enantiomer ใหบริสุทธิ์ดวย HPLC นอกจากนี้การแยก chiral drug ในเชิงอุตสาหกรรมจะนิยมใช simulated moving bed (SMB) chromatography โดยการทำใหเกิด diastereomeric complex จากนั้นจึงแยกตอไปดวย conventional reversed-phase chromatography หรือคอลัมนที่บรรจุ immobilized chiral stationary phase (CSP)

2.5.2 การเลือกตัวทำละลาย

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 83-84) กล่าวถึงการเลือกตัวทำละลายสรุปได้ดังนี้

1. ความสามารถในการละลาย

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

2. ความคงตัว

ตัวทำละลายมีความคงตัว หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. การระเหย

ตัวทำละลาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4. สภาพของพืชที่นำมาสกัด

สภาพของพืชที่นำมาสกัด เช่นเมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.5.3 วิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 85-89) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. มาเซอเรชัน

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในตัวทำละลายที่เหมาะสม จะทำเป็นเวลานาน 7 วัน หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างที่หมักผงสมุนไพรอยู่นั้นควรเขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรอง แยกกาก (marc) ออกจากตัวทำละลาย วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายน้อย และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะสมกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย เมื่อสารในสุมนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจนสมบูรณ์

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

2. เพอร์โคเลชัน

เพอร์โคเลชัน (Percolation) เป็นการปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายสารสำคัญออกมาโดยใช้เครื่องเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) 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 และมีกลิ่นผิดไปจากธรรมชาติได้ จึงนำวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ต้นทุนการผลิตสูงกว่าวิธีการกลั่น

2.5.4 การเลือกวิธีการสกัด

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

1. ธรรมชาติของสมุนไพร โดยพิจารณาดังนี้

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

1.2 ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในตัวทำละลาย ถ้าละลายได้ง่ายใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้ยากใช้วิธีเพอร์เลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

1.3 ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด

หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีง่ายๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. ความต้องการการสกัด

หากต้องการสารสกัดเจือจาง ควรใช้ใช้วิธีมาเซอเรชัน แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2.5.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

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

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การระเหย

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

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ

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

3. การทำให้แห้ง

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

4. อัลตราฟิลเทรชั่น

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

2.6 สารออกฤทธิ์ในพืช

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

สารที่พบในพืชประกอบด้วย สารปฐมภูมิ (Primary Constituents) และสารทุติยภูมิ (Secondary Constituents) สารปฐมภูมิประกอบด้วยแป้ง โปรตีน ไขมัน เซลลูโลส ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารที่พืชสร้างจาก Intermedial basic metabolism มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ มีโครงสร้างง่ายๆ ไม่ซับซ้อน สารทุติยภูมิกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางเคมี (Chemotaxonomy Group) ประกอบด้วยแอลคาลอยด์ (Alkaloid) ไกลโคไซด์ (Glycoside) แทนนิน (Tannins) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) สเตอรอยด์ (Steroid) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) ยางไม้ (Gums) และอื่นๆ

1. แอลคาลอยด์

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

2. ไกลโคไซด์

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

3. แทนนิน

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

4. ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารมีสีเช่นสารสีแดง (carthamim) จากดอกคำฝอย สารสีเหลือง (luleolin) จากดอกสายน้ำผึ้ง

5. สเตอรอยด์

สเตอรอยด์เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมนและยาต้านอักเสบ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยา

6. เทอร์ปีนอยด์

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

7. น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย เป็นของเหลวมีกลิ่นหอมเฉพาะ ระเหยได้ในอุณหภูมิห้อง เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำหรือการบีบใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง และ สมุนไพร และใช้ขับลม ฆ่าเชื้อโรค

8. ยางไม้

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

9. สารอื่นๆ

ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เอ็นไซม์ วิตามิน เรซิน และบาลซัม

2.7 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืช

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

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหลานี้ไมจำเพาะเจาะจง และการใหผลบวกก็เปนเพียงการบอกถึงประเภทของสารผลิตภัณฑธรรมชาติบางชนิดเทานั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสรางคลายกันแต่เป็นสารตางกลุมกันจะใหผลบวกลวง ในอีกแงหนึ่งการใหผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเขมขนต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไมพอตอการตรวจสอบดวยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี ดังนี้

2.7.1 การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการเกิดตะกอน

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

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรต

ใช้ปฏิกิริยามอลลิช (Molisch's test) การเกิดวงแหวนสีมวงแดงที่รอยตอระหวางชั้นของเหลวกับ 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

อัลคาลอยเปนสารที่มีฤทธิ์เปนดางและมีไนโตรเจนเปนองคประกอบในโมเลกุล true alkaloids ตองมีไนโตรเจนอยูใน heterocyclic ring และมีสูตรโครงสรางทางเคมีที่ซับซอน สามารถตรวจสอบดวยน้ำยาทดสอบเบื้องตน เชน Dragendorff's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีแดงอิฐหรือสีสม Kraut's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีสมน้ำตาลแดง Marme's reagent (potassium cadmium iodide) เกิด ตะกอนสีขาว และ Hager's reagent (picric acid) เกิดตะกอนสีเหลือง ทั้งนี้สารที่ใชตรวจสอบอัลคาลอยด เชน Mayer reagent, Dragendorff reagent, Wagner reagent และ Ammonium reineckate จะให

ผลบวกลวงกับ coumarins, polyphenols, purines, amino acids, proteins และสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมักพบไดในสาร สกัดจากพืช ในทางตรงกันขามอัลคาลอยดไมทุกชนิดที่อาจพบไดในสารสกัดจากพืชจะใหผลบวกกับสารทดสอบเหลานี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสรางทางเคมี

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

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

1. Steroid nucleus ใชวิธี Liebermann-Burchard test ใหสีฟาหรือเขียว สารทดสอบตองแหงและปราศจากน้ำ

2. Unsaturated lactone ring ตรวจสอบดวย Kedde reagent หรือ Raymond reagent ใหสีมวง น้ำเงิน หรือ Baljet reagent ใหสีสม-แดง

3. Deoxy sugar ตรวจสอบดวย Killer-Kailiani test ใหวงแหวนสีมวงแดงที่รอยต่อระหวางชั้นของเหลว ทั้งนี้สารประกอบหลายชนิดในกลุม sesquiterpene lactones และ cardiacglycosides ที่มีโครงสราง เปน unsaturated lactones จะใหผลบวกกับการทดสอบดวย Kedde reagent, Baljet reagent และ Legal reagent

3.2 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์

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

3.3 กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

สารในกลุมนี้ประกอบดวยสวนของ aglycone ของanthraquinones และน้ำตาล ซึ่ง anthraquinones มีคุณสมบัติละลายไดดีในดาง แลวเกิดเปนสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึง ไฮโดรไลซ anthraquinone glycosides ดวยกรดหรือดาง หรือ $FeCl_3$ หรือ sodium dithionate ใหกลาย

เปน aglycone ของ anthraquinones แลวจึงสกัดออกมาดวยตัวทำละลายอินทรีย จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรียมาทดสอบกับดางจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกวา Borntrager test

3.4 กลุ่มไซยาโนจินิกส์ไกลโคไซด์

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

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

3.5 กลุ่มไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์

การตรวจหาไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์อาจตรวจในสภาพของไกลโคไซด์หรือตรวจหาผลิตภัณฑ์ของไกลโคไซด์จากการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (enzymic hydrolytic products) เช่น ตรวจหาน้ำตาลกลูโคสหรือหมู่ซัลเฟตหรือโมเลกุลของไอโซไทโอไซยาเนต

การตรวจหาในสภาพไกลโคไซด์จัดเป็นวิธีที่นิยมและง่ายต่อการตรวจหา โดยนำพืชที่ต้องการมาต้มในแอลกอฮอล์เดือด เพื่อขจัดฤทธิ์ของเอนไซม์ จากนั้นทำการสกัดพืชด้วยน้ำต้มเดือดหรือเอทานอลหรือเมทานอล หากพืชมีองค์ประกอบเป็นพวกไขมันมากควรกำจัดไขมันออก แล้วทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator) และแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ซึ่งมีอะลูมินา (alumina) เป็นตัวดูดซับหรือมี เรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบได้ (anion exchange resin) เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออน นำไกลโคไซด์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกในสารละลายผสมของแอลกอฮอล์และน้ำ จากนั้นศึกษาเอกลักษณ์ของไอ

โซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ด้วยเปเปอร์โครมาโทกราฟีหรือรงคเลขกระดาษ (paper chromatography) ในระบบตัวทำละลาย (solvent system) ของบิวทานอล-กรดแอซิติก- น้ำ (butanol-acetic acid-water) จากนั้นฉีดพ่นด้วย 0.2 โมลาร์ของ ซิลเวอร์ไนเทรต (silver nitrate) และอบให้แห้งด้วย 0.2 โมลาร์ของโพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) ถ้าหากเป็นไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์จะสังเกตเห็นจุดสีเหลือปรากฏขึ้นบนพื้นสีแดง

3.6 กลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์

ฟลาโวนอยดแบงออกเปน typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids การตรวจสอบสารในกลุมนี้ ทำไดดังนี้

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

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

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

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

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

6. การตรวจสอบโดยใชสารละลายกรดและดาง จะพบวาฟลาโวนอยดมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงสีไดตามสภาพความ เปนกรดหรือดาง หากเปนสารกลุม anthocyanins เมื่ออยูในสภาวะกรดจะใหสีแดง และในสภาวะดางจะใหสีมวง หรือน้ำเงิน หากเปนสารกลุม chalcones และ aurones เมื่ออยูในสภาวะกรดจะใหสีแดง และในสภาวะดางจะใหสี สมหรือแดง ทั้งนี้สารในกลุมฟลาโวนอยดจะใหผลบวกกับ Shinoda test และกรดซัลฟวริก ในขณะที่สารพวก polyphenols ชนิดอื่นก็สามารถใหผลบวกลวงกับสารทดสอบเหลานี้ดวย

4. กลุ่มคูมาริน

คูมารินเปนสารที่มีโครงสรางพื้นฐานเปน benzo-pyrone หรือ phenylpropanoid lactone หรือ benzopyran-2-one ตรวจสอบดวยการนำสารสกัดดวยแอลกอฮอลมาละลายในเอธานอลแลวกรอง จากนั้นนำไปชุบดวยกระดาษ กรอง แลวจึงหยดดวย 10% NaOH จะพบการเรืองแสงที่ long wave UV (365 nm)

5. กลุ่มแทนนิน

แทนนิน เปนสารจำพวก polyphenols แบงออกเปน 3 กลุม คือ 1). hydrolyzable tannins ที่โครงสรางทางเคมี ประกอบดวย phenolic acids และน้ำตาล เมื่อตมในกรดหรือใชเอนไซมจะกลายเปน กรดและน้ำตาล 2). condensed tannins มีโครงสรางเปน oligomer หรือ polymer ที่มี monomer เปน catechins (flavan-3-ol) ซึ่งอาจจัดเปน proanthocyanidins ของ flavonoids เมื่อนำไปตมกับกรดจะเกิดตะกอนสีแดงที่เรียกวา phloba phene จึงเรียกสารเหลานี้วา phlobatannins และ 3). pseudotannins เปนสารเชิงเดี่ยวมีขนาดโมเลกุลเล็ก แทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานและ ตกตะกอนอัลคาลอยดได จึงทำใหอัลคาลอยดหมดฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแทนนินอาศัยการเกิดตะกอนระหวาง แทนนินกับ gelatin, lead acetate, zinc acetate หรืออัลคาลอยด ไดดังนี้

1. การตรวจสอบดวย gelatin สารจำพวก true tannins จะเกิดตะกอนคงตัวกับ gelatin แตสารจำพวก pseudotannins จะเกิดตะกอนที่ไมคงตัว

2. การตรวจสอบดวย bromine water หากเปน condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine water

3. การตรวจสอบดวย $FeCl_3$ หากเปน hydrolyzable tannins จะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน ในขณะที่ condensed tannins จะเกิดตะกอนสีเขียว สำหรับสารอื่น ๆ ที่ประกอบดวย phenolic group เชน flavonoids และ coumarins จะเกิดสี เขียวหรือน้ำเงิน ในขณะที่สารพวก polyphenols อื่น ๆ จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลกับสารละลาย ferric chloride (5%) ในน้ำหรือเอธานอล

4. การตรวจสอบดวย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเขมขน พบวา condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. กลุ่มเทอร์พีนอยด์

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

2.7.2 การตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 77-79) กล่าวไว้สรุปได้ดังนี้

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

ตารางที่ 2.3 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

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

ตารางที่ 2.3 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
ซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	ไซโคลเฮกเซน : ไดเอทิลเอมีน (cyclohexane : diethylamine) 9:1 หรือ คลอโรฟอร์ม : โทลูอีน: คลอโรฟอร์ม :เมทานอล: น้ำ (chloroform :methanol :water) 64:50:10	วานิลลิน: กรดซัลฟิวริก (vanillin :sulphuric acid) ให้สีน้ำเงิน
แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquuinone glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene : chloroform) 9:11 หรือ โทลูอีน : แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene : acrtone :chloroform) 40:25:35 หรือ แอซีเทต : เมทานอล : น้ำ(ethyl acetate:methanol:water) 100:13.5:10	ปฏิกิริยาบอนเทรเกอร์ (Borntraeger reaction) แอนทราควิโนนให้สีแดงหรือเรืองแสงสีแดงเมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) 365 nm แอนโทรน (anthrone) ให้สีเหลืองหรือเรืองแสงสีเหลือง
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม :แอซีโทน : กรดฟอร์มิก (chloroform : acetone : formic acid) 75:16.5 :8.5 หรือ เอทิลแอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate : methanol:water) 100:13.5:10 หรือโทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene: chloroform) 9:11	เนเซอรัล โปรดักส์ (ไดฟีนิลโบริลออกซีเอทิลลามีน) -พอลีเอทิลีนไกลคอล) (natural products (dephenylboryloxyethylamine)-polyethylene glycol) แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) –ถ nm เรืองแสงสีเหลือง ส้ม หรือเขียว
คูมารินไกลโคไซด์ (coumarin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน :แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene :acetone: chloroform) 40 : 25:35 หรือ	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) หรือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

ตารางที่ 2.3 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	**ตัวดูดซับ (Adsorbent)**	**ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)**	**น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)**
		โทลูอีน:คลอโรฟอร์ม (toluene:chloroform) 9:11	(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
แทนนิน (tannin)	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (chloroform: methanol) 95:5 เอทิลแอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate:methanol :water) 77:15:8	กรดซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ให้สีแดง

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547 : 77-79

2.8 เทคนิคการแยกสารจากพืช

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

1. Solid phase extraction (SPE)

Solid phase extraction เป็นการแยกสารโดยให้สารที่สนใจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่สารที่ไม่สนใจหรือไม่ต้องการจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะสาร ที่สนใจให้ออกจากคอลัมน์ในภายหลัง โดยทั่วไปสารที่สนใจจะจับอยู่กับวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) ซึ่งเป็นสารดูดซับ (adsorbent) ที่มีรูปร่างเป็นเม็ดเล็ก (bead) หรือเรซิน (rasin) ซึ่งอาจเป็นnormal phase, reverse phase หรือ ion-exchange media ก็ได้ และสามารถบรรจุไว้ในคอลัมน์ได้ซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นไซริงค์ (syring) ตัวอย่างเช่น นำสารที่สกัดด้วยน้ำมาแยกด้วย SPE ที่มีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase พบว่าสารที่มีขั้วต่ำจะติดอยู่ในคอลัมน์แต่สารที่มีขั้วสูงจะถูกชะออกมาก่อน จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่มีขั้นต่ำชะสารที่ติดอยู่ในคอลัมน์ออกมา ซึ่งสารที่ถูกชะออกมานี้ค่อนข้างจะบริสุทธิ์ ในปัจจุบันได้มีการนำ SPEไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีขั้วต่ำ โดยสารที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำจะจับอยู่กับเรซินที่เป็น reverse phase การแยกสารโดยปรับความแรงของ eluting power ให้เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อชะสารออกมาเป็นลำดับตามความมีขั้ว ใช้ศึกษาความเหมือนกันของสารเนื่องจากสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันจะจับกับวัฏภาคคงที่ได้เหมือนกัน และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนกันอีกด้วย จึงช่วยในการจัดสินใจว่าสารสกัดหยาบที่แยกด้วย SPE มาแล้วจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่เคยแยกได้หรือไม่ นอกจากนี้ยังใช้ SPE เตรียมสารปริมาณมากให้บริสุทธิ์ขึ้น หรือนิยมใช้แยกสารสกัดหยาบก่อนที่จะแยกต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดอื่น ซึ่งการแยกในขั้นแรกด้วย SPE นี้เรียกว่า clean-up โดยจะแยกสารปนเปื้อนจำนวนมากออกไปจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สนใจ เช่น การใช้ SPEกำจัดสารที่มีขั้วจำนวนมากที่ไม่ต้องการและมีที่มาจาก buffer salt หรือส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ใช้SPE ในการเตรียมสารให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยผ่านสารละลายที่เจือจางลงไปในคอลัมน์ SPE จากนั้นชะสารที่ต้องการซึ่งติดค้างอยู่บนคอลัมน์ให้ออกมาโดยใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อยๆ นิยมใช้ SPE เพื่อเตรียมสารในปริมาณน้อยมาก เช่น เมแทบอไลท์ของยาในตัวอย่างเลือด สารปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในน้ำทะเล และสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ให้บริสุทธิ์มากขึ้น ก่อนนำไปแยกต่อไปด้วยเทคนิคอื่นทางโครมาโทกราฟี

2. Thin layer chromatography (TCL)

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

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

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

3. Column chromatography (CC)

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

การแยกสารตัวอย่างในคอลัมน์ออกเป็นแบนด์อาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีซึ่งหมายถึงการกระจาย (distribution) ของสารระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคคงที่ ดังสมการต่อไปนี้

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

ความสามารถในการแยกสารเกิดจากอันตรกิริยา (interaction) ของสารกับวัฏภาคคงที่และการแย่งกันจับกับวัฏภาคคงที่ระหว่างสารกับวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว และวัฏภาคเคลื่อนที่อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ ซึ่งจัดเป็น liquid chromatography (CL) และgas chromatography (GC) ตามลำดับ นิยมใช้ GC โดยเฉพาะ Gas-liquid chromatography (GLC)

ในงานวิเคราะห์แต่ไม่สามารถใช้เทคนิคนี้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายได้ทุกชนิด โดยทั่วไปสามารถแบ่ง LC ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ การแบ่งตามลักษณะทางกายภาพของระบบ ได้แก่ CC และ planar chromatography (TLC และ paper chromatography) สำหรับ countercurrent chromatography เป็นการแยกสารด้วยของเหลว 2 เฟสที่แบ่งออกเป็นวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ โครมาโทกราฟีส่วนมากมักบรรจุวัฏภาคคงที่ไว้ในคอลัมน์และมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว และการแบ่งตามลักษณะการแยกสารที่อาศัยแรงกระทำระหว่างโมเลกุล หรือลักษณะการแยกที่แตกต่างกัน เช่น การดูดซับ (adsorption) การแยกส่วน (partition) ประจุ (charge) ขนาด (size) และการจับกันของชีวโมเลกุล (biological affinity) เป็นต้น

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

การแยกส่วน (partition) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของสารที่อาศัยหลักการสกัดระหว่างของเหลวกับของเหลวโดยวัฏภาคคงที่เป็นของเหลวชนิดหนึ่งที่เคลือบอยู่บน solid support เช่น คอลัมน์ของ เซลลูโลสที่เคลือบด้วยน้ำ หรือ silica TLC plate ที่ดูดซับน้ำเอาไว้บนผิวหน้า ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เข้ากันไม่ได้กับของเหลวที่เป็นวัฏภาคคงที่ จึงทำให้เกิดการสกัดระหว่างขั้นของของเหลว (liquid-liquid extraction) ซึ่งเป็นข้อดีของการแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี อย่าไรก็ตามเทคนิคนี้ก็มีข้อเสียคือวัฏภาคคงที่ที่เป็นของเหลวจะถูกชะออกไปจากคอลัมน์พร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ และเกิดการละลายของวัฏภาคคงที่ได้

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

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

ประจุ (charge) สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดเมื่อมีการปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของสารละลายด้วยกรดหรือด่างอาจจะทำให้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นถูกเปลี่ยนแปลงไปให้อยู่ในรูปของไอออนบวกหรือลบได้ ดังนั้นจึงนำคุณสมบัติการแตกตัวเป็นไอออนนี้มาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ดังต่อไปนี้

3.1 Ion-exchange chromatography

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

3.2 Ion-pair chromatography / ion-suppression chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารที่สามารถแยกไอออนสารตัวอย่างได้ด้วยวัฏภาคคงที่มีขั้วต่ำ เช่น reverse phase modified partition column โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาค

เคลื่อนที่เพื่อลดการแตกตัวเป็นไอออนของโมเลกุลสารตัวอย่าง 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 ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออกจากเมแทบอไลท์ที่มีขนาดโมเลกุลเกล็กกว่ามาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากเมแทบอไลท์ทุติยภูมิมักมีขนาดโมเลกุลเล็กและมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียง กันมาก ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้ size exclusion chromatography ในการแยกสารเหล่านี้ ทั้งนี้ มีข้อยกเว้นสำหรับ Sephadex LH20 ที่ยังคงนิยมนำมาใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพราะมีข้อดีที่สามารถใช้กับวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ไม่ใช่น้ำ (nonaqueoese) ได้

การจับกันของสารชีวโมเลกุล (biological affinity) มีความสัมพันธ์กับเทคนิค affinity chromatography ซึ่งเป็นการแยกสารที่ขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจง(specific interaction) ของชีวโมเลกุล เช่น antibody-antigen interaction, enzyme-inhibitor interaction, DNA-DNA binding, DNA-protein interaction หรือ receptor –agonist/antagonist interaction

โดยที่ลิแกนด์ (ligand) หรือรีเซปเตอร์ (receptor) จะจับกับ packing material ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) และทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ ของผสมจะไหลผ่านคอลัมน์โมเลกุลที่มีความชอบจับอย่าจำเพาะเจาะจง (specific affinity) กับลิแกนด์จะถูกจับอยู่ในคอลัมน์ในขณะที่โมเลกุลอื่นที่ไม่มีความชอบจับอย่างจำเพาะเจาะจงจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ การชะสารทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและ/หรือองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ซึ่งจะทำให้แรงที่จับกันระหว่างสารตัวอย่างและลิแกนด์นั้นอ่อนลง โดยทั่วไปแล้วการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจะหมายรวมถึงการแยกสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นการแยกสารด้วยเทคนิคนี้จึงนับว่าเป็นแนวทางที่ดีในการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่อาศัยความจำเพาะเจาะจงทางชีวภาพ (biological specicity) อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกเมแทบอไลท์ทุติยภูมิในปริมาณมากด้วย affinity chromatography เนื่องจากเทคนิคนี้ทำได้ยากและต้องใช้เวลานานมากในการเตรียมลิแกนด์ที่เหมาะสมให้มีปริมาณเพียงพอต่อการแยกสารแต่ละครั้ง หากสารผสมเมื่อเริ่มต้นนั้นซับซ้อนเช่นในกรณีสารสกัดหยาบจากพืชหรือจุลินทรีย์ทีมักมีสารอื่นเข้ามารบกวนการแยกหรือขัดขวางการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์และลิแกนด์ (receptor –ligand interaction) หรือสารเหล่านี้เข้าไปดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับวัฏภาคคงที่ จะทำให้การแยกสารไม่สมบูรณ์ และยิ่งไปกว่านั้นการได้สารกลับคืนมา(recovery) จะขึ้นอยู่กับแรงที่จับกันอย่างผันกลับได้ ซึ่งการรบกวนของสารหลายชนิดอาจขัดขวางการได้สารกลับคืนมาด้วย

4. Gradient high performance liquid chromatography (Gradient HPLC)

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

ปัจจุบันจึงมักพบว่า HPLC-MS เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

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

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

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

วิมลพรรณ รุ่งพรหม และ สุปราณี แก้วกระจ่าง (2550) ศึกษาสารยับยั้งการงอกของเมล็ดวัชพืชจากรากลำเจียกในนาข้าวของไทย พบว่าสารสกัดเอทิลแอซีเตต ความเข้มข้น 10 mg/ml ของรากลำเจียก *Coix aquatica* Roxb แสดงผลการยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ได้ดี โดยมีเปอร์เซนต์การยับยั้งการงอกร้อยละ85 ผู้วิจัยจึงทำการแยกสารโดยใช้ฤทธิ์การยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบ เป็นตัวชี้นำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าเมื่อแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโทรกราฟี สามารถแยกสารได้ประกอบ 2 ชนิด เมื่อพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้โดยใช้เทคนิคทางสเปก

โทรสโกปี ได้แก่นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ และแมสเปกโทรเมทรี พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวคือ กรดพารา-เมทอกซีเบนโซอิก(p-methoxybenzoic acid, **1**) ไซลินดอล บี (cylindol B, **2**) สารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิด แสดงการยับยั้งการงอกของเมล็ดไมยราบยักษ์ ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยมีร้อยละของการยับยั้งเป็น 75 และ 80 ตามลำดับ

นราจันทร์ พิมเสน (2551) ศึกษาผลของสิ่งสกัดหยาบจากวัชพืชเขตร้อนบางชนิดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดไมยราบยักษ์ Mimosa pigra L. พบว่าสิ่งสกัดหยาบที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจากแห้วหมู หญ้างวงช้าง และพญามุตติแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าสิ่งสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอล การใช้สิ่งสกัดหยาบความเข้มข้นเทียบเท่าน้ำหนักแห้งของพืชทั้ง 3 ชนิด 1 กรัม พบว่าสิ่งสกัดหยาบจากพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการงอก 86 76 และ73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีการเจริญเติบโตของความยาวรากลดลงเท่ากับ 81 61 และ 35 เปอร์เซ็นต์ และความยาวต้นลดลงเท่ากับ 62 46 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผลการทดสอบทางแอลลิโลพาธิคของแห้วหมู หญ้างวงช้าง และพญามุตติ กับพืชปลูกบางชนิด ได้แก่ เมล็ดผักบุ้ง คะน้า กวางตุ้ง ข้าวโพด และวัชพืชอื่น ได้แก่ เมล็ดหงอนไก่ป่า ต้อยติ่ง หญ้าปากควาย และหญ้ารังนก ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 กรัมเทียบเท่าน้ำหนักแห้ง พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดหญ้าปากควาย หญ้ารังนก และหงอนไก่ป่า ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดต้อยติ่ง 47 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการงอกของเมล็ดผักบุ้ง และเมล็ดข้าวโพดเท่ากับ 35 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดคะน้า และกวางตุ้ง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

สุธีรดา ฉิมน้อย และคณะ (2551) ศึกษา**ประสิทธิภาพของใบประยงค์ผงต่อการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ พบว่า**การใช้ใบประยงค์แห้งบดเป็นผงปริมาณ 31.25 62.5 125มก./จานเพาะ มีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของถั่วผี โดยมีความงอก 100 95 และ 75% ตามลำดับ และมีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก โดยมีความงอก 75 50 และ 30% ตามลำดับ ในขณะที่ใบประยงค์แห้งบดเป็นผง 250 มก./จานเพาะ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของถั่วผีและหญ้าข้าวนกโดยสมบูรณ์

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

Hari Om, S.D และคณะ (2002) ศึกษาการตอบสนองอัลลิโลพาธิกของหญ้าPhalaris minor ต่อพืชและวัชพืชชนิดอื่นในระบบนิเวศข้าว-ข้าวสาลีโดยใช้ปุ๋ยพืชสดจากทานตะวันและโสน พบว่าปุ๋ยพืชสดจากทานตะวันและโสนสามารถลดจำนวนประชากรของหญ้า P.minor ได้ร้อยละ 100 ภายใต้การทดสอบในห้องปฏิบัติการ และร้อยละ 42 และร้อยละ 15 ตามลำดับในการทดสอบภาคสนาม แสดงให้เห็นถึงบทบาทของสารอัลลีโลเคมีในปุ๋ยพืชสดที่มีต่อการยับยั้งการเติบโตของวัชพืช อีกทั้งยังพบว่า การใช้ปุ๋ยพืชสดจากทานตะวันและโสนปรับปรุงดินก่อนการเพาะปลูกมีส่วนในการเพิ่มผลผลิตของข้าวอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบศักยภาพทางอัลลิโลพาธิกของวัชพืชใบกว้างต่อการยับยั้งการงอกของหญ้า P.minor พบว่า สาบเสือ (Chenopodium album) หญ้า Medicago denticulata และหญ้าชี้นแฉะ (Convolvulus arvensis)สามารถยับยั้งการงอก (ร้อยละ 100) ได้มากกว่า หญ้าVicia hirsuta (86 ร้อยละ) มากกว่า หญ้า Cirsium arvense (ร้อยละ 48) มากกว่า หญ้า Lathyrus aphaca (ร้อยละ38) และ หญ้า Rumex acetosella (ร้อยละ 9) ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าสารอัลลิโลพาธิกที่ถูกปลดปล่อยออกทางรากของข้าวสายพันธุ์ HKR 126,IR 64, Jaya และ Haryana Basmati-1 สามารถยับยั้งการงอกของหญ้า P.*minor* ได้ร้อยละ 50 อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีการเจือจางของสารสกัดทำให้ผลการตอบสนองอัลลิโลพาธิกลดลงอย่างมากในกลุ่มข้าวไม่หอมเมื่อเทียบกับกลุ่มข้าวหอม โดยเมื่อเปรียบเทียบข้าวสาลี11 พบว่าข้าวพันธุ์ WH533ให้ผลในการยับยั้งการงอกของหญ้า P.*minor* สูงสุด(ร้อยละ 30) ตามด้วยพันธุ์ WH542 (21 ร้อยละ)

R.C. Tigre และคณะ (2012) ศึกษาศักยภาพทางอัลลิโลพาธิกและศักยภาพการเป็นสารชีวภาพกำจัดวัชพืชของไลเคน Cladonia verticillaris ต่อการงอกและการเติบโตของผักกาดหอม (Lactuca sativa) โดยดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วยการใช้สารสกัดและสารบริสุทธ์จากไลเคนในอัตราที่แตกต่างกัน พบว่า ไม่มีชุดทดลองใดที่แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของสารสกัดต่อการงอกและการเติบโตของผักกาดหอม แต่พบการเปลี่ยนแปลงในพื้นที่ใบ ส่วนใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และรากของต้นอ่อน ในส่วนของการทดลองการเติบโต พบว่า ต้นอ่อนที่ได้รับสารสกัดด้วยอีเทอร์หรืออะซีโตนจะมีส่วนใต้ใบเลี้ยงที่เล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจะส่งผลต่อความผิดปกติของต้นอ่อน โดยคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการจำแนกและตรวจสอบสารเคมีอัลลิโลพาธิก สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักของต้นอ่อน กรด fumarprotocetraric และ protocetraric ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) และพบว่าต้นอ่อนที่ได้รับกรดทั้งสองอย่าง คือ fumarprotocetraric และ protocetraric จะมีขนาดพื้นที่ใบที่เพิ่มขึ้น ขณะที่ต้นอ่อนที่ได้รับกรดprotocetraric เพียงอย่างเดียวจะพบการเปลี่ยนแปลงในส่วนใต้ลำต้นและรากในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน การมีอิทธิพลต่อการเติบโตของผักการหอมของ กรด fumarprotocetraric และ protocetraric ที่สกัดจากไลเคน C. verticillaris and Parmotrema dilatatum ในระดับความเข้มข้นสูงแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำกรดทั้งสองอย่างนี้มาใช้เป็นสารชีวภาพกำจัดวัชพืช

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

การวิจัยเรื่องศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าว เพื่อเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน มีรายละเอียดของการศึกษาดังนี้

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. ตู้อบ
2. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
5. เครื่องทำแสง UV
6. เตาไฟฟ้า
7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
8. ชุดกรองสาร
9. ชุดคอลัมน์โครมาโตกราฟี
10. TLC Siliga gel 60 Merck Germany

3.1.2 สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane) AR grade
2. เมทานอล (Methanol) AR grade
3. เอทิลแอซิเตต (Ethylacetate) AR grade
4. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) AR grade
5. ผงซิลิกา (Siliga gel 60) Merck Germany
6. แมกนีเซียม ซัลเฟต

3.2 พืชและวัชพืช

3.2.1 พืช

มะเดื่อ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ficus hispida* Linn. f.

วงศ์ MORACEAE

3.2.2 วัชพืช

หญ้าข้าวนก

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Echinochloa crus-galli* (L.) T. Beauv.

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บ และการเตรียมพืช

1. ทำการเปรียบเทียบอนุกรมวิธานของพืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือมะเดื่อ โดยรับรองพืชตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์ (Voucher Specimens)

2. นำส่วนของมะเดื่อมาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

3. นำส่วนของมะเดื่อที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารพืช

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากมะเดื่อใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูงคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับดังนี้

1. ส่วนผลของมะเดื่อที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 5 กิโลกรัม แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือเฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2. นำของผสมมากรองแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของชั้นเฮกเซน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

3.3.3 การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี

นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้ไปทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ ดังนี้

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

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

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

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

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

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

3.3.4 การทดสอบการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช

1. นำสารสกัดที่ได้ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล มาชั่งน้ำหนัก และเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นตามที่กำหนดคือ 1,000 2,000 และ 3,000 ppm โดยทดสอบเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

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

3. นำจานเพาะที่ใส่สารสกัดแล้วไปใส่ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวละลายระเหยจนหมด ให้เหลือแต่สารที่สกัดได้

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

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

นำผลที่ได้มาคำนวณ เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืช โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

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

C แทน จำนวนเมล็ดที่งอกโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน จำนวนเมล็ดที่งอกโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

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

C แทน ความยาวของรากโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน ความยาวของรากโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

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

C แทน ความยาวลำต้นโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน ความยาวลำต้นโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

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

C แทน น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

3.3.5 การแยกสาร และการทดสอบ

การแยกสารสกัดโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช

3.3.5.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี

นำสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช มาทำการแยกสารโดยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนี้

1. นำสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดใส่ในขวดเล็ก และละลายด้วยตัวทำละลายชนิดเดิม

2. เตรียมแผ่น TLC ให้มีขนาดพอเหมาะประมาณ 2×5 เซนติเมตร แล้วจุด(spot) สารสกัดที่ละลายแล้วในขั้นตอนที่ 1 ลงบนแผน TLC โดยใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) จุดสารสกัดที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC 2 จุด โดยให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 0.5 เซนติเมตร และแต่ละจุดห่างกันพอประมาณ ด้านบนของแผ่น TLC ขีดระดับตัวทำละลาย (solvent front) ไว้

3. เตรียม TLC tank โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมใส่ในขวดแก้ว นั้นนำกระดาษกรองมาใส่ลงในขวดแก้วโดยให้กระดาษกรองทาบผิวด้านในขวดแก้ว แล้วเตรียมแผ่นกระจกปิดไว้เพื่อให้ขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

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

5. นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

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

7. เตรียมตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.3.5.2 การแยกสารสกัดโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และการทดสอบฤทธิ์ของสาร

เตรียมคอลัมน์แก้วโดยใช้ขาตั้ง (stand) และตัวจับ (clamp) จับคอลัมน์ให้ตั้งฉากกับพื้น อุดปลายคอลัมน์ด้วยสำลีสะอาดจำนวนเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายเฮกเซนลงไปประมาณครึ่งคอลัมน์เปิดก๊อกปิดเปิด (stopcock) ด้านล่างคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อไล่ฟองอากาศและป้องกันสำลีย้อย นำซิลิกาเจล ผสมกับตัวทำละลายเฮกเซนให้เข้ากัน เพื่อห้องกันการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์ แล้วนำไปบรรจุในคอลัมน์ ค่อยๆ บรรจุซิลิกาเจลลงไปให้ติดต่อ และสม่ำเสมอกันพร้อมทั้งเปิดที่ก๊อกปิดเปิดด้านล่างคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านอย่างช้าๆ และค่อยๆ ปรับผิวหน้าให้เรียบโดยการเคาะคอลัมน์เบาๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์

อย่างสม่ำเสมอ เมื่อบรรจุซิลิกาเจลเสร็จแล้วก็ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 5 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าซิลิกาเจลจึงปิดที่ก๊อกปิดเปิดด้านล่างของคอลัมน์ นำสารสกัดหยาบจากมะเดื่อที่ให้ผลดีที่สุดมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน และบรรจุลงในคอลัมน์ช้าๆ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปรับผิวหน้าให้เรียบ ฉีดล้างด้านในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นปล่อยให้ระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจลและจึงชะลอคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย โดยเรียงความมีขั้วน้อยไปหาขั้นมาก ได้แก่ สารเฮกเซน 100 เปอร์เซ็นต์ สารผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน 5 10 20 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ สารผสมระหว่างเฮกเซนกับเอธิลอะซิเตรต 10 20 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมตัวทำละลายแต่ละชนิดครั้งละ 200 มิลลิลิตรลงไป ทำการเก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาครั้งละ 20 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ถูกชะออกมาแต่ละชั้นมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) จากนั้นจึงทำการรวมสารที่เหมือนกันในแต่ละชั้น (fraction) เข้าด้วยกันและนำไปทำการระเหยก่อนนำไปทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชในขั้นตอนต่อไป

3.3.6 การทดสอบการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารแต่ละชั้น

1. นำสารชั้น (fraction) มาชั่งน้ำหนัก และเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นตามที่กำหนดคือ 100 ppm โดยทดสอบเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

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

3. นำจานเพาะที่ใส่สารสกัดแล้วไปใส่ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวละลายระเหยจนหมด ให้เหลือแต่สารที่สกัดได้

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

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

นำผลที่ได้มาคำนวณ เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืช โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก = {1 - (T/C) } ×100

C แทน จำนวนเมล็ดที่งอกโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน จำนวนเมล็ดที่งอกโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก = {1 - (T/C) } ×100

C แทน ความยาวของรากโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน ความยาวของรากโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น = {1 - (T/C) } ×100

C แทน ความยาวลำต้นโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน ความยาวลำต้นโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้ง = {1 - (T/C) } ×100

C แทน น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น

T แทน น้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในชุดสารสกัด

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละ

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2556 – 30 กันยายน 2558

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การวิจัยเรื่องศักยภาพของสารสกัดจากมะเดื่อต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืชในนาข้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน โดยใช้สารสกัดจากเปลือก ใบและผลของมะเดื่อที่ได้มาจากการหมักแบบ Maceration และเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของหญ้าข้าวนก วัชพืชในนาข้าวผลการทดลองเป็นดังนี้

4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

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

จากการตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากเปลือกและใบพบสารกลุ่ม alkaloids condensed tannins flavonoids triterpenes steroids และ antraquinones สารสกัดจากผลพบสารกลุ่ม alkaloids phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides antraquinones

4.2 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืช

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชด้วยสารสกัดจากเปลือก ใบ และผล ของมะเดื่อ

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก (%)		
		เปลือก	ใบ	ผล
Hexane	1,000	66.23	62.04	53.05
	2,000	67.98	64.28	53.42
	3,000	69.01	65.11	54.88
Ethylacetate	1,000	72.22	69.12	63.66
	2,000	73.54	70.34	64.32
	3,000	74.29	69.78	64.49
Methanol	1,000	82.54	78.04	74.41
	2,000	83.69	78.95	77.58
	3,000	85.74	80.02	76.12

จากตารางที่ 4.2 สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Methanol ที่มีความเข้มข้น 3,000 3,000 และ 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชสูงที่สุด คือ 85.74 80.02 และ 77.58 % ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชด้วยสารสกัดจากเปลือก ใบ และผลของมะเดื่อ

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก (%)		
		เปลือก	ใบ	ผล
Hexane	1,000	60.14	57.23	48.39
	2,000	60.08	58.88	49.63
	3,000	61.95	59.41	49.77
Ethylacetate	1,000	69.73	66.91	57.31
	2,000	69.98	66.37	58.29
	3,000	70.01	67.45	60.97
Methanol	1,000	80.05	76.49	73.75
	2,000	81.12	77.12	70.19
	3,000	82.89	79.44	72.97

จากตารางที่ 4.3 สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Methanol ที่มีความเข้มข้น 3,000 3,000 และ 1,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชสูงที่สุด คือ 82.89 79.44 และ 73.75 % ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชด้วยสารสกัดจากเปลือก ใบ และผลของมะเดื่อ

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น (%)		
		เปลือก	ใบ	ผล
Hexane	1,000	58.32	55.32	46.35
	2,000	60.19	56.79	46.82
	3,000	60.84	57.98	47.99
Ethylacetate	1,000	63.01	59.79	50.03
	2,000	63.88	60.89	51.47
	3,000	64.83	61.14	52.39
Methanol	1,000	75.49	70.44	65.49
	2,000	76.92	71.36	66.82
	3,000	78.91	73.59	67.94

จากตารางที่ 4.4 สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชสูงที่สุด คือ 78.91 73.59 และ 67.94% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชด้วยสารสกัดจากเปลือก ใบ และผลของมะเดื่อ

สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้ง (%)		
		เปลือก	ใบ	ผล
Hexane	1,000	62.17	58.77	49.12
	2,000	63.39	58.49	49.98
	3,000	64.91	59.23	50.88
Ethylacetate	1,000	66.23	62.79	52.37
	2,000	67.88	63.94	54.79
	3,000	68.13	64.58	54.87
Methanol	1,000	75.29	71.59	65.89
	2,000	77.55	72.87	67.42
	3,000	78.14	74.66	69.11

จากตารางที่ 4.5 สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย **Methanol** ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชสูงที่สุด คือ 78.14 74.66 และ 69.11% ตามลำดับ

4.3 ผลของสารแต่ละชั้นต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช

ตารางที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดจากเปลือกมะเดื่อด้วย Methanol

การงอกและการเจริญเติบโต	การยับยั้ง (%)									
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
การงอก	51.29	55.89	55.82	75.39	89.49	66.87	76.38	70.69	76.85	81.85
ความยาวราก	48.96	54.18	53.29	73.44	86.38	65.42	75.47	79.83	75.32	79.34
ความยาวลำต้น	60.21	51.98	50.99	70.09	78.35	50.89	66.91	64.91	70.18	73.29
น้ำหนักแห้ง	58.34	50.18	48.05	69.28	76.99	59.21	65.46	62.22	69.87	70.11

จากตารางที่ 4.6 สารสกัดจากเปลือกมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F5 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุดคือ 89.49 86.38 78.35 และ 76.99% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดจากใบมะเดื่อชั้น Methanol

การงอกและการเจริญเติบโต	**การยับยั้ง (%)**										
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
การงอก	59.46	64.69	63.44	78.96	79.63	85.11	65.89	68.63	74.12	86.51	60.81
ความยาวราก	56.35	62.37	62.59	77.55	77.41	84.87	64.77	66.99	73.39	84.22	58.79
ความยาวลำต้น	54.28	60.99	60.01	63.28	63.66	75.23	52.30	62.88	68.74	79.27	54.28
น้ำหนักแห้ง	53.79	68.71	68.72	61.11	61.47	72.98	51.00	62.39	62.32	77.14	52.22

จากตารางที่ 4.7 สารสกัดจากใบมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F10 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุดคือ 86.51 79.27 และ 77.14 % ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก สูงที่สุด คือ 84.87 %

ตารางที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืชของสารสกัดจากผลมะเดื่อด้วย Methanol

การงอกและการเจริญเติบโต	การยับยั้ง (%)								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
การงอก	86.31	89.71	69.78	65.84	79.85	68.84	62.97	56.69	55.89
ความยาวราก	87.19	86.98	68.31	63.23	78.42	67.23	61.03	55.02	54.31
ความยาวลำต้น	70.85	73.83	55.69	57.18	64.44	53.18	67.39	52.38	52.23
น้ำหนักแห้ง	69.34	71.12	52.37	55.02	62.56	51.02	65.96	51.11	51.01

จากตารางที่ 4.8 สารสกัดจากผลมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุดคือ 89.71 73.83 และ 71.12% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากผลมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก สูงที่สุด คือ 87.19%

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากเปลือกและใบพบสารกลุ่ม alkaloids condensed tannins flavonoids triterpenes steroids และ antraquinones สารสกัดจากผลพบสารกลุ่ม alkaloids phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides antraquinones

5.1.2 ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมการงอกและเจริญเติบโตของวัชพืช

1. สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Methanol ที่มีความเข้มข้น 3,000 3,000 และ 2,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของวัชพืชสูงที่สุด คือ 85.74 80.02 และ 77.58 % ตามลำดับ

2. สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Methanol ที่มีความเข้มข้น 3,000 3,000 และ 1,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวรากของวัชพืชสูงที่สุด คือ 82.89 79.44 และ 73.75 % ตามลำดับ

3. สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Ethylacetate ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้นของวัชพืชสูงที่สุด คือ 78.91 73.59และ 67.94% ตามลำดับ

4. สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Methanol ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งของวัชพืชสูงที่สุด คือ 78.14 74.66และ 69.11% ตามลำดับ

5.1.3 ผลของสารแต่ละชั้นต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช

1. สารสกัดจากเปลือกมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F5 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุดคือ 89.49 86.38 78.35 และ 76.99% ตามลำดับ

2. สารสกัดจากใบมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F10 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุดคือ 86.51 79.27 และ 77.14 % ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก สูงที่สุด คือ 84.87 %

3. สารสกัดจากผลมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวลำต้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้ำหนักแห้งสูงที่สุดคือ 89.71 73.83 และ 71.12% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากผลมะเดื่อด้วย Methanol ชั้น F1 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งความยาวราก สูงที่สุด คือ 87.19%

5.2 อภิปรายผล

การศึกษาการยับยั้งการการงอก และการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก ซึ่งเป็นวัชพืชในนาข้าว โดยใช้สารสกัดจากเปลือก ใบและ ผล ที่ได้มาจากการหมักแบบ Maceration และเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล

จากผลการศึกษาพบประเด็นที่สำคัญ

1. สารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Methanol ที่มีความเข้มข้น 3,000 ppm แสดงการยับยั้งการงอก การยับยั้งความยาวราก การยับยั้งความยาวต้น และการยับยั้งน้ำหนักแห้งในเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูง

2. เมื่อนำสารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะเดื่อที่สกัดด้วยด้วย Methanol ไปแยกชั้น พบว่าสารสกัดชั้น F5 F8 และ F2 แสดงการยับยั้งการงอก การยับยั้งความยาวราก การยับยั้งความยาวต้น และการยับยั้งน้ำหนักแห้งในเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูง

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยต่อไปควรมีการศึกษาผลของรากและดอกของมะเดื่อต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก และ การแยกสารบริสุทธิ์ในระดับโครงสร้างโมเลกุล เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการต่อยอดการวิจัยในภาคเกษตรกรรมต่อไป

บรรณานุกรม

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

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

จินดา ศรศรีวิชัย. 2514. สรีรวิทยาภาคการเจริญเติบโตและการควบคุม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

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

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

นราจันทร์ พิมเสน .2551. **ผลของสิ่งสกัดหยาบจากวัชพืชเขตร้อนบางชนิดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดไมยราบยักษ์ *Mimosa pigra L.*** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

ประสาน วงศาโรจน์. 2540. **การจัดการวัชพืชในนาข้าว.** กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ห้างหุ้นส่วน จำกัด มีเดีย เพรส.

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

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์. 2540. วัชพืชศาสตร์. ภาควิชาพืชไร่, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 585 หน้า.

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

วันดี กฤษณพันธ์. 2529. **พฤกษเคมีเบื้องต้น.** เภสัชวินิจฉัย. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1. กรุงเทพ.

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

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

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

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

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

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

สุธีรดา ฉิมน้อย และคณะ .2551. **ประสิทธิภาพของใบประยงค์ผงต่อการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ.** วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39 (3) (พิเศษ) (2551) : 317-320.

สืบศักดิ์ อนันต์พัฒนา. 2547. ผลทางอัลลีโลพาทิกของแซนทอกซีลินจากผลกำจัดต้น วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

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

เอกสารประกอบการบรรยาย. 2545. **การฝึกอบรมการใช้เทคโนโลยีแบบบูรณาการเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวคุณภาพดี** 29 พฤษภาคม – 1 มิถุนายน 2545 ณ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

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

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

Hari Om, et al .2002. **Allelopathic response of Phalaris minor to crop and weed plants in rice–wheat system**. Crop Protection 21 (2002) 699–705

Holm, L. 1969. Weed propblems in developing countries. Weed Sci. 17: 113 – 118.

Tigre R.C., et al. 2012. **Allelopathic and bioherbicidal potential of Cladonia verticillaris on the germination and growth of Lactuca sativa** .Ecotoxicology and Environmental Safety 84 (2012) 125–132