



ศักยภาพของมะตุ๊กพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค
เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

The potential of *Siphonodon celastrineus* Griff, traditional medicinal plants
of Thailand for treatment from local wisdom knowledge lead to the
development of sustainable use

อุดมเดช พลเยี่ยม
นิภาพร ปัญญา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายจ่าย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

- ชื่อเรื่อง** : ศักยภาพของมะตูมพีชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน
- ผู้วิจัย** : ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุดมเดชา พลเยี่ยม และ อาจารย์นิภาพร ปัญญา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะตูมพีชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะตูมเพื่อสร้างความเชื่อมั่นในการนำมะตูมไปใช้ประโยชน์ทางยาสมุนไพร โดยนำเปลือก ใบ และผลของมะตูมมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ประกอบด้วย เฮกเซน เอทิลแอลกอฮอล์ และ เมทานอล ตามลำดับความมีขั้วจากต่ำไปสูง จะได้สารสกัดทั้งหมด 9 ชนิด นำสารสกัดมาตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ ผลการวิจัยพบว่า

1. สารสกัดจากผลของมะตูมชั้นเมทานอลแสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ $31 \mu\text{g/ml}$ ส่วนการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลพบว่ามีค่าสารสกัดจากผลของมะตูมชั้นเมทานอลมีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือ มีค่า $95.23 \text{ mg GAE/g dw}$
2. สารสกัดจากเปลือกของมะตูมด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุดในโดยมีค่า MIC เท่ากับ $15.60 \mu\text{g/ml}$ สารสกัดจากใบของมะตูมที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุดในโดยมีค่า MIC เท่ากับ $31.25 \mu\text{g/ml}$ และสารสกัดจากใบของมะตูมด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุดในโดยมีค่า MIC เท่ากับ $31.25 \mu\text{g/ml}$ และ สารสกัดจากผลของมะตูมด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ $15.60 \mu\text{g/ml}$

- Title** : The potential of *Siphonodon celastrineus* Griff, traditional medicinal plants of Thailand for treatment from local wisdom knowledge lead to the development of sustainable use
- Researcher** : Udomdeja Polyium (M.Sc) and Niphaporn Panya (M.Eng)
Faculty of Science and Technology
Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

ABSTRACT

The research project on The potential of *Siphonodon celastrineus* Griff, traditional medicinal plants of Thailand for treatment from local wisdom knowledge lead to the development of sustainable use, with the objective of studying the botanical, phytochemical, and biological activity of the *Siphonodon celastrineus* to create confidence in the use of *S. celastrineus* in herbal medicine by using the bark, leaves and fruit of the *S. celastrineus* to extract with 3 types of solvents. Each of hexane, ethyl acetate, and methanol, respectively, from low to high polarity. All nine extracts will be extracted. Preliminary examinations for phytochemistry, Antioxidant activity by DPPH radical scavenging assay and quantitative determination of phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method and antimicrobial activity were tested. The research found that.

1. The extract of the results of the methanol layer of the *S.celastrineus* shows a reduction in the amount of 1,1-diphenol-2-picrylhydrazyl (DPPH) had the highest EC_{50} equal to 31 mg/ml. The amount of phenol compounds found that the extracts from the methanol extract of *S. celastrineus* contain the amount of phenol. The highest concentration of 95.23 mg GAE / g dw

2. Extract from the bark of the *S. celastrineus* with methanol showed the best inhibition of the growth of *Vibrio paraheamolyticus* with the MIC value of 15.60 mg/ml. The extracts of the *S. celastrineus* leaf extracts with hexane showed the best inhibition of the growth of *Vibrio cholerae* with the MIC value equal to 31.25 mg/ml and leaf extracts with ethyl acetate showed the best inhibitory effect on the growth of *Vibrio cholerae* with a MIC value of 31.25 mg/ml and the extract of the fruit with ethyl acetate to inhibit the growth of *Vibrio paraheamolyticus* most with MIC equal to 15.60 mg/ml.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องศักยภาพของมะดุกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายจ่าย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการสำหรับการทดลองเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสพวิชาความรู้แก่คณะผู้วิจัย



สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 พฤษศาสตร์พื้นบ้าน	6
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร	11
2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร	14
2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	22
2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	24
2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร	31
2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	37
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	38
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	41
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	42
3.2 พืชและจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย	43
3.3 วิธีการทดลอง	45
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	48
3.5 ระยะเวลาการทดลอง	48
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	48

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4. ผลการทดลอง	49
4.1 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพิษเคมี	50
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	51
4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	53
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	56
5.1 สรุปผลการทดลอง	56
5.2 อภิปรายผล	58
5.3 ข้อเสนอแนะ	58
บรรณานุกรม	59



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การศึกษาทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านเป็นการบูรณาการความรู้ด้านพฤกษศาสตร์และด้านมานุษยวิทยา เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างมนุษย์กับพืช โดยเน้นที่การนำพืชสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ในด้านยารักษาโรค ของปราชญ์พื้นบ้านตามชุมชนท้องถิ่นต่าง ๆ โดยการรวบรวมความรู้จากหมอพื้นบ้าน การใช้ในชุมชน (field work) และการศึกษาจากเอกสาร (literature search) เกี่ยวกับรายละเอียดของพืชสมุนไพรในท้องถิ่นแต่ละชนิด ได้แก่ ชื่อท้องถิ่นของสมุนไพร สรรพคุณ การเตรียมยาสมุนไพรและวิธีการใช้รักษา การศึกษาด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและพัฒนายาสมุนไพรพื้นบ้านแผนโบราณเป็นงานวิจัยที่ศึกษาการออกฤทธิ์โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานพืช พร้อมกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆตามตำรับยาที่ค้นพบเพื่อนำมาใช้ประโยชน์จากฤทธิ์ทางชีวภาพโดยตรง หรือนำมาเป็นโครงสร้างต้นแบบเพื่อทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นอีก หรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นที่แตกต่างไปจากเดิม หรือนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารชนิดอื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรมประเทศไทยจึงได้รับประโยชน์จากการวิจัยด้านนี้เป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นประเทศมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อนจึงส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) ในภูมิภาคของประเทศ

ประกอบกับยุทธศาสตร์การวิจัยตามนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559) ให้ความสำคัญกับการสร้างศักยภาพและความสามารถในการพัฒนาทางสังคม โดยมีกลยุทธ์การวิจัยเพื่อพัฒนาและการคุ้มครองภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน การแพทย์ทางเลือก และสมุนไพร เน้นแผนงานวิจัยเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน และการแพทย์ทางเลือก เพื่อสร้างองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่นและการคุ้มครองภูมิปัญญาและการวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข อีกทั้งยุทธศาสตร์การวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย พ.ศ. 2556-2559 ให้ความสำคัญกับการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่สามารถนำไปสู่การเป็นผลิตภัณฑ์น้ำมันสมุนไพร ยาสมุนไพร เครื่องดื่มสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสมุนไพร และเครื่องสำอางสมุนไพร การวิจัยและการพัฒนาสมุนไพรไทย และสารสมุนไพรไทยเพื่อพัฒนาเป็นยา ทั้งในรูปแบบยาแผนไทย ยาแผนปัจจุบัน และยาสำหรับสัตว์ การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยเฉพาะกลุ่มที่มีผลทางโภชนาการ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในลักษณะต่างๆ และการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีศักยภาพเป็นเครื่องสำอางหรือส่วนประกอบของเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สปา (ยุทธศาสตร์การวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย พ.ศ. 2556 – 2559)

จากการวิเคราะห์สถานการณ์การใช้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรพบว่า ด้านยาสมุนไพร จากข้อมูลสภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย (กลุ่มสมุนไพร) ปี พ.ศ.2554 มูลค่าการตลาดยาจากสมุนไพรในประเทศไทย ประมาณ 8000 ล้านบาท ไม่รวมมูลค่ายาจากสมุนไพรในสถานบริการสาธารณสุขของรัฐ (ข้อมูลจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยามีมูลค่า 1,000 ล้านบาท) ส่วนการนำเข้าและส่งออกยาสมุนไพรมีมูลค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ประมาณ 200-300 ล้านบาท

ด้านเครื่องสำอาง จากข้อมูลจากสมาคมผู้ผลิตเครื่องสำอางไทย ปี พ.ศ.2544 ประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางคิดเป็นมูลค่า 140,000 ล้านบาท (ข้อมูลจากศูนย์วิจัย ธนาคารกสิกรไทย รายงาน ประมาณ 90,000 ล้านบาท) ซึ่งต้องนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศราวร้อยละ 90 ของการผลิต โดยเป็นวัตถุดิบสารสกัดสมุนไพร 20,000-30,000 ล้านบาท (จากยุโรปเป็นส่วนใหญ่) และเป็นสมุนไพรที่สามารถปลูกและแปรรูปได้ในประเทศไทย ด้านอาหารเสริม จากข้อมูลสมาพันธ์สุขภาพและความงาม ปี พ.ศ.2554 ประมาณมูลค่าอาหารเสริมสุขภาพตลาดในประเทศไทย 80,000 ล้านบาท โดยต้องนำเข้าวัตถุดิบสารสกัดจากสมุนไพรคิดเป็นมูลค่า 20,000 ล้านบาท (แผนยุทธศาสตร์การพัฒนาสมุนไพรไทย : สมุนไพรไทย--สินค้าโลก พ.ศ. 2556-2560 การพัฒนาสมุนไพรไทยสู่ผลิตภัณฑ์สร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก)

ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาศักยภาพของมะดุกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคจากองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นพัฒนาไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน จึงเป็นประเด็นการวิจัยที่สำคัญที่ต้องทำการศึกษาเพื่อเป็นการสืบทอดภูมิปัญญาท้องถิ่น การสนับสนุนการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน และเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพของพืชสมุนไพรในประเทศไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาข้อมูลทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านและตำรายาตามภูมิปัญญาท้องถิ่นในการใช้มะดุกเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน

1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะดุก เพื่อต่อยอดองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่น และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคในการนำมะดุกไปใช้ประโยชน์ทางยาสมุนไพร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องศักยภาพของมะดุกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ทำการศึกษาจากพืชตัวอย่างในพื้นที่ของจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กำหนดขอบเขตการวิจัยดังนี้

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาคือมะดุก (*Siphonodon celastrineus* Griff)

2. ส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

3.1 เปลือก

3.2 ใบ

3.3 ผล

3. องค์ประกอบทางพฤกษเคมี

- 3.1 Alkaloids
- 3.2 Condensed
- 3.3 Tannins
- 3.4 Phenolic compounds
- 3.5 Triterpenes
- 3.6 Steroids
- 3.7 Cardiac glycosides
- 3.8 Antraquinones

4. ฤทธิ์ทางชีวภาพ

- 4.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ
- 4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน
 - การทดสอบกับ สาร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
 - การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอล(Folin-Ciocalteu's reagent)

5. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด

- 5.1 เฮกเซน
- 5.2 เอทิลแอะซิเตต
- 5.3 เมทานอล

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ตัวแปรอิสระ

มะดุกกับภูมิปัญญาท้องถิ่น



ตัวแปรตาม

1. ศึกษาข้อมูลทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านและตำรายาตามภูมิปัญญาท้องถิ่นในการใช้มะดุกเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน
2. ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะดุก เพื่อต่อยอดองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่น และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคในการนำมะดุกไปใช้ประโยชน์ทางยาสมุนไพร

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของว้มะดุก
2. การส่งเสริมและสร้างความตระหนักถึงคุณค่าของพืชสมุนไพรในท้องถิ่นเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างและการอนุรักษ์ทรัพยากรอย่างยั่งยืน



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดุกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนคณะผู้วิจัยทำการศึกษา เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

- 2.1 พฤษศาสตร์พื้นบ้าน
- 2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร
- 2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร
- 2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
- 2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
- 2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร
- 2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
- 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง



2.1 พฤษศาสตร์พื้นบ้าน

2.1.1 ความเป็นมาพฤษศาสตร์พื้นบ้าน

มนุษย์เกี่ยวข้องกับพืชพรรณตั้งแต่เริ่มวิวัฒนาการของมนุษยชาติ ปัจจัยอันจำเป็นต่อการดำรงชีพของมนุษย์คือ อาหาร เครื่องนุ่งห่ม ที่อยู่อาศัย และยารักษาโรค ได้จากพืชเป็นส่วนใหญ่ มนุษย์นำพืชมาใช้ประโยชน์หลายรูปแบบ แตกต่างกันไปตามสภาพสิ่งแวดล้อม และวัฒนธรรมของกลุ่มชนแต่ละท้องถิ่น นอกจากการใช้ประโยชน์พืชโดยตรงแล้ว มนุษย์ยังนำพืชมาใช้ทางด้านพิธีกรรมทางศาสนา ความเชื่อถือโศกลาง งานนักษัตฤกษ์ ฯลฯ หรือนำมาใช้ในงานหัตถกรรมพื้นบ้าน การใช้ประโยชน์พืชดังกล่าว ได้ถ่ายทอดต่อกันมาจากบรรพชนหลายรุ่น จนกลายเป็นความรู้ หรือภูมิปัญญาชาวบ้าน หรือภูมิปัญญาพื้นบ้าน (traditional knowledge หรือ folk knowledge) ซึ่งเป็นวัฒนธรรมพื้นบ้านแบบหนึ่ง ของกลุ่มชนท้องถิ่น ภูมิปัญญาพื้นบ้านส่วนใหญ่ ได้จากการบอกเล่าจากชนรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง ความรู้เหล่านี้เกิดจากประสบการณ์ และการลองแบบถูก-ผิด ที่ได้สั่งสมติดต่อกันมาเป็นเวลานาน แต่การจดบันทึกภูมิปัญญาพื้นบ้านไว้เป็นหลักฐาน ยังมีปรากฏอยู่น้อยมาก นอกจากคำบอกเล่า จากความทรงจำของกลุ่มชนพื้นบ้าน ดังนั้นการถ่ายทอดความรู้ และวัฒนธรรมพื้นบ้าน จึงขาดตอน หรือขาดตกบกพร่องขึ้นได้ง่ายในกลุ่มชนพื้นบ้าน โดยเฉพาะในชุมชนที่มีการพัฒนา โดยวัฒนธรรมเมืองหลวงไหลเข้ามามีบทบาทแทนวัฒนธรรมพื้นบ้าน ที่นับวันจะเสื่อมสูญไป

ในยุคโลกาภิวัตน์ วัฒนธรรม และความรู้พื้นบ้าน ในการใช้ประโยชน์พืช ที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษ ยังคงเหลืออยู่บ้าง ตามกลุ่มชนพื้นบ้าน ในพื้นที่ทุรกันดารห่างไกลจากสังคมเมือง กลุ่มชนหลายแห่ง มีความผูกพันกับพืชมานาน จนกลายเป็นเอกลักษณ์ของกลุ่มตน ดังเช่น วัฒนธรรมการบริโภคข้าวเหนียวทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การบริโภคพืชผัก จำพวกสะตอ และลูกเนียงทางภาคใต้ การผลิต เครื่องดนตรีประเภทเป่าที่เรียกว่า "แคน" ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การผลิตเครื่องเงินของจังหวัดเชียงใหม่ การผลิตกระเป๋ายานลิเกาของจังหวัดนครศรีธรรมราช ฯลฯ การผลิตดังกล่าว ได้พัฒนามาจากความรู้ และหัตถกรรมพื้นบ้านของกลุ่มชนในสังคมชนบท ดังนั้นเราสามารถสืบสาวเรื่องราวความเป็นมาของกลุ่มชนโบราณ และกลุ่มชนพื้นบ้าน แต่ละยุคแต่ละสมัยได้ โดยอาศัยความเกี่ยวข้องของพืชพรรณ ในวิถีชีวิตความเป็นอยู่ของกลุ่มชนพื้นบ้าน ในปัจจุบัน นักวิชาการได้ตระหนักถึงความสำคัญ และความจำเป็นในการอนุรักษ์ภูมิปัญญาพื้นบ้านไม่ให้เสื่อมสูญไป จึง เริ่มงานค้นคว้าวิจัย จดบันทึกความรู้ ในการใช้ประโยชน์พืชของกลุ่มชนพื้นบ้าน ตามแบบแผนของการศึกษาวิชาพฤษศาสตร์พื้นบ้านอย่างจริงจัง (ที่มา: <http://saranukromthai.or.th>)

2.1.2 ความหมายและขอบเขตของพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน เป็นศาสตร์ที่มีความสำคัญอีกสาขาหนึ่งของวิชาพฤกษศาสตร์ ตรงกับนิยามศัพท์ภาษาอังกฤษว่า "Ethnobotany" เรียกกันมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1895 (พ.ศ.2438) จากการศึกษาพรรณไม้ที่ชาวพื้นเมืองท้องถิ่นนำมาใช้ประโยชน์ของ ดร.จอห์น ดับเบิลยู ฮาร์ชเบอร์เกอร์ (Dr. John W. Harshberger) พฤกษศาสตร์พื้นบ้านเป็นคำผสมระหว่าง "พฤกษศาสตร์" หมายถึง วิชาที่ศึกษาในเรื่องพืช และ "พื้นบ้าน" หมายถึง กลุ่มชนใดกลุ่มชนหนึ่งที่มีเอกลักษณ์อย่างใดอย่างหนึ่งร่วมกัน อาจจะเป็นการดำรงชีพ ใช้ภาษาท้องถิ่นเดียวกัน นับถือศาสนา หรือความเชื่อถือเดียวกัน กล่าวได้ว่ากลุ่มชนนั้นมีจุดรวมของวัฒนธรรม และขนบธรรมเนียมประเพณีร่วมกัน ความหมายของคำว่าพื้นบ้านในที่นี้ ไม่ได้หมายถึงเฉพาะชาวชนบท หรือชาวไร่ ชาวนา แต่อาจจะเป็นกลุ่มชนเมือง หากกลุ่มชนนั้นยังคงเอกลักษณ์ของกลุ่มตนไว้ได้ พฤกษศาสตร์พื้นบ้านจึงเป็นวิชาที่ศึกษาถึงความเกี่ยวข้องระหว่างพืชและกลุ่มชนพื้นบ้าน ความหมายที่ชัดเจนของวิชานี้ก็คือ "การนำพืชมาใช้ของกลุ่มชนพื้นบ้านที่สืบทอดต่อกันมาจากบรรพบุรุษ หรือได้รับการถ่ายทอดจากเพื่อนบ้านในกลุ่มของตน จนเป็นเอกลักษณ์การใช้พืชพรรณประจำท้องถิ่นนั้น" พฤกษศาสตร์พื้นบ้านเกี่ยวข้องกับศาสตร์อื่นๆ อีกหลายสาขา เช่น พฤกษศาสตร์จำแนกพวกพฤกษนิเวศ มานุษยวิทยา นิรุกติศาสตร์ ภาษาศาสตร์ ฯลฯ

ในประเทศไทยคำว่า “พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน” กำหนดใช้ครั้งแรกจากการประชุมเรื่องพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน จัดโดยสำนักงานคณะกรรมการวัฒนธรรมแห่งชาติ โดยผู้เชี่ยวชาญของประเทศซึ่งได้บัญญัติคำขึ้นมาใช้ให้เหมาะสม ว่า “พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน” หมายถึง การศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ของพืชที่ได้มีการสืบทอดต่อกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ ทั้งที่เป็นอาหาร ที่อยู่อาศัย ตลอดจนการใช้เป็นสัญลักษณ์และความเชื่อต่าง ๆ รวมทั้งวิธีการจำแนกแบบพื้นบ้าน ตลอดจนขั้นตอนการเตรียมและลู่ทางการใช้พืชนั้น ๆ (เต็ม สมิตินันท์ และวีระชัย ญ นคร, 2534, หน้า 35)

จะเห็นได้ว่า กลุ่มชนพื้นบ้านมีความผูกพันกับพืช มาตั้งแต่ครั้งโบราณกาล ภูมิปัญญาพื้นบ้านที่เกี่ยวกับพืชของกลุ่มชนในท้องถิ่นได้สูญหาย หรือขาดการถ่ายทอดไปแล้วมากมาย ตามกาลเวลาที่ผ่านไป เมื่อสังคมพื้นบ้าน หรือสังคมชนบท ได้พัฒนาไปสู่สังคมเมือง หรือสังคมอุตสาหกรรม แต่การศึกษาวิชาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านตามแบบแผน ยังคงอยู่ในช่วงเริ่มต้นของทศวรรษที่ผ่านมา ก่อนหน้านั้น งานค้นคว้าวิจัย ที่เกี่ยวกับการนำพืชมาใช้ประโยชน์ จะเน้นแต่ความสำคัญ และคุณค่าทางเศรษฐกิจของพืช เช่น พืชสมุนไพร-เครื่องเทศ พืชอาหาร พืชเส้นใย พืชที่ใช้ในการก่อสร้าง อันเป็นการศึกษาวิชาพฤกษศาสตร์เศรษฐกิจ (Economic botany) มากกว่าที่จะเป็นการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน ซึ่งมีรูปแบบการศึกษาแตกต่างออกไป เช่น การศึกษาพืชผักพื้นบ้านตามชนบท ที่ได้จากการเก็บหาในธรรมชาติ หรือจากป่า แตกต่างจากการศึกษาพืชผักเศรษฐกิจ ที่ได้จากการปลูกในแปลงผักเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามพืชผักพื้นบ้านหลายชนิด ที่เกิดจากภูมิปัญญาพื้นบ้าน อาจจะมีศักยภาพกลายมาเป็นพืชผักเศรษฐกิจขึ้นได้ในอนาคต หากได้รับการส่งเสริมอย่างจริงจัง

การศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านครอบคลุมไปถึงศาสตร์ที่เกี่ยวข้องอีกหลายสาขา เช่น เภสัชพื้นบ้าน (Ethnopharmacology) เกษตรกรรมพื้นบ้าน (Ethnoagriculture) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการทำเกษตรกรรมแบบโบราณ เครื่องมือเครื่องใช้พื้นบ้าน ที่ใช้ทำการเกษตร และการปลูกพันธุ์พืชดั้งเดิมหรือพันธุ์พืช ที่ยังไม่ได้ปรับปรุงพันธุ์ เครื่องสำอางพื้นบ้าน (Ethnocosmetics) ศึกษาเกี่ยวกับเครื่องประทีนผิว เครื่องร่ำ เครื่องหอม และวิธีการผลิต เช่น การนำไม้กระแจะมาเป็นเครื่องประทีนผิว การทำเครื่องหอมปรุงน้ำอบ หรือแป้งร่ำ จากดอกขำมะนา ดอกมะลิ ดอกกระดังงาไทย ดนตรีพื้นบ้าน

(Ethnomusicology) ศึกษาเกี่ยวกับเพลงพื้นบ้าน และพืชที่ใช้ทำเครื่องดนตรีพื้นเมือง และวิธีการทำเครื่องดนตรี ถึงแม้ว่ามนุษย์จะเกี่ยวข้องกับพืช โดยนำพืชมาใช้ประโยชน์หลายรูปแบบมานานแล้ว แต่พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน ยังเป็นวิชาที่ค่อนข้างใหม่ ปัจจุบันอยู่ในความสนใจของนักพฤกษศาสตร์ นักนิเวศวิทยา นักเภสัชศาสตร์ นักพฤกษเคมี นักมานุษยวิทยา นักธรรมชาติวิทยา นักโบราณคดี นักนิรุกติศาสตร์ ฯลฯ

กล่าวได้ว่าการศึกษพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน เป็นการศึกษาค้นคว้าหาความรู้จากภูมิปัญญาพื้นบ้าน ที่เกี่ยวกับพืช โดยศึกษาถึงชนิดพันธุ์พืชที่ถูกต้อง ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพื้นเมือง ถิ่นกำเนิด ประโยชน์ หรือโทษของพืช ฯลฯ ตลอดจนถึงศึกษาถึงวิธีการนำพืชไปใช้ จนกลายเป็นวัฒนธรรมของกลุ่มชนพื้นบ้าน ชนบางกลุ่มได้อนุรักษ์ต้นไม้ใหญ่ หรือพื้นที่ป่าไม้ ของหมู่บ้านเอาไว้สืบต่อกันมา ด้วยความเชื่อถือ เกี่ยวกับโชคลาง หรือสงวนไม้เพื่อใช้สอย เช่น ป่า ปู่ตา ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นป่าชุมชนประเภทหนึ่ง ที่มีการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์ป่าไม้แบบยั่งยืน

2.1.3 พฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทย

การศึกษพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทย อยู่ในระยะเริ่มต้น ข้อมูลที่เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์พืช โดยผ่านการค้นคว้าวิจัยตามแบบแผน มีน้อยมาก เท่าที่มีการจัดบันทึกเป็นหลักฐานอยู่บ้าง ได้แก่ ข้อมูลเกี่ยวกับพืชสมุนไพร ในตำรายาไทยโบราณ ข้อจำกัดของการศึกษพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทยก็คือ ประเทศไทยยังขาด ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรพืช ทั้งยังขาดแคลนนักพฤกษศาสตร์ที่ เชี่ยวชาญ และมีประสบการณ์ทางด้านการจำแนกพรรณพืช และขาดแคลนนักพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน (Ethnobotanist) ผู้มีประสบการณ์สามารถจำแนกพืชในละแวกชุมชนของตนเองได้

ข้อมูลพื้นฐานทรัพยากรพรรณพืชของประเทศใดประเทศหนึ่ง จะปรากฏอยู่ในหนังสือพรรณพฤกษชาติ (flora) ประเทศไทยยังไม่เคยมีหนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศฉบับสมบูรณ์มาก่อน ในขณะที่ประเทศอื่นในภูมิภาคเอเชีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ตีพิมพ์หนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศมานานแล้ว โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวตะวันตก ได้แก่ หนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศอินเดีย พม่า แหลมมลายู ภูมิภาคอินโดจีน และชวา หนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศไทยตอนแรก ตีพิมพ์เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๑๓ - พ.ศ. ๒๕๓๘ ตีพิมพ์หนังสือไปได้เพียงประมาณร้อยละ ๓๐ ของจำนวนพืชที่มีท่อลำเลียง (vascular plants) ทั้งหมดของประเทศ ซึ่งมีประมาณไม่ต่ำกว่า ๑๐,๐๐๐ ชนิด ดังนั้นประเทศไทยยังขาดข้อมูลพื้นฐานพรรณพฤกษชาติอยู่อีกมาก อันเป็นข้อจำกัดที่สำคัญประการหนึ่ง ในการศึกษา ค้นคว้าพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทย

การศึกษาทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทยที่ผ่านมา ผลงานส่วนใหญ่ปรากฏเป็นเพียงรายงานเบื้องต้น เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์พืช ของกลุ่มชนพื้นบ้าน โดยเฉพาะการใช้พืชสมุนไพร และพืชอาหาร นอกจากนี้มีรายงานไม่กี่เรื่อง ที่กล่าวถึง พืชที่มีพิษ พืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในงานหัตถกรรมพื้นบ้าน และพืชโบราณที่ปรากฏอยู่ใน จารึก หรือถูกกล่าวขานในวรรณคดีไทยหรือนิทานพื้นบ้านในยุคสมัยต่างๆ ส่วนงานค้นคว้าวิจัย พฤกษศาสตร์พื้นบ้านตามแบบแผนที่ได้มาตรฐาน โดยมีการสำรวจในพื้นที่พร้อมบันทึกรายละเอียด และทำการเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งไว้เป็นหลักฐาน (voucher specimen) ยังมีน้อยมาก เท่าที่ปรากฏ มีผลงานเพียงไม่กี่เรื่อง ได้แก่ การศึกษาเกี่ยวกับการใช้พืชสมุนไพรของชาวเขาบางเผ่าทางภาคเหนือ โดยนักวิชาการชาวต่างประเทศ

งานค้นคว้าวิจัยทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทยมีขอบเขตกว้าง ขึ้นกับวัตถุประสงค์และความชำนาญเฉพาะเรื่องของผู้วิจัย แต่ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาการใช้พืชพรรณกลุ่มใดของกลุ่มชนพื้นบ้าน นักวิจัยด้านนี้จำเป็นต้องมีความรู้ และ ประสบการณ์ทางพฤกษศาสตร์จำแนกพวกเป็นพื้นฐานอยู่บ้าง เพื่อช่วยในการปฏิบัติงานภาคสนาม เป็นไปได้รวดเร็วและแม่นยำมากยิ่งขึ้น นักวิจัยควรถือหลักปฏิบัติงานในท้องที่ดังต่อไปนี้

1. สสำรวจพืชพรรณที่ผู้คนนำมาใช้ตามชุมชนพื้นบ้าน ทั้งพืชที่ใช้บริโภค อุโภค หรือใช้ในพิธีกรรมทางศาสนา ความเชื่อถือ ฯลฯ และเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (herbarium specimen) ไว้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการตรวจสอบชนิดพืช และชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง
2. บันทึกชื่อพื้นเมือง รายละเอียดรูปพรรณของพืช ถิ่นกำเนิด ประโยชน์หรือโทษของพืช
3. บันทึกส่วนของพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะพืชสมุนไพร ต้องระบุว่า ใช้ส่วนราก หัว เหง้า เปลือก ฝักหรือชั้นไม้ แก่นไม้ กิ่งไม้ ใบ ดอก ผล หรือเมล็ด และวิธีการนำมาใช้ การปรุง การผลิต ฯลฯ
4. บันทึกชื่อ อายุ เพศ และความรู้ของผู้คนพื้นบ้าน ที่ให้ข้อมูล หรือให้ความรู้เกี่ยวกับภูมิปัญญาพื้นบ้าน และควรสอบถามผู้อื่นในชุมชนเดียวกันซ้ำมากกว่า ๑ ราย เพื่อความแน่นอนว่า มีการใช้พืชดังกล่าวในรูปแบบเดียวกัน
5. บันทึกสภาพของชุมชนพื้นบ้าน ลักษณะการตั้งถิ่นฐาน และความเป็นอยู่ของชุมชน ช่วงเวลาของการตั้งถิ่นฐาน การทำเกษตรกรรม ขนบธรรมเนียมประเพณี วัฒนธรรม และความเชื่อถือต่างๆ

2.1.4 รูปแบบการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

การศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านแบ่งประเภทได้ดังนี้ (อาทร ริวไพบูลย์, 2538, หน้า 241)

1. การศึกษาทางโบราณคดี จากซากดึกดำบรรพ์ของพืช (paleoethnobotany)
2. การศึกษาพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium search) โดยศึกษาจากรายละเอียดที่บันทึกไว้ของตัวอย่างพืชอัดแห้ง (herbarium label)
3. การศึกษาจากเอกสาร (literature search) เช่น การบันทึกของนักสำรวจ ผู้เดินทางเผยแพร่ศาสนา
4. การศึกษาการใช้ในชุมชน (field work) โดยการเก็บข้อมูลในท้องถิ่นที่อยู่ของชนกลุ่มน้อย

2.1.5 ประโยชน์ของพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

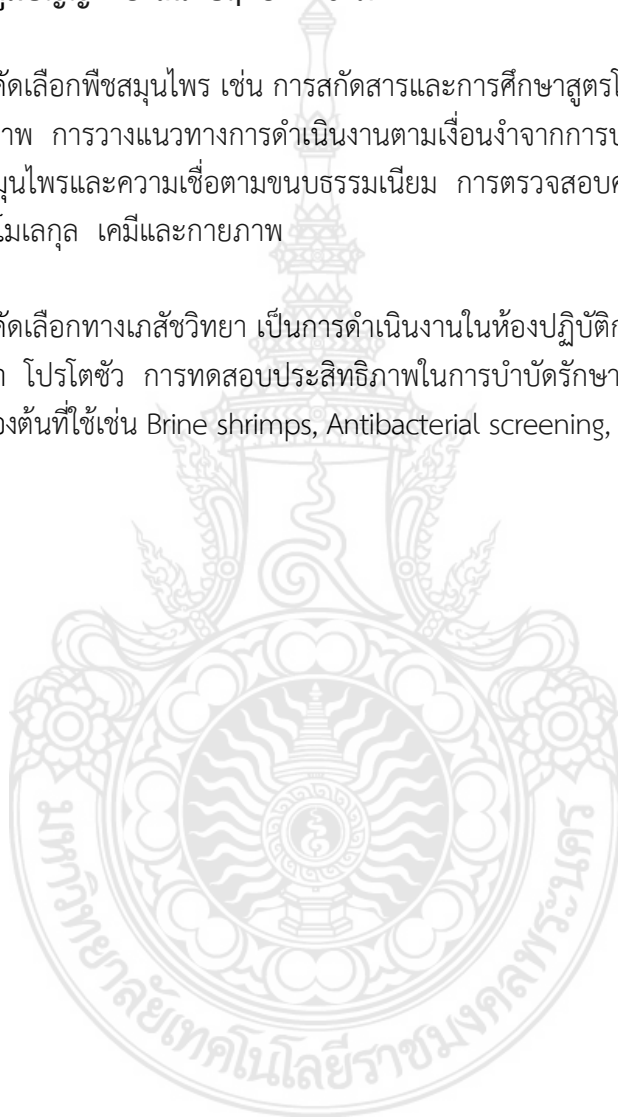
ประโยชน์ของพฤกษศาสตร์พื้นบ้านแบ่งตามลักษณะการใช้ประโยชน์หลักๆ ได้ดังนี้ (เต็ม สมิตินันท์ และวีระชัย ณ นคร, 2534, หน้า 7-8)

1. พืชอาหาร หมายถึง พืชที่มนุษย์ใช้เป็นอาหารโดยตรง แปรรูปเป็นอาหาร หรือใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ได้แก่ ธัญพืช ผัก ผลไม้ พืชที่เป็นสารปรุงแต่ง สีสผสมอาหารเครื่องเทศ ฯลฯ
2. พืชที่ใช้เป็นยารักษาโรค หมายถึง พืชที่ชาวบ้านเชื่อว่ามึสรรพคุณเป็นยารักษาโรค รวมถึงพืชที่นำไปใช้เป็นยารักษาโรคได้โดยตรง หรือที่ต้องใช้ผสมกับพืชอื่นหรือสารอื่นหรือต้องผ่านกรรมวิธีการสกัด และพืชที่ใช้เป็นยาเสพติด หรือเป็นพืชมีพิษ

3. พีชที่ใช้เป็นเครื่องนุ่งห่ม หมายถึง พีชที่ให้เส้นใยถักทอ รวมถึงพีชที่ให้สีย้อมและพีชที่ใช้เลี้ยงแมลงที่ให้เส้นใย
4. พีชที่ใช้เป็นที่อยู่อาศัย หมายถึง พีชที่มนุษย์นำมาแปรรูปสร้างที่อยู่อาศัยประดิษฐ์อุปกรณ์ต่าง ๆ ฯลฯ
5. พีชที่ใช้เป็นสัญลักษณ์และความเชื่อถือต่าง ๆ หมายถึง พีชที่มนุษย์ให้ความเชื่อถือเป็นตัวแทนของหมู่คณะ เป็นเครื่องรางของขลัง นำโชค และป้องกันภูตผีปีศาจ

2.1.6 ภูมิปัญญาท้องถิ่นกับฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. การคัดเลือกพืชสมุนไพร เช่น การสกัดสารและการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารก่อนจะศึกษาผลทางชีวภาพ การวางแผนทางการดำเนินงานตามเงื่อนไขจากการประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในยาสมุนไพรและความเชื่อตามขนบธรรมเนียม การตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีววิทยาชีวเคมี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีและกายภาพ
2. การคัดเลือกทางเภสัชวิทยา เป็นการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรีย เห็ดรา โปรโตซัว การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาโรคเช่น โรคมะเร็ง การอักเสบ วิธีการเบื้องต้นที่ใช้เช่น Brine shrimps, Antibacterial screening, Hippocratic screening เป็นต้น



2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร

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

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

2.2.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

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

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

1. พืชสมุนไพรที่จะนำมาสกัด ต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง เพราะพืชหลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันหรือมีชื่อพ้องกัน โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่หายากและขาดแคลน ต้องตรวจสอบอย่างรอบครอบ

2. การเลือกเก็บพืชสมุนไพรที่สมบูรณ์ มีอายุตามชนิดของพืช สามารถออกดอกออกผลที่มีจำนวนมากพอ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มากพอดังนี้

2.1 รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโต หากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย

2.2 เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่

2.3 ใบและดอก เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน

2.4 ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร

2.5 ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือเมื่อสุกเต็มที่ ตามชนิดของพืช

สมุนไพร

2.6 เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก

3. เก็บตัวอย่างให้ถูกฤดูกาลของพืชแต่ละชนิด เช่น พริก ขิง ข่า กระจ่างดำ จะมีเหง้าอยู่ใต้ดิน

ในฤดูฝนเหง้าจะมีน้ำปริมาณมาก ทำให้มีปริมาณสารระเหยต่ำ ดังนั้นจึงควรเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้งจะได้ปริมาณสารระเหยที่มากกว่า

4. วิธีการเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสมต่อการนำไปแยกสกัดสาร พืชบางชนิดต้องสกัดสด หรือบางชนิดต้องสกัดแห้ง

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

6. ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าและผลิตภัณฑ์ ต้องระวัง สิ่งปลอมปน การใช้ชื่ออื่นมาอ้าง และชื่อพ้องกัน

7. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วต้องการทำตัวอย่างแห้ง ต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์

2.2.3 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. การเตรียมตัวอย่างแบบสด พืชสมุนไพรสดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยนำพืชสดมาตำกับแอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง

2. การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง เป็นการป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

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

4. พืชสมุนไพรแห้งควรเก็บในที่แห้ง มีด เย็น และมีอากาศหมุนเวียนและหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน

2.2.4 การทำให้สมุนไพรตัวอย่างมีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชสมุนไพรต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผนังหรือผนังเยื่อ เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชสมุนไพรที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

การย่อยพืชสมุนไพรให้มีขนาดเล็กลง

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

ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่จะหมุนเวียนกลับไปย่อยอีก จนได้ขนาดที่เล็กพอที่จะลอดผ่านรูตระแกรง หรือเครื่องบดชนิดตัด (cutting mills) เหมาะสำหรับย่อยใบ เปลือกไม้ และรากที่เหนียวมีเส้นใย ขนาดของพืชที่ต้องการลดขนาดขึ้นกับขนาดของตระแกรงที่ใช้และความเร็วของมอเตอร์ที่ใช้ หมุนใบมีด เป็นต้น

2. พืชสมุนไพรสดทำได้โดยการหั่น (slicing) โดยใช้มีด หรือพืชสมุนไพรที่แช่ในแอลกอฮอล์อาจใช้เครื่องปั่น (waring blender) เป็นต้น

นอกจากนี้อาจทำการย่อยเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เอนไซม์ (enzyme disintegration) หรือโดยใช้สารเคมี (chemical disintegration)

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

4. การย่อยสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากจนเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์แตกมากเกินไป ซึ่งบางครั้งทำให้สารสกัดขุ่น ขนาดของผงพืชสมุนไพรที่เหมาะสมหาได้จากการทดลองซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบสำคัญสูงสุด



2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

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

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

ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรนั้นมีข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์ การเลือกตัวทำละลาย การเลือกวิธีการสกัด วิธีการสกัด และการทำสารสกัดให้เข้มข้น

2.3.1 สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์

ชูดิมา ลัมมัทวาริตรี (อังกษนิธิศาสตร์ วิจารณ์ารธา และคณะ. 2551 : 68-71) กล่าวถึงคุณสมบัติทั่วไปที่ควรทราบก่อนทำการแยกสารดังนี้

1. ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) หรือ ความชอบน้ำ (hydrophilicity)

ความชอบน้ำ (hydrophilicity) หรือความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของสารนั้นพิจารณาได้จากความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลาย ที่มีขั้วสูงไปหาขั้วต่ำตามลำดับ ดังนี้ น้ำ เมทานอล อะซิโตนไนไตร(acetonitrile) เอธิลอะซีเตต (ethyl acetate) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (chloroform) ปโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane) สารสกัดหยาบที่จะนำมาแยกให้ไดสารบริสุทธิ์อาจละลายในตัวทำละลายโดยยาก ควรกรองสารละลายของสารสกัดหยาบเพื่อ แยกเป็นส่วนของตะกอนและส่วน ของสารละลาย (filtrate)หรือหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเป็น ส่วนของตะกอนและส่วนลอย (supernatant) นอกจากนี้ยังสามารถสกัดแยกส่วนของสารสกัดหยาบ ด้วยการใชตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เข้ากัน เช่น น้ำกับเอธิลอะซีเตต หรือคลอโรฟอร์มกับไดคลอโรมีเทนหรือเฮกเซน เป็นต้น โดยทำการสกัด ด้วยกรวยแยก จากนั้นจึงนำแต่ละ ส่วนมาแยกให้บริสุทธิ์ ต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดอื่น หรือ แยกบางส่วนของสารที่แยกได้นั้นมาทดสอบฤทธิ์ทาง ชีวภาพก่อนที่จะแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. pKa

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

3. ความคงตัวต่อความร้อน

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

4. ขนาดโมเลกุล

การแยกสารอาจไม่ได้แยกตามความมีขั้วของสาร แต่อาจแยกตามขนาดของโมเลกุล(size) หรือน้ำหนักโมเลกุล ของสาร เช่น การแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติด้วย Sephadex LH-20 column พบว่าสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะถูกชะ ออกมาจากคอลัมน์ก่อนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเป็นต้น ทั้งนี้การแยกสารตามขนาดโมเลกุลจะมีประโยชน์อย่างมากเมื่อ สารที่เป็นองค์ประกอบในสารผสมมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันแต่มีขั้วใกล้เคียงกันมาก จึงทำให้แยกออกจากกันได้ยากเมื่อ ใช้ normal phase หรือ reverse phase แต่หากแยกสารเหล่านี้ด้วย Sephadex LH-20 ที่อาศัยหลักการแยกสารตามขนาด โมเลกุลจะสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ตามต้องการ ในบางครั้งโปรตีนที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเขามารบกวนกระบวนการแยกสาร อีกทั้งโปรตีนมักไม่คงตัวต่อความร้อนจึงสลายตัวกลายเป็นสารรบกวนได้ วิธีกำจัดโปรตีนออกจากสารสกัดทางชีวภาพมักทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เข้า กับน้ำได้ เช่น เมธานอล เมื่อทำสารสกัดในชั้นเมธานอลให้แห้งสนิท (ปราศจากน้ำ) แล้ว จึงจะสกัดสารสกัดที่ได้นั้นซ้ำอีกครั้ง ด้วยเมธานอลเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีโปรตีนติดมาด้วย เพราะโปรตีนจะละลายมากับน้ำในระหว่างกระบวนการสกัด นอกจากนี้ ยังสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้

วยการกรองผ่าน ultrafiltration membrane โดยไซแรงดันสูงยูทากาศหรือแรงหมุนเหวี่ยง ช่วยไล สารตัวอย่างใหญ่ผ่านไปบนแผ่นกรอง สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเท่านั้นที่จะสามารถผ่านรูของแผ่นกรอง ไปได้ สำหรับ โปรตีนซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่นั้นไม่สามารถผ่านแผ่นกรองไปได้ อย่างไรก็ตามสารที่จะ แยกด้วยวิธีนี้ได้อาจมีขนาดโมเลกุล ใหญ่กว่า 2000 amu สำหรับสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากจะต องแยกด้วยวิธีการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis)

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

5. สเตอริโอเคมี

สเตอริโอเคมี(Stereochemistry) เป็นวิชาเคมีที่เกี่ยวกับระยะอะตอมในโมเลกุล ซึ่งมีอิทธิพล ต่อการแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และการคนพบยา เนื่องจากในปัจจุบันมียาหลายชนิดที่จำหน่าย ทั่วโลกจัดเป็น chiral drug ดังนั้นเทคนิคในการแยก chiral compound จึงมีความสำคัญมากขึ้น

โดยทั่วไปสามารถแบ่งไอโซเมอร์ (isomer) ออกเป็นหลายชนิดดังแผนภาพที่ 1 นอกจากนี้ ยังสามารถแบ่ง stereoisomer ออกเป็น 2 ชนิด คือ enantiomer และ diastereomer โดยที่ enantiomer คือ โมเลกุลที่เป็นภาพกระจกเงา (mirror image) ซึ่งกันและกัน เนื่องจาก enantiomer ทั้งสองมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ เหมือนกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถแยก enantiomer ออกจากกันด้วยวิธีกาณาคคขที่ชนิด conventional reversed-phase stationary phase ได้ สำหรับ diastereomer ซึ่งโมเลกุลทั้งสองไม่ได้เป็น ภาพกระจกเงาซึ่งกันและกันนั้น มี คุณสมบัติทาง เคมีและกายภาพแตกต่างกันบาง จึงสามารถแยกออกจากกันด้วย conventional stationary phase ได้ นอกจากนี้ยังสามารถแบ่ง diastereomer ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ optically active isomer และ non-optically active geometric isomer โมเลกุลที่มี optical actiชนิดนี้ไม่มีสมมาตร (symmetry) ภายในโมเลกุล ไม่สามารถซ้อนทับ (superimpose) กับโมเลกุลที่เป็นกระ จกเงากันได้ โดยทั่วไปโมเลกุลชนิดนี้จะมีหมูแทนที่โดยรอบ tetrahedral carbon atom ที่แตกต่าง กันทั้ง 4 หมู ซึ่ง chiral molecule ของ lactic acid ที่มี central stereogenic center จะไม่มี ระนาบสมมาตรภายในโมเลกุล (internal symmetry plane) (รูปที่ 1) ดังนั้น lactic acid จึงมี chiral enantiomeric form 2 แบบ ในทางตรงกันข้าม propanoic acid ซึ่งมีระนาบสมมาตรภายใน โมเลกุลจัดเป็น achiral molecule ความแตกต่างระหว่าง enantiomer ทั้งสอง คือ มีปฏิกิริยากับ chiral molecule ชนิดอื่นได้แตกต่างกัน และมี คุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกันด้วย จึงเป็ นเหตุให้มี optical activity ในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ (plane polarized light) ได้แตก ต่างกัน อย่างไรก็ตาม enantiomer ทั้งสองยังคงมีคุณสมบัติบางอย่างที่เหมือนกัน (identical) เช่น จุดหลอมเหลว การละลาย และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปบางชนิด เป็นต้น ในปัจจุบันนิยมแยก enantiomer ให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC นอกจากนี้การแยก chiral drug ในเชิงอุตสาหกรรมจะนิยมใช้ simulated moving bed (SMB) chromatography โดยการทำให้เกิด diastereomeric complex จากนั้นจึงแยกต่อไปด้วย conventional reversed-phase chromatography หรือคอลัมน์ที่บรรจุ immobilized chiral stationary phase (CSP)

2.3.2 การเลือกตัวทำละลาย

รัตนา อินทรานุกุล (2547 : 83-84) กล่าวถึงการเลือกตัวทำละลายสรุปได้ดังนี้

1. ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายมีความสำคัญมากที่สุด ซึ่งจะทำให้ทราบว่าสารที่ต้องการละลายหรือไม่ละลายในตัวทำละลายชนิดใด เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งมีโครงสร้างสลับซับซ้อนมากน้อยต่างกันและมีอยู่ในพืชทั้งในสภาพอิสระและรวมตัวกับสารอื่นๆ ในสภาพเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นควรพิจารณาถึงสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญที่ต้องการสกัด นอกเหนือจากควมมีขั้วของสารสำคัญดังกล่าว ในการเลือกตัวทำละลายมีหลักการทั่วไปว่า สิ่งที่มีเหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน (Like dissolve like) เช่น คุณสมบัติสารสำคัญมีขั้วก็ควรเลือกตัวทำละลายหรือตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกันในสารสกัด

2. ความคงตัว

ตัวทำละลายมีความคงตัว หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. การระเหย

ตัวทำละลาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4. สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด

สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด เช่นเมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.3.3 วิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุกุล (2547 : 85-89) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. มาเซอเรชัน

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

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

การสกัดแบบมาเซอร์ชันใช้เวลาานาน จึงมีผู้ดัดแปลงใช้มิกเซอร์ (mixer) หรือโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) มาช่วยทำให้เซลล์พืชแตกออกมาก่อนทำการสกัด เพื่อลดระยะเวลาการสกัด ต่อมาพัฒนาใช้เสียงที่มีความถี่สูงเกิน 20,000 เฮิร์ตซ์ ร่วมในการสกัดเรียกวิธีนี้ว่า การสกัดอัลตราซาวนด์ (ultrasound extraction) แต่วิธีหลังนี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำไปเป็นเพอร์ออกไซด์ ซึ่งอาจมีผลต่อการสกัด นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ต่อสารโดยตรง เพราะขณะที่ใช้การสกัดอัลตราซาวนด์ทำให้เกิดช่องว่างและมีอากาศแทรกเข้าไปในตัวทำละลาย

2. เพอร์โคเลชัน

เพอร์โคเลชัน (Percolation) เป็นการปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายสารสำคัญออกมาโดยใช้เครื่องเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) วิธีการทำเพอร์โคเลชัน คือนำผงสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายก่อน 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุลงในชั้นลงในเพอร์โคเลเตอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (column) ปลายเปิดทั้ง 2 ด้าน โดยด้านบนจะกว้างกว่าด้านล่าง เพื่อความสะดวกในการบรรจุผงสมุนไพร ส่วนปลายด้านล่างปิดเปิดได้ เพื่อที่จะสามารถควบคุมอัตราการไหลของสารสกัดหรือเพอร์โคเลตจากเพอร์โคเลเตอร์ได้ เติมตัวทำละลายหรือตัวทำละลาย (menstruum) ลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 0.5 cm ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วที่พอเหมาะ พร้อมกับเติมตัวทำละลายใหม่ลงไปเรื่อยๆ อย่าให้แห้งเก็บเพอร์โคเลตจนการสกัดสมบูรณ์โดยการตรวจสอบจากเพอร์โคเลตส่วนสุดท้าย นำเพอร์โคเลตที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

วิธีเพอร์โคเลชันจัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารจะใช้เพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายตัว และให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าหากัน

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง

การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction) โดยการใช้ซอกซ์เลตเอ็กแทรกเตอร์ (soxhlet extractor) ซึ่งเป็นระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ เมื่อได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ ตัวทำละลายจะผ่านผงสมุนไพรซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดออกมา เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (extracting chamber) สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปภาชนะวนเวียนเช่นนี้ จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลืองแต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และตัวทำละลายที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของตัวทำละลายแตกต่างกันไปจากเดิม 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 วิธีเอคิเวล (ecuelle method) ซึ่งใช้กับน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม (citrus oil) โดยเอาผลไปบีบบนรางที่มีเข็มแหลมๆ อยู่เข็มต้องยาวพอที่จะแทงผ่านผนังชั้นนอก (epidermis) เพื่อให้ต่อมน้ำมันแตกออกมา น้ำมันจะหยดลงไปบนรางซึ่งเก็บน้ำมันได้

4.3 วิธีเอ็นฟอยเรนซ์

วิธีเอ็นฟอยเรนซ์ (enfleurage) 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 แอซีโตน (acetone) เมทานอล แอลกอฮอล์ เป็นต้น วิธีนี้จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการกลั่นที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลง และมีกลิ่นผิดไปจากธรรมชาติได้ จึงนำวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ต้นทุนการผลิตสูงกว่าวิธีการกลั่น

2.3.4 การเลือกวิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุกุล (2547 : 90) กล่าวถึงการเลือกวิธีการสกัดสรุปได้ดังนี้ การสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรหลายวิธี โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลายๆ อย่าง ได้แก่

1. ธรรมชาติของสมุนไพร โดยพิจารณาดังนี้

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

1.2 ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในตัวทำละลาย ถ้าละลายได้ง่ายใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้ยากใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

1.3 ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด

หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีง่ายๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. ความต้องการการสกัด

หากต้องการสารสกัดเจือจาง ควรใช้วิธีมาเซอเรชัน แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

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

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาณมากและเจือจาง 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 นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญ 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 โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับ สารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

3. การทำให้แห้ง

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

4. อัลตราฟิลเทรชัน

อัลตราฟิลเทรชัน (ultrafiltration) เป็นการนำสารสกัดด้วยน้ำ ทำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000

2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

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

สารที่พบในพืชประกอบด้วย สารปฐมภูมิ (Primary Constituents) และสารทุติยภูมิ (Secondary Constituents) สารปฐมภูมิประกอบด้วยแป้ง โปรตีน ไขมัน เซลลูโลส ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารที่พืชสร้างจาก Intermedial basic metabolism มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ มีโครงสร้างง่าย ๆ 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 ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ แอลคาลอยด์ส่วนมากมีผลต่อความว่องไวเชิงสรีรวิทยา เช่น อะโทรเพน (Atropine) โคเคน (Cocaine) มีสมบัติคล้ายสารเสพติด และเป็นยาแก้ปวด ควินิน (Quinine) รักษาโรคมาลาเรีย

2. ไกลโคไซด์

ไกลโคไซด์เกิดจาก aglycone หรือ genin จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycone part) ละลายน้ำได้ดี ไกลโคไซด์จำแนกตามโครงสร้างของ aglycone ได้หลายประเภท เช่น คาร์ดิเอ็กไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Antraquinone glycosides) ซาโปนินไกลโคไซด์ (Saponin glycosides) ไซยาโนเจนนิติกไกลโคไซด์ (Cyanogenetic glycosides) ไอโซไทโอไซยาเนทไกลโคไซด์ (Isothiocyanate glycosides) ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycoside) แอลกอฮอล์ไกลโคไซด์ (Alcoholic glycosides)

3. แทนนิน

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

4. ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่มีสีเช่นสารสีแดง (carthamim) จากดอกคำฝอย สารสีเหลือง (luteolin) จากดอกสายน้ำผึ้ง

5. สเตอรอยด์

สเตอรอยด์เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมนและยาต้านอักเสบ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยา

6. เทอร์ปีนอยด์

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

7. น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย เป็นของเหลวมีกลิ่นหอมเฉพาะ ระเหยได้ในอุณหภูมิห้อง เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำหรือการบีบใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง และ สมุนไพร และใช้ขับลม ฆ่าเชื้อโรค

8. ยางไม้

ยางไม้เป็นของเหนียวที่พบในพืช จะไหลออกมาเมื่อพืชถูกกรีด บางชนิดนำมาใช้ในการเตรียมยาจำพวกอิมัลชันในทางเภสัชกรรม เช่น กัมอะเคเซีย (gum acacia) และกัมทรากาคานท์ (gum tragacanth)

9. สารอื่นๆ

ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เอ็นไซม์ วิตามิน เรซิน และบาลซัม

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 19-55) และชุตินา ลี้มัทธาภิรัตน์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนาราช และคณะ. 2551 : 78-80) กล่าวโดยสรุปดังนี้

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหล่านี้ไม่จำเพาะเจาะจง และการให้ผลบวกก็เป็เพียงการบอถึงประเภทของสารผลิตภัณฑ์บางชนิดเท่านั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสร้างคล้ายกันแต่เป็นสาร

ต่างกลุ่มกันจะให้ผลบวกลงในอีกแง่หนึ่งการให้ผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเข้มข้นต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไม่พอต่อการตรวจสอบด้วยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี ดังนี้

2.5.1 การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการเกิดตะกอน

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

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรต

ใช้ปฏิกิริยามอลลิช (Molisch's test) การเกิดวงแหวนสีม่วงแดงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลวกับ Molisch reagent การตรวจสอบสมบัติการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing agent) ของโมโนแซคคาไรด์ และไดแซ็กคาไรด์ ใช้สารละลายเฟห์ลิง (Fehling's solution) ถ้ามีจะเกิดตะกอนแดงของคิวปรัสออกไซด์ (cuprous oxide)

การตรวจสอบน้ำตาลดีออกซี (deoxysugar) ใช้ปฏิกิริยาเคอเลอชคิเลียนี (Keller-Kiliani test) โดยละลายน้ำตาลในกรดน้ำส้มที่มีสารเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) ละลายอยู่เล็กน้อยเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถ้ามีน้ำตาลดีออกซีจะเห็นสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้นตรงรอยต่อของชั้นสารละลายและจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

2. กลุ่มแอลคาลอยด์

อัลคาลอยเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล true alkaloids ต้องมีไนโตรเจนอยู่ใน heterocyclic ring และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนสามารถตรวจสอบด้วยน้ำยาทดสอบเบื้องต้น เช่น Dragendorff's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีแดงอิฐหรือสีส้ม Kraut's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีส้มน้ำตาลแดง Marme's reagent (potassium cadmium iodide) เกิด ตะกอนสีขาว และ Hager's reagent (picric acid) เกิดตะกอนสีเหลือง ทั้งนี้สารที่ใช่ตรวจสอบอัลคาลอยด์ เช่น Mayer reagent, Dragendorff reagent, Wagner reagent และ Ammonium reineckate จะให้ผลบวกลงกับ coumarins, polyphenols, purines, amino acids, proteins และ

สารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมักพบได้ในสาร สกัดจากพืช ในทางตรงกันข้ามอัลคาลอยด์ไม่ทุกชนิดที่อาจพบได้ในสารสกัดจากพืชจะให้ผลบวกกับสารทดสอบเหล่านี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างทางเคมี

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

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

1. Steroid nucleus ใช้วิธี Liebermann-Burchard test ให้สีฟ้าหรือเขียว สารทดสอบต้องแห้งและปราศจากน้ำ
2. Unsaturated lactone ring ตรวจสอบด้วย Kedde reagent หรือ Raymond reagent ให้สีม่วง น้ำเงิน หรือ Baljet reagent ให้สีส้ม-แดง
3. Deoxy sugar ตรวจสอบด้วย Keller-Kiliani test ให้วงแหวนสีม่วงแดงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลว ทั้งนี้สารประกอบหลายชนิดในกลุ่ม sesquiterpene lactones และ cardiacglycosides ที่มีโครงสร้าง เป็น unsaturated lactones จะให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย Kedde reagent, Baljet reagent และ Legal reagent

3.2 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์

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

3.3 กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยส่วนของ aglycone ของ anthraquinones และน้ำตาล ซึ่ง anthraquinones มีคุณสมบัติละลายได้ดีในด่าง แลวกเกิดเป็นสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึงไฮโดรไลส anthraquinone glycosides ด้วยกรดหรือด่าง หรือ FeCl_3 หรือ sodium dithionite ให้กลายเป็น aglycone ของ anthraquinones แลวจึงสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทดสอบกับด่างจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกว่า Borntrager test

3.4 กลุ่มไซยาโนจีนิกส์ไกลโคไซด์

ทดสอบด้วยวิธี Grignard test และ Guaiac-copper sulfate paper วิธีที่นิยมใช้กันมากคือวิธีที่ใช้กระดาษพิเครท เนื่องจากสามารถตรวจหากรดไฮโดรไซยานิกได้แม้ว่ามีปริมาณน้อยขนาด 1 ไมโครกรัมหรือต่ำกว่าได้ ในการตรวจหากรดไฮโดรไซยานิกมีข้อระวัง คือหากผลการตรวจสอบเป็นผลบวก มิได้หมายความว่าในพืชตัวอย่างนั้น มีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์อยู่เป็นองค์ประกอบเสมอไป พืชนั้นอาจจะมีไซยาโนจีนิกไลปิด (cyanogenic lipid) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ได้โดยเอนไซม์ไลเปส (lipase enzyme) ที่อยู่ในพืชนั้นและให้กรดนี้ออกมาหากผลการตรวจสอบให้ผลบวกตั้งแต่ช่วงเวลา 16-24 ชั่วโมง ในกรณีนี้กรดไฮโดรไซยานิกที่ถูกปล่อยออกมาส่วนใหญ่เกิดจากสารเคมีที่ระเหยได้ตัวอื่นๆ มากกว่าจะมาจากไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ สารเคมีเหล่านี้อาจเป็นพวกไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) หรือพวกอัลดีไฮด์ที่ระเหยได้ (volatile aldehydes) หรือแม้แต่พวกสารอินทรีย์ไทโอไซยาเนต (thiocyanates) และไนไตรต์ (nitrites) ก็ให้ผลบวกในการตรวจสอบเช่นเดียวกัน ฉะนั้นเวลาที่ถือว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกควรอยู่ในช่วง 15 นาทีถึง 3 ชั่วโมงเท่านั้น

การตรวจหาไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ในพืชตัวอย่างควรทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกันแต่ใช้ภาวะเงื่อนไขที่แตกต่างกัน เช่น หลอดทดลองหนึ่งมีการเติมเอนไซม์อิมัลชัน (emulsion) กับ (linamarase) ลงไป แต่อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องเติม เพื่อให้แน่ใจว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกจริงเนื่องจากพืชบางชนิดถึงแม้จะมีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบจริง แต่อาจขาดเอนไซม์ เบตา-กลูโคซิเดสรวมอยู่ในพืชนั้น จึงเติมเอนไซม์ทั้งคู่ลงในหลอดทดลองหลอดหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบกับจะช่วยให้การตัดสินใจว่าผลการตรวจสอบนั้นเป็นผลบวกจริง

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 จากนั้นศึกษาเอกลักษณ์ของไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ด้วยเปเปอร์โครมาโทกราฟีหรือกระดาษพิเครท (paper chromatography) ในระบบตัวทำละลาย (solvent system) ของบิวทานอล-กรดอะซิติก-น้ำ (butanol-acetic acid-water) จากนั้นฉีดพ่นด้วย 0.2 โมลาร์ของ ซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) และอบให้แห้งด้วย 0.2 โมลาร์ของ โพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) ถ้าหากเป็นไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ จะสังเกตเห็นจุดสีเหลืองปรากฏขึ้นบนพื้นสีแดง

3.6 กลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์

ฟลาโวนอยด์แบ่งออกเป็น typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids การตรวจสอบสารในกลุ่มนี้ ทำได้ดังนี้

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

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

3. Ferric chloride ($FeCl_3$) test เป็นการตรวจสอบ phenolic group ในโครงสร้าง ซึ่งพบได้ใน flavonoids, tannins, coumarins, quinones และสารที่ประกอบด้วย phenolic group ผลบวกจะเกิดตะกอนหรือสารละลายมีสีเขียว น้ำเงิน หรือดำ

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

5. Molisch's test เป็นการทดสอบสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต หากพบน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ glycosides จะพบวงแหวนสีม่วงที่รอยต่อระหว่างชั้นของเหลว และในบางครั้งพบสีม่วงกระจายอยู่ทั่วไปในชั้นกลางที่เป็นชั้นกรดซัลฟิวริก เขมข้น

6. การตรวจสอบโดยใช้สารละลายกรดและด่าง จะพบว่าฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงสีไปตามสภาพความเป็นกรดหรือด่าง หากเป็นสารกลุ่ม anthocyanins เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สีม่วง หรือน้ำเงิน หากเป็นสารกลุ่ม chalcones และ aurones เมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะให้สีแดง และในสภาวะด่างจะให้สี ส้มหรือแดง ทั้งนี้สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะให้ผลบวกกับ Shinoda test และกรดซัลฟิวริก ในขณะที่สารพวก polyphenols ชนิดอื่นก็สามารถให้ผลบวกตรงกับสารทดสอบเหล่านี้ด้วย

4. กลุ่มคูมาริน

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

5. กลุ่มแทนนิน

แทนนิน เป็นสารจำพวก polyphenols แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1). hydrolyzable tannins ที่โครงสร้างทางเคมี ประกอบด้วย phenolic acids และน้ำตาล เมื่อต้มในกรดหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์จะกลายเป็น กรดและน้ำตาล 2). condensed tannins มีโครงสร้างเป็น oligomer หรือ polymer ที่มี monomer เป็น catechins (flavan-3-ol) ซึ่งอาจจัดเป็น proanthocyanidins

ของ flavonoids เมื่อนำไปต้มกับกรดจะเกิดตะกอนสีแดงที่เรียกว่า phlobaphene จึงเรียกสารเหล่านี้ว่า phlobatannins และ 3). pseudotannins เป็นสารเชิงเดี่ยวมีขนาดโมเลกุลเล็ก แทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานและ ตกตะกอนอัลคาลอยด์ได้ จึงทำให้อัลคาลอยด์หมดฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแทนนินอาศัยการเกิดตะกอนระหวาง แทนนินกับ gelatin, lead acetate, zinc acetate หรืออัลคาลอยด์ ได้ดังนี้

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

2. การตรวจสอบด้วย bromine water หากเป็น condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine water

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

4. การตรวจสอบด้วย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น พบว่า condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. กลุ่มเทอร์พีนอยด์

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

2.5.2 การตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

รัตนา อินทรานุกุล (2547 : 77-79) กล่าวไว้สรุปได้ดังนี้

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

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

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

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ (anthraquinone glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene : chloroform) 9:11 หรือ โทลูอีน : แอซี โทน :คลอโรฟอร์ม (toluene : acetone :chloroform) 40:25:35 หรือ แอซีเทต : เมทานอล : น้ำ(ethyl acetate:methanol:water) 100:13.5:10	ปฏิกิริยาบอนเทรเกอร์ (Borntraeger reaction) แอนทราควิโนนให้สีแดงหรือ เรืองแสงสีแดงเมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) 365 nm แอนทราควิโนน (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 หรือ โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene: chloroform) 9:11	เนเชอรัล โพรดักส์ (ไดฟีนิลโบรล ออกซี เอทิลลามีน) -พอลิเอทิลีนไกลคอล) (natural products (dephenylboryloxyethylamine)- polyethylene glycol) แล้วส่องดูด้วย แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) –ถ nm เรือง แสงสีเหลือง ส้ม หรือเขียว
คูมารินไกลโคไซด์ (coumarin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน :แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene :acetone: chloroform) 40 : 25:35 หรือ โทลูอีน:คลอโรฟอร์ม (toluene:chloroform) 9:11	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) หรือ แอมโมเนียมไฮดรอก ไซด์ (ammonium hydroxide) เรืองแสง สีน้ำเงินหรือเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm
อิริดอยด์ไกลโคไซด์ (iridoid glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : เอทิลแอซีเทต (toluene:ethyl acetate) 93:7 หรือ คลอโรฟอร์ม : กรดแอซีติก : น้ำ (chloroform : acetic acid : water) 80:10:5:2:6	กรดเกลือ-กรดแอซีติก (hydrochloric acid: acetic acid) ให้สีน้ำเงินหรือ น้ำตาล
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 เบน ซีน:ไดออกเซน : กรดแอซีติก 90:25:4	1% เมทานอลิกเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% methanolic ferric chloride) ให้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน
แทนนิน (tannin)	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (chloroform: methanol) 95:5 เอทิล แอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate:methanol :water) 77:15:8	กรดซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ให้สีแดง

ที่มา : รัตนา อินทรานุกรณ์. 2547 : 77-79

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

ซูติมา ลิ้มมัทวาริทธิ์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนารธา และคณะ. 2551 : 81-85) กล่าวโดยสรุปดังนี้

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

1. Solid phase extraction (SPE)

Solid phase extraction เป็นการแยกสารโดยให้สารที่สนใจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่สารที่ไม่สนใจหรือไม่ต้องการจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะสารที่สนใจให้ออกจากคอลัมน์ในภายหลัง โดยทั่วไปสารที่สนใจจะจับอยู่กับวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) ซึ่งเป็นสารดูดซับ (adsorbent) ที่มีรูปร่างเป็นเม็ดเล็ก (bead) หรือเรซิน (resin) ซึ่งอาจเป็น normal phase, reverse phase หรือ ion-exchange media ก็ได้ และสามารถบรรจุไว้ในคอลัมน์ได้ซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นไซริงค์ (syringe) ตัวอย่างเช่น นำสารที่สกัดด้วยน้ำมาแยกด้วย SPE ที่มีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase พบว่าสารที่มีขั้วต่ำจะติดอยู่ในคอลัมน์แต่สารที่มีขั้วสูงจะถูกชะออกมาก่อน จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำชะสารที่ติดอยู่ในคอลัมน์ออกมา ซึ่งสารที่ถูกชะออกมานี้ค่อนข้างจะบริสุทธิ์ ในปัจจุบันได้มีการนำ SPE ไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีขั้วต่ำ โดยสารที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำจะจับอยู่กับเรซินที่เป็น reverse phase การแยกสารโดยปรับความแรงของ eluting power ให้เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อชะสารออกมาเป็นลำดับตามความมีขั้ว ใช้ศึกษาความเหมือนกันของสารเนื่องจากสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันจะจับกับวัฏภาคคงที่ได้เหมือนกันและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนกันอีกด้วย จึงช่วยในการจัดสนใจว่าสารสกัดหยาบที่แยกด้วย SPE มาแล้วจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่เคยแยกได้หรือไม่ นอกจากนี้ยังใช้ SPE เตรียมสารปริมาณมากให้บริสุทธิ์ขึ้น หรือนิยมใช้แยกสารสกัดหยาบก่อนที่จะแยกต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิดอื่น ซึ่งการแยกในขั้นแรกด้วย SPE นี้เรียกว่า clean-up โดยจะแยกสารปนเปื้อนจำนวนมากออกไปจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สนใจ เช่น การใช้ SPE กำจัดสารที่มีขั้วจำนวนมากที่ไม่ต้องการและมีที่มาจาก buffer salt หรือส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ใช้ SPE ในการเตรียมสารให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยผ่านสารละลายที่เจือจางลงในคอลัมน์ SPE จากนั้นชะสารที่ต้องการซึ่งติดค้างอยู่บนคอลัมน์ให้ออกมาโดยใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อยๆ นิยมใช้ SPE เพื่อเตรียมสารในปริมาณน้อยมาก เช่น เมแทบอลิท์ของยาในตัวอย่างเลือด สารปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในน้ำทะเล และสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ให้บริสุทธิ์มากขึ้น ก่อนนำไปแยกต่อไปด้วยเทคนิคอื่นทางโครมาโตกราฟี

2. Thin layer chromatography (TCL)

Thin layer chromatography สามารถแยกออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของวัฏภาคคงที่ คือ normal phase TCL และ reverse phase TCL หากเป็น normal phase TCL สารที่มีขั้วต่ำจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วสูง ในขณะที่ reverse phase TCL สารที่มีขั้วสูงจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วต่ำ โดยทั่วไปนิยมทดลองแยกตัวอย่างด้วย TCL เพื่อหาค่า R_f ที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะทำการแยกจริงด้วย column chromatography (CC) ค่า R_f ที่ดีจะต้องเป็นค่าที่ไม่ทำให้สารที่สนใจติดค้างอยู่จุดเริ่มต้นหรือเคลื่อนที่ต่ำกลเกินไปจนใกล้หรือติดกับ solvent front เมื่อหาสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เหมาะสมแล้วจึงนำตัวอย่างที่ต้องการแยกในปริมาณสูงขึ้นมาแยกในคอลัมน์ต่อไป อย่างไรก็ตามไม่สามารถนำสภาวะหรือสัดส่วนขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จาก TCL มาใช้กับ CC ได้โดยตรง เนื่องจากคอลัมน์เป็นการเคลื่อนที่แบบสองทิศทางและมีสมดุลเกิดขึ้นในคอลัมน์ แต่ TCL นั้นมีสมดุลระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตลอดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อต้องการนำสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC ไปใช้ในการแยกสารด้วย CC จึงแนะนำให้ลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC ลงเล็กน้อย(ในกรณีวัฏภาคคงที่เป็น normal phase) และเพิ่มความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC มากขึ้นเล็กน้อย (ในกรณีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase) เพื่อให้การแยกสารในคอลัมน์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

$$R_f = \text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่} / \text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}$$

โดยทั่วไปมักใช้ TLC ร่วมกับ densitometric detector เพราะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แยกสารได้รวดเร็วสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสาร หรือใช้แยกสารเจือปนออกได้ นอกจากนี้ยังได้พัฒนามาเป็น high-performance TLC (HPLC) ซึ่งมีความหนาของวัฏภาคคงที่ที่บางลงและขนาดอนุภาคของวัฏภาคคงที่ที่เล็กลงด้วย จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดีขึ้น

3. Column chromatography (CC)

Column chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารที่ภายในคอลัมน์จะบรรจุวัฏภาคคงที่ชนิดต่างๆ เอาไว้ เมื่อบรรจุ (load) สารตัวอย่างที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ไปบนคอลัมน์แล้ว จึงจะสารออกจากคอลัมน์ตามแบนด์ (band) ที่ปรากฏอยู่ในคอลัมน์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมต่อไป

การแยกสารตัวอย่างในคอลัมน์ออกเป็นแบนด์อาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีซึ่งหมายถึงการกระจาย (distribution) ของสารระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคคงที่ ดังสมการต่อไปนี้

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

ความสามารถในการแยกสารเกิดจากอันตรกิริยา (interaction) ของสารกับวัฏภาคคงที่และการแย่งกันจับกับวัฏภาคคงที่ระหว่างสารกับวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว และวัฏภาคเคลื่อนที่อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ ซึ่งจัดเป็น liquid chromatography (LC) และ gas chromatography (GC) ตามลำดับ นิยมใช้ GC โดยเฉพาะ Gas-liquid chromatography

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

การดูดซับ (adsorption) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของโมเลกุลระหว่างผิวหน้าของวัฏภาคคงที่กับวัฏภาคเคลื่อนที่ ณ ที่สมดุลพลวัต (dynamic equilibrium) ซึ่งจะมีสารเข้าและออกระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ในปริมาณที่เท่าๆ กัน เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่าการดูดซับ (sorption) และการคาย (desorption) ตามลำดับ โดยอาศัยแรงทางพันธะเคมีที่เป็นแรงอ่อนๆ 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 จึงทำให้เกิดการสกัดระหว่างชั้นของของเหลว (liquid-liquid extraction) ซึ่งเป็นข้อดีของการแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ก็มีข้อเสียคือวัฏภาคคงที่ที่เป็นของเหลวจะถูกชะออกไปจากคอลัมน์พร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ และเกิดการละลายของวัฏภาคคงที่ไว้

โดยทั่วไปแล้ววัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวมักเกิดพันธะเคมีกับตัวรองรับที่เฉื่อย (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 18 คาร์บอน ดังนั้น bonded phase chromatography หรือ modified partition chromatography จึงเป็นการแยกสารที่อาศัยหลักการร่วมกันระหว่างการแยกส่วน (partition) และการดูดซับ (adsorption) สำหรับความแตกต่างระหว่าง normal phase กับ reverse phase คือ normal phase มีวัฏภาคคงที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น silica column มี silanol group ที่มีขั้วสูงกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ในขณะที่ reverse phase จะมีวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ เช่น สายไฮโดรคาร์บอนที่สร้างพันธะกับ silica support เป็นเสมือนวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำและมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำที่มีขั้วสูง ซึ่งอาจผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น เมทานอล หรืออะซิโตนไนไตรต์ (acetonitrile) อย่างไรก็ตาม หากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กำลังแยกอยู่นั้นมีขั้วต่ำและไม่ชอบน้ำ มันจึงอาจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ได้ ดังนั้นจึงแนะนำให้ติดตามการชะสารออกจาก

คอลัมน์โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่อยู่ในส่วนสกัดต่างๆ ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสารใดติดค้างอยู่ในคอลัมน์

ประจุ (charge) สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดเมื่อมีการปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของสารละลายด้วยกรดหรือด่างอาจทำให้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นถูกเปลี่ยนแปลงไปให้อยู่ในรูปของ ไอออนบวกหรือลบได้ ดังนั้นจึงนำคุณสมบัติการแตกตัวเป็นไอออนนี้มาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ดังต่อไปนี้

3.1 Ion-exchange chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารที่วัฏภาคคงที่ประกอบด้วยเมทริกซ์ที่ไม่ละลาย (insoluble matrix) บนผิวหน้ามีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นประจุลบหรือบวก ซึ่งหมู่ฟังก์ชันนี้จะสัมพันธ์กับ ไอออนตรงข้าม (counter-ion) ที่มีประจุตรงกันข้าม หลักในการแยกสารขึ้นอยู่กับความสามารถของ ไอออนสารตัวอย่างที่แข่งขันกับไอออนตรงข้ามในการเข้าจับกับวัฏภาคคงที่ เรียกระบบที่มีวัฏภาคที่เป็นประจุลบและไอออนตรงข้ามเป็นประจุบวกว่า cation-exchange chromatography และเรียกระบบที่มีวัฏภาคคงที่เป็นประจุบวกและไอออนตรงข้ามเป็นประจุลบว่า anion-exchange chromatography การแยกสารที่เกิดขึ้นจากแต่ละโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันที่ ความแรงในการจับกับ exchange site จึงสามารถชะสารตัวอย่างออกมาตามลำดับโดยอาศัยการ เปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะการแตกตัวของสารที่มี ประจุ หรือการเพิ่ม ionic concentration ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลเพิ่มการแย่งจับที่ exchange site และมีผลไล่ที่ไอออนของสารตัวอย่าง ความสามารถในการจับของสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับ ธรรมชาติของไอออนสารตัวอย่างและหมู่ฟังก์ชันบน ion exchange resin ไอออนสารตัวอย่างที่จับ กับวัฏภาคคงที่ได้ดีจะอยู่ในคอลัมน์ได้นานและถูกชะออกมาช้ากว่า ในทางตรงกันข้ามไอออนสาร ตัวอย่างที่จับได้ไม่ดีจะมีถูกชะออกมาเร็วกว่า

3.2 Ion-pair chromatography / ion-suppression chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารที่สามารถแยกไอออนสารตัวอย่างได้ด้วยวัฏภาคคงที่มีขั้ว ต่ำ เช่น reverse phase modified partition column โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาค เคลื่อนที่เพื่อลดการแตกตัวเป็นไอออนของโมเลกุลสารตัวอย่าง ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างมีความ เป็นกลาง(ไม่มีขั้ว) และสามารถจับกับวัฏภาคคงที่ที่ไม่มีขั้วได้ ในทำนองเดียวกัน ion-pair chromatography จะมีวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยโมเลกุลสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ สามารถแตกตัวได้ (ionizable group) และมีส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic region) ซึ่งทำหน้าที่เป็น ไอออนตรงข้าม (counter-ion) ที่จะทำให้เกิด reversible ion-pair กับสารตัวอย่าง โดยมี ionic modifier ทำหน้าที่จับคู่ (pairing) กับไอออนสารตัวอย่าง ในสารละลายแล้วทำให้เกิดสปีชีส์ที่ไม่มีขั้ว ที่สามารถแยกส่วน (partition) เข้าไปในวัฏภาคคงที่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุแล้วเกิดเป็นคู่ไอออน (ion-pair) กับสารตัวอย่างได้ ข้อดีของเทคนิคนี้คือใช้แยกสารตัวอย่างที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ในระบบ เดียวกัน

ขนาด (size) โครมาโทกราฟีที่แยกสารตามขนาดของโมเลกุลนั้นจะไม่อาศัยการจับกันระหว่างสารตัวอย่างและวัฏภาคคงที่ การแยกสารด้วยเทคนิค size exclusion chromatography จะครอบคลุมถึง gel permeation chromatography และ gel filtration ซึ่งมีลักษณะของ packing material เป็นเม็ดเล็ก (bead) ที่ทำจากโพลีเมอร์ เช่น polyacrylamide, agarose หรือ silica โดยมีระดับของ polymer crosslinking ช่วยควบคุมความพรุนของเม็ดเล็กเหล่านี้ โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนได้และจะถูกชะออกมาก่อน ในขณะที่โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้ โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่สุดจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดเล็กที่สุดได้ ที่วางใน cross-linked polymer ทำหน้าที่เสมือนวัฏภาคคงที่ ซึ่งโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สุดจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดเล็กและไหลออกมาในทิศทางตรง ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างเม็ดเล็ก โมเลกุลที่มีขนาดรองลงมาจะมี diffusible volume มากกว่าทำให้ถูกชะออกมาได้หลายทิศทางและใช้เวลาในการชะออกมาจากคอลัมน์นานกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ โมเลกุลที่เล็กที่สุดสามารถแทรกเข้าไปในรูพรุนขนาดเล็กที่สุดได้และจะถูกชะออกมาทีหลังสุด size exclusion chromatography เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและไม่ทำลายโครงสร้างทางเคมีของสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการแยกชีวโมเลกุลที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันมาก เช่น ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออกจากเมแทบอลิท์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ามาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากเมแทบอลิท์ทุกชนิดมีขนาดโมเลกุลเล็กและมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้ size exclusion chromatography ในการแยกสารเหล่านี้ ทั้งนี้มีข้อยกเว้นสำหรับ Sephadex LH20 ที่ยังคงนิยมนำมาใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพราะมีข้อดีที่สามารถใช้กับวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ไม่ใช่น้ำ (nonaqueouse) 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 ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) และทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ ของผสมจะไหลผ่านคอลัมน์ โมเลกุลที่มีความชอบจับอย่างจำเพาะเจาะจง (specific affinity) กับลิแกนด์จะถูกจับอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่โมเลกุลอื่นที่ไม่มีความชอบจับอย่างจำเพาะเจาะจงจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ การชะสารทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและ/หรือองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ซึ่งจะทำให้แรงที่จับกันระหว่างสารตัวอย่างและลิแกนด์นั้นอ่อนลง โดยทั่วไปแล้วการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจะหมายรวมถึงการแยกสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นการแยกสารด้วยเทคนิคนี้จึงนับว่าเป็นแนวทางที่ดีในการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่อาศัยความจำเพาะเจาะจงทางชีวภาพ (biological specificity) อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกเมแทบอลิท์ทุกชนิดในปริมาณมากด้วย affinity chromatography เนื่องจากเทคนิคนี้ทำได้ยากและต้องใช้เวลาในการเตรียมลิแกนด์ที่เหมาะสมให้มีปริมาณเพียงพอต่อการแยกสารแต่ละครั้ง หากสารผสมเมื่อเริ่มต้นนั้นซับซ้อนเช่นในกรณีสารสกัดหยาบจากพืชหรือจุลินทรีย์ที่มีสารอื่นเข้ามาบรรจบกันการแยกหรือขัดขวางการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์และลิแกนด์ (receptor-ligand interaction) หรือสารเหล่านี้เข้าไปดูดซับแบบไม่

จำเพาะเจาะจงกับวัตถุประสงค์ที่จะทำให้การแยกสารไม่สมบูรณ์ และยิ่งไปกว่านั้นการได้สารกลับคืนมา (recovery) จะขึ้นอยู่กับแรงที่จับกันอย่างผันกลับได้ ซึ่งการรบกวนของสารหลายชนิดอาจขัดขวางการได้สารกลับคืนมาด้วย

4. Gradient high performance liquid chromatography (Gradient HPLC)

Gradient high performance liquid chromatography เป็นเทคนิคการแยกสาร โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงความต่างระดับของความมีขี้ (gradient) ของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ตลอดเวลา เพื่อแยกของผสมและองค์ประกอบทุกชนิดให้ออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับความมีขี้ การชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย gradient elution มีข้อดีกว่า isocratic elution ซึ่งมีสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์คงที่ตลอดเวลา ตรงที่สามารถแยกสารที่มีขี้ใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถแยกสารที่มีขี้สูงและต่ำออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการคู่ต่อมากการใช้ประโยชน์ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหลายเป็นจำนวนมาก 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 มีข้อดีน้อยกว่าการแยกด้วย HPLC เนื่องจาก GC เหมาะสำหรับการแยกสารที่สามารถระเหยได้และทนต่อความร้อน หากสารที่ต้องการแยกระเหยไม่ได้จะต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ที่ระเหยได้เสียก่อน จึงทำให้มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและเสียเวลามาก ดังนั้นในปัจจุบันจึงมักพบว่า HPLC-MS เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหลายจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2546 : 56-65) กล่าวถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชกรรมและการใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษาสรุปได้ดังนี้

2.7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. คุณสมบัติทางสรีระวิทยาและทางเคมี เช่น การละลาย
2. คุณสมบัติทางเคมี เช่น เรโซแนนซ์ ปฏิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน ชนิดของพันธะเคมี
3. ข้อควรพิจารณา เช่น ขนาดของโมเลกุล สเตอริโอเคมี เป็นต้น

2.7.2 Bio-assaying

1. หลักในการคัดเลือกวัสดุจากพืชสมุนไพร เช่น การสกัดสารและการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารก่อนจะศึกษาผลทางชีวภาพ การวางแผนทางการดำเนินงานตามเงื่อนไขจากการประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในยาสมุนไพรและความเชื่อตามขนบธรรมเนียม การตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีววิทยา ชีวเคมี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีและกายภาพ

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

2.7.3 การสำรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนา

การศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความหลากหลายของผลทางชีวภาพและสูตรโครงสร้างของสรออกฤทธิ์และเป้าหมายด้านเภสัชกรรมในการบำบัดรักษาที่ชัดเจน โดยอาศัยการพัฒนาในหลายสาขาวิชา เช่น พันธุกรรม ชีวโมเลกุล วิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิคที่ทันสมัย

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชฎารัตน์ ดวงรัตน์ (2544) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองของ สารสกัดจากต้นกระทุ้งน้ำเพื่อวัดความเป็นพิษและบ่งชี้ส่วนของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการ เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบว่า สารสกัดหยาบ ที่เป็น Crude alkaloids สามารถยับยั้งการ เจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.62 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสูงกว่าสาร มาตรฐาน 5-FU ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.47 $\mu\text{g/ml}$

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

บุญส่ง คงคาทิพย์และคณะ (2545) ศึกษาการสกัด การแยกสารออกฤทธิ์จากต้นเบาหวาน เพื่อแยกสารออกฤทธิ์ที่มีผลในการรักษาโรคเบาหวานและหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์พบว่า allantoin เป็นสารหนึ่งในต้นเบาหวานที่ออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด และการนำต้นเบาหวานต้มด้วย น้ำ น้ำที่ต้มเมื่อต้มในปริมาณที่พอเหมาะ จะสามารถรักษาโรคเบาหวานได้

ปัทมาวดี เสตะกัณณะ. (2545) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย การผลิตยาต้านจุล ชีพจากสมุนไพรไทยเพื่อทราบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพร 10 วงศ์ 20 ชนิด จำนวน 48 สารสกัด โดย วิธี Agar dilution ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 21 ชนิด 24 สายพันธุ์ และเชื้อรา 1 สายพันธุ์ ผล การศึกษาพบว่า สมุนไพร 17 ชนิด จำนวน 35 สารสกัด มีฤทธิ์ต้านจุลชีพบางชนิดได้ และไม่พบสาร สกัดจากสมุนไพรใดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ทุกชนิด ในจำนวนนี้มีสมุนไพร 7 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ หลายชนิด และสมควรนำไปศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตยา ได้แก่ กะเม็ง (Eclipta prostrata L.), กระจับแดง (Hibiscus sabdariffa L) , โด่ดอกขาว (Elephantopus mollis H.B.K.) , ป๊อบ (Millingtonia hortensis L.f.) , ผักขมหิน (Boerhavia diffusa L.) , ยมหิน (Chukrasia tabularis A. Juss.) และเหงือกปลาหมอ(Acanthus ebracteatus Vahl)

ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และคณะ (2546) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี โดยจากการนำ สารสกัดจาก เอทิลแอลกอฮอล์ และ เอทานอล 22 ชนิด ซึ่งได้มาจากพืชในจังหวัดอุบลราชธานี 11 ต้น นำมา ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สิ่งสกัด จากใบพอกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลางในการต้านอนุมูลอิสระ และสิ่งสกัดจากเอทานอลของใบ การเวก มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

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

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

สรศักดิ์ เหลี้ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี้ยวไชยพันธุ์ (2548) ศึกษาการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแคว้นป่า โดยใช้วิธี DPPH และ เทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC) พบว่าสารสกัดเมทานอลของผลมะแคว้นป่ามีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายชนิด การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ใช้คอลัมน์ซิลิกาเจลและคอลัมน์ของเรซิน Diaion HP-20 ตามลำดับ พบว่าสามารถแยกสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยการใช้คอลโรฟอร์มต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 70 : 30 และสารต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้เป็นสารประกอบพวก Condensed tannin

เชษฐ รัตนจารย์ (2548) ศึกษาผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดไพลในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดี มีบริเวณยับยั้งระหว่าง 7.87-19.27 มิลลิเมตร แต่ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้น้อย ส่วนสารสกัดไพลชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเมทานอลยับยั้งแบคทีเรียได้ดี

พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิวของสารสกัดและน้ำหมักของพืชไทย พบว่าสารสกัดและน้ำหมักจากเปลือกมังคุด กระจ่างดำ มะขามป้อม มะเกี๋ยง ขมิ้นชันและใบบัวบก สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Propionibacterium acnes* ได้ดีแตกต่างกัน โดยสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม เปลือกมังคุด กระจ่างดำ ขมิ้นชัน ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม กัดเปลือกมังคุด ขมิ้นชัน กระจ่างดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มะขามป้อม กระจ่างดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุดเท่านั้น และเมื่อนำน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่

สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) โดยวิธี Broth dilution พบว่า ค่า MIC ของ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 1.5625 % และ *Propionibacterium acnes* เท่ากับ 6.25 %

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

Arunporn Itharat et al. 2004 ศึกษาเรื่อง In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer โดยทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 สายพันธุ์ด้วยพืชสมุนไพรไทย 11 ชนิดที่ใช้โดยหมอพื้นบ้านในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง ขั้นตอนการสกัดที่ใช้มีความคล้ายคลึงวิธีดั้งเดิมโดยสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ สารสกัดถูกนำมาทดสอบ มีพืชจำนวน 3 ชนิดและมีพืชในวงศ์ CELASTRACEAE แสดงผลต่อเซลล์มะเร็ง

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

Somtaneuk Chotchongchatchai et al. ศึกษาเรื่อง Medicinal plants used with Thai Traditional Medicine in modern healthcare services: A case study in Kabchoeng Hospital, Surin Province, Thailand พบว่ามีโรงพยาบาลใช้สมุนไพรในการรักษา 10 กลุ่มอาการของโรค ได้การรักษาความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ, กล้ามเนื้อและกระดูกผิดปกติของระบบ และความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ปัจจัยความสำเร็จคือการอำนวยความสะดวก การใช้จ่ายยาสมุนไพรที่โรงพยาบาล รวมถึงเข้าใจที่ถูกต้องของการใช้ยาสมุนไพร และมีการสนับสนุนของการเพาะปลูกสมุนไพร การเก็บ โดยได้รับการยอมรับจากคนในท้องถิ่น

Arunporn Itharat et al. 2004 ศึกษาเรื่อง In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer โดยทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 สายพันธุ์ด้วยพืชสมุนไพรไทย 11 ชนิดที่ใช้โดยหมอพื้นบ้านในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง ขั้นตอนการสกัดที่ใช้มีความคล้ายคลึงวิธีดั้งเดิมโดยสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ สารสกัดถูกนำมาทดสอบ มีพืชจำนวน 3 ชนิดแสดงผลต่อเซลล์มะเร็ง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดุกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนดำเนินการวิจัยดังนี้

- 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี
- 3.2 พืชและจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย
- 3.3 วิธีการทดลอง
- 3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล
- 3.5 ระยะเวลาทำการวิจัย
- 3.6 สถานที่ทำการทดลอง



3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
3. ตู้อบ
4. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
5. เครื่องทำแสง UV
6. เต้าไฟฟ้า
7. ชุดคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)
8. ชุด TLC
9. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
10. อัลตราไวโอเลต วิสเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer)
11. เครื่องวัดความชื้น (IR Sartorius Model รุ่น MA150C)
12. เครื่องวัดค่า พีเอช (pH-paper)
13. ตู้อบ (Hot air oven)
14. เต้าเผา (Furnace)

3.1.2 สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane)
2. เอทานอล (Ethanol)
3. เมทานอล Methanol
4. เอทิลอะซิเตต (Ethylacetate)
5. ไดคลอโรมีเทน (Dichlorometane)
6. อะซิโตน (Acetone)
7. ซิลิกาเจล
8. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)
9. BHT (2, 6 – ditertiary –butyl-4-methyl phenol)
10. BHA (Butylated hydroxyanisole)
11. โซเดียมซัลเฟต (Na₂SO₄ anhydrous)
12. กรดแทนนิก (Tannic acid)
13. กรดแกลลิก (Gallic acid)
14. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
15. สารละลายฟอล์ลีน (Folin ciocalteu reagent)
16. กลุ่มสารทดสอบพิษเคมี

3.2 พืชสมุนไพรและจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 พืชสมุนไพร

มะตุ๊ก ชื่อวิทยาศาสตร์ *Siphonodon celastrineus* Griff. จัดอยู่ในวงศ์ CELASTRACEAE สมุนไพรมะตุ๊ก มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ว่า ยายปลวก (สุราษฎร์ธานี), ไม้มะตุ๊ก (คนเมือง), บักโค้ก (เขมร-สุรินทร์) เป็นต้น

ต้น จัดเป็นพรรณไม้ยืนต้นขนาดกลาง ไม้ผลัดใบ ลำต้นมีความสูงได้ประมาณ 20-35 เมตร แตกกิ่งก้านทึบ เรือนยอดมีลักษณะกลมทึบ เปลือกต้นเป็นสีเทาอมดำแตกเป็นร่องตามยาว ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด การตอนกิ่ง และการปักชำกิ่ง จัดเป็นพรรณไม้กลางแจ้งที่เจริญเติบโตได้ดีในดินทุกสภาพ ชอบดินร่วนที่ระบายน้ำได้ดี มีแสงแดดเต็มวัน เป็นพรรณไม้ที่มักพบขึ้นตามบริเวณป่าราบป่าโปร่งที่ค่อนข้างชื้น โดยเฉพาะทางภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทย ที่ระดับความสูงไม่เกิน 800 เมตรจากระดับน้ำทะเล

ใบ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกัน ลักษณะของใบเป็นรูปค่อนข้างรีหรือรูปขอบขนาน ปลายใบแหลม โคนใบสอบแถบเข้าหากัน ส่วนขอบใบเป็นหยักหรือจักเป็นซี่ฟันตื้น ๆ จักห่างหรือแทบมองเห็นไม่ชัด ใบมีขนาดกว้างประมาณ 1-3.5 นิ้ว และยาวประมาณ 1.5-9 นิ้ว แผ่นใบค่อนข้างหนาคล้ายแผ่นหนัง ผิวใบด้านบนเป็นสีเขียวเข้ม เส้นแขนงใบมีข้างละ 6-10 เส้น ก้านใบยาวประมาณ 0.5-2 เซนติเมตร ใบอ่อนเป็นสีเขียวแก่ เมื่อแห้งแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอกหรือสีเขียวอมเทา

ดอก ออกดอกเป็นช่อกระจุกตามซอกใบ มีประมาณ 2-3 ดอก ก้านช่อดอกยาวประมาณ 0.5-1.5 เซนติเมตร ส่วนก้านดอกย่อยยาวประมาณ 5-11 มิลลิเมตร บางที่มีจุดสีน้ำตาลแดง ดอกเป็นสีขาวนวลหรือสีเหลืองอมส้ม กลีบดอกเป็นรูปไข่หรือรูปรี มี 5 กลีบ ซ้อนทับกัน มีขนาดกว้างประมาณ 1.7-2.5 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 2.2-3.5 มิลลิเมตร ปลายกลีบมน ส่วนกลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ โคนกลีบเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นรูปไข่หรือกึ่งกลม ค่อนข้างมน ยาวได้ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร กลางดอกมีเกสรเชื่อมติดกับกลีบดอกข้างใน ดอกมีเกสรเพศผู้ 5 อัน ก้านเกสรเพศผู้แบน ยาวได้ประมาณ 1 มิลลิเมตร เชื่อมติดกันที่ครึ่งหนึ่งหรือใกล้ ๆ โคนดอก ออกดอกในช่วงประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน

ผล ผลมีลักษณะเป็นรูปกลมหรือรูปรี ผลมีขนาดกว้างประมาณ 1-2.5 นิ้ว และยาวประมาณ 1.5-3 นิ้ว ผลอ่อนเป็นสีเขียว เมื่อแก่หรือสุกเต็มที่แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง ภายในมีเมล็ดรูปไข่หลายเมล็ด เป็นผลในช่วงประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ (<https://medthai.com>)



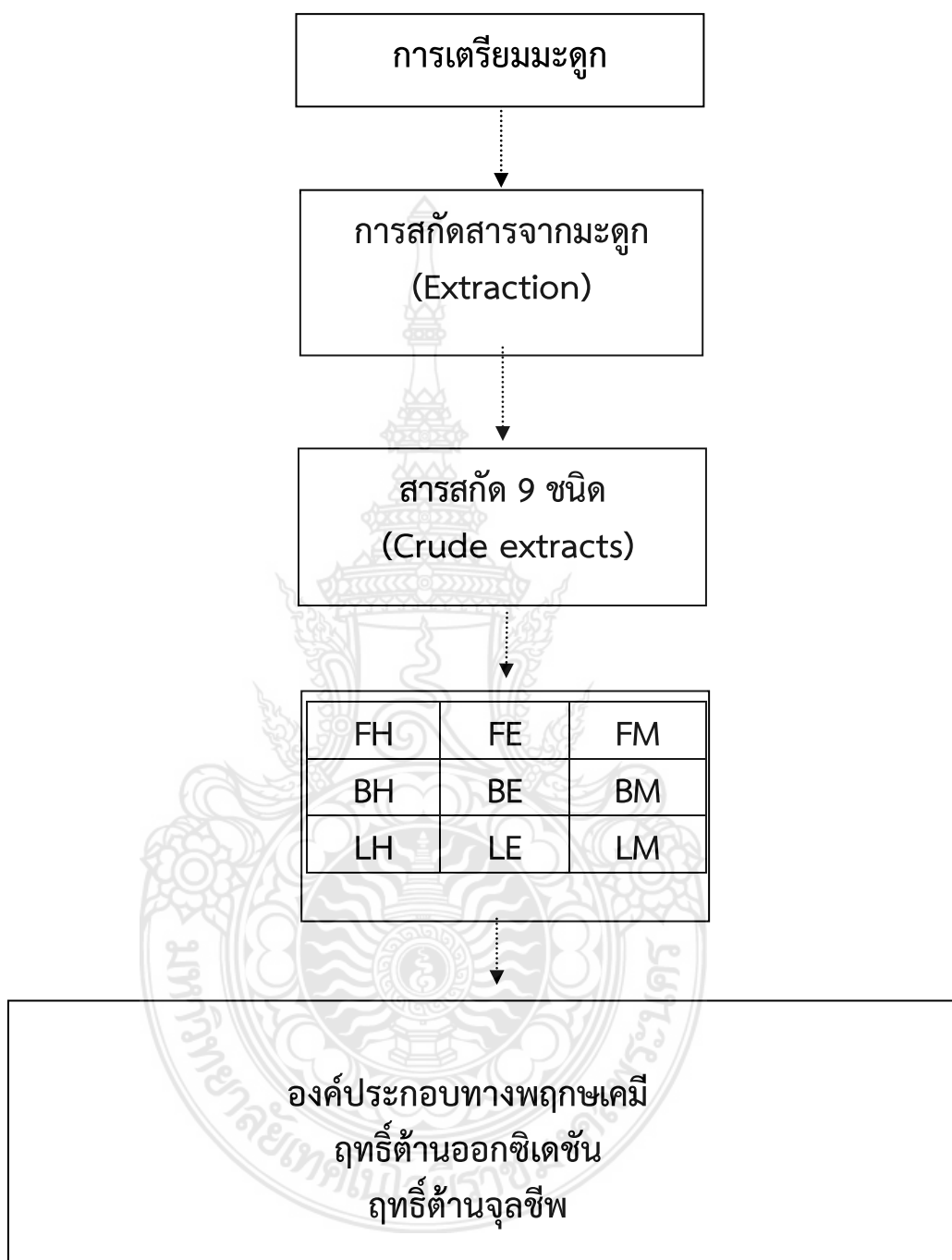
3.2.2 จุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. *Streptococcus mutans* ATCC27175
3. *Vibrio cholera*
4. *Vibrio paraheamolyticus*

ตารางที่ 3.1 ชนิด ลักษณะโดยทั่วไป และการก่อโรคของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

ชนิด	ลักษณะ	การก่อโรค
1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	แบคทีเรียทรงกลม เรียงตัว เป็นลักษณะ คล้ายพวงองุ่น แกรมบวก	เป็นสาเหตุของโรคฝี หนอง กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด กลุ่มอาการ ผิวน้ำแข็งกำพริ้าหลุดลอกหรือRitt's disease และอาหารเป็นพิษ
2. <i>Streptococcus mutans</i> ATCC27175	แบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก	เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในช่องปาก ทำให้เกิดโรคฟันผุ
3. <i>Vibrio cholerae</i>	แบคทีเรียรูปท่อนโค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอหิวาต์ตกโรค เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้เล็ก และสร้างสารพิษที่เรียกว่า cholera toxin บนเยื่อบุเซลล์ของผนังลำไส้ทำให้เกิดการขับเกลือแร่ โปแทสเซียม โซเดียมคลอไรด์ ไบคาร์บอเนต และน้ำออก จาก เซลล์สู่โพรงลำไส้ ทำให้ผู้ป่วยคลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วงอย่างรุนแรง
4. <i>Vibrio paraheamolyticus</i>	แบคทีเรียรูปท่อนโค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ กระจายอาหาร- ลำไส้อักเสบเชื่อนี้มักปนเปื้อนไปกับอาหารทะเลพวก กุ้ง ปู ปลา หอย จะเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุกๆ 10 ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ ทำให้มีอาการท้องร่วงรุนแรง มีอุจจาระเหลว เป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือน กุ้งเน่า มักมีอาการปวดเกร็งที่ท้อง ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมีอาการอาเจียนร่วมด้วย มีระยะฟักตัวค่อนข้างสั้น คืออาจเกิดอาการในประมาณ 15-24 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหาร

3.3 วิธีการทดลอง



รูปที่ 3.1 แผนผังขั้นตอนการทดลอง

การวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดุกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน โดยการนำผลมะดุก เปลือกมะดุกและใบมะพอกมาสกัดโดยนำมาหมักด้วยวิธี Maceration และทำการสกัดด้วยเทคนิค Sequential Extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extracts) ทั้งหมด 9 ชนิด แสดงดังตารางที่ 3.1 ประกอบด้วย สารสกัดหยาบจากผลชั้นเฮกเซน (FH) สารสกัดหยาบจากผลชั้นเอทิลเอซิเตต (FE) สารสกัดหยาบจากผลชั้นเมทานอล (FM) สารสกัดหยาบจากเปลือกชั้นเฮกเซน (BH) สารสกัดหยาบจากเปลือกชั้นเอทิลเอซิเตต (BE) สารสกัดหยาบจากเปลือกชั้นเมทานอล (BM) สารสกัดหยาบจากใบชั้นเฮกเซน (LH) สารสกัดหยาบจากใบชั้นเอทิลเอซิเตต (LE) และ สารสกัดหยาบจากใบชั้นเมทานอล (LM)

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ทั้งหมด

ส่วนที่ทดลอง	Crude extracts		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
Fruits	FH	FE	FM
Barks	BH	BE	BM
Leaves	LH	LE	LM

3.3.1 การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

1. ทำการเปรียบเทียบอนุกรมวิธานของพืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือมะดุกโดยรับรองพืชตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์ (Voucher Specimens)
2. นำผล เปลือก และใบของมะดุกมาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
3. นำผล เปลือก และใบของมะพอกที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender)

3.3.2 การสกัดสารจากตัวอย่าง

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากมะพอกใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูงคือ เฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมทานอล ตามลำดับดังนี้

1. นำผล เปลือก และใบของมะพอกที่บดละเอียดมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน 4 กิโลกรัม แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือ เฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน
2. นำของผสมมารองแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของชั้นเฮกเซน ซึ่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นต่อไป
3. ส่วนที่เป็นกากนำไปฝังลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลเอซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

3.3.3 การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี

นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้ไปทดสอบหากกลุ่มสารสำคัญ ดังนี้

1. Alkaloids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 5% HCl 20 ml อุณหภูมิ 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) ละลายใน น้ำ 20 ml อุณหภูมิ 15 นาที กรอง ถ้าขุ่นหยด 4-5 หยด 10% NaCl กรอง นำมาทดสอบกับ gelatin solution, gelatin salt solution, 1% FeCl₃, Br₂ water, Vanilin, 40% Formalin / HCl, และ Lime water

3. Triterpenes และ Steroids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายด้วย CHCl₃ 1-2 ml นำมาทดสอบวิธี Liebermann Burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H₂SO₄ 1 หยด ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

4. Flavonoids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน Petroleum 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. Anthraquinones สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 0.5 M KOH 10 ml แล้วเติม 3% H₂O₂ 1ml ต้มบนหม้ออังไอน้ำ 10 นาที กรอง ทิ้งให้เย็น หยด CH₃COOH จนเป็นกรด สกัด ด้วย C₆H₆ 10 ml นำมาทดสอบ Modified Borntragers test โดยนำชั้นของ C₆H₆ ไปหยด NH₃ T.S. ตั้งทิ้งไว้

6. Cardiac glycosides สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 10% Lead acetate 10 ml อุณหภูมิ 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง สกัดด้วย CHCl₃ 5ml 3 ครั้ง นำมาทดสอบวิธี Liebermann burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H₂SO₄ 1-2 หยด ลงใน หลอดทดลอง สังเกตสีที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพสำหรับโดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียและราในที่นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauerและคณะ(1966) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์)มีวิธีการทดสอบดังนี้ นำแบคทีเรียชนิดต่างๆที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar เพาะลงในอาหารเลี้ยง เชื้อชนิด Brain Heart Infusion Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ที่บ่มเพาะได้มาปรับความขุ่นที่ 660 นาโน เมตร เพื่อให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวน แบคทีเรีย 10⁵-10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำแบคทีเรียที่เตรียมได้ไปเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มี อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่ว 3 ครั้ง ทำให้ได้จาน อาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียชนิดต่างๆ บนหน้าวุ้น หลังจากนั้นนำแผ่นดิสต์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มี สารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DMSO(Dimethyl sulfoxide) (เจือจางลง 2 เท่า

ตามลำดับ) วางบนผิววุ้นที่มีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย แต่ถ้าเป็นราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของรา

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบด้วย สาร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยการนำสารสกัดมาทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ตามวิธีของ Brand-Williams และคณะ(1995) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์) มีวิธีการทดสอบดังนี้ นำสารละลายตัวอย่าง 100 ml ผสมกับ DPPH solution (4.5 mg DPPH in 100 ml absolute methanol) ปริมาตร 2.9 ml และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร DPPH ที่เหลือ ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยรายงานเป็นค่า EC₅₀ ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการลดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร DPPH เริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) เป็น positive control สารตัวอย่างและ BHT ละลายใน DMSO โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ตามวิธีของ Javanmardi และคณะ (2003) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์) มีวิธีการทดสอบดังนี้ นำสารสกัดที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (3 ซ้ำ) ผสมกับ Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 2.5 ml และสารละลาย Na₂CO₃ (7.5%, w/v) ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบฟีนอล รายงานเป็น มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ 1 กรัม

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละ

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2561 – 30 กันยายน 2562

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดุกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ทำการทดลองโดยใช้ เปลือก ใบและผลของมะดุกมาทำการแยกสารโดยการหมักและสกัดตามลำดับความเข้มข้นของตัวทำละลาย อินทรีย์จำนวน 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ ทั้งหมด 9 ชนิด นำมาทดสอบข้อมูลทางพิษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้ผลการทดลองดังนี้

- 4.1 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพิษเคมี
- 4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน
- 4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ



4.1 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี

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

จากตารางที่ 4.1 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี

1. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากเปลือกพบสารกลุ่ม alkaloids tannins phenolic compounds flavonoids steroids และ anthraquinones

2. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบพบสารกลุ่ม alkaloids tannins phenolic compounds flavonoids triterpenes steroids และ anthraquinones

3. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากผลพบสารกลุ่ม alkaloids phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides และ anthraquinones

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.2.1 ทดสอบด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

นำสารสกัดหยาบ จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือก ใบและผลของมะตูม มาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเรียงลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

สารสกัด	DPPH EC ₅₀ (µg/ml)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
Standard (BHT)	8.9		
เปลือก	> 1000	527	98
ใบ	> 1000	> 1000	137
ผล	> 1000	205	31

จากตารางที่ 4.2 การลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

1. สารสกัดจากเปลือกของมะตูมชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC₅₀ เท่ากับ 98 µg/ml
2. สารสกัดจากใบของมะตูมชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC₅₀ เท่ากับ 137 µg/ml
3. สารสกัดจากผลของมะตูมชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC₅₀ เท่ากับ 31 µg/ml

4.2.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

นำสารสกัดหยาบ จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือก ใบและผลของมะดุก มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

สารสกัด	Total Phenolic (mg GAE/g dw)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
เปลือก	5.25	25.77	71.87
ใบ	4.91	12.59	48.11
ผล	7.89	31.63	95.23

จากตารางที่ 4.3 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดุกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 71.87 mg GAE/g dw
2. สารสกัดจากใบของมะดุกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 48.11 mg GAE/g dw
3. สารสกัดจากผลของมะดุกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 95.23 mg GAE/g dw

4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะตูมที่ได้สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC) ของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 4 ชนิด ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.4 - 4.6

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพจากเปลือกของมะตูม

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกของมะตูม

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	125.00	31.25	15.60
2	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 27175	31.25	125.00	125.00
3	<i>Vibrio cholerae</i>	>1000	1000	1000
4	<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	1000	31.25	7.80

จากตารางที่ 4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกของมะตูม

1. สารสกัดจากเปลือกของมะตูมที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 $\mu\text{g/ml}$
2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะตูมด้วยเอทิลแอซิเตต แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 $\mu\text{g/ml}$
3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะตูมด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 $\mu\text{g/ml}$

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพจากใบของมะตูม

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบของมะตูม

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	125.00	250	250
2	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 27175	1000	125.00	1000
3	<i>Vibrio cholerae</i>	31.25	31.25	125.00
4	<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	125.00	125.00	1000

จากตารางที่ 4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบของมะตูม

1. สารสกัดจากใบของมะตูมที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 $\mu\text{g/ml}$
2. สารสกัดจากใบของมะตูมด้วยเอทิลแอสซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 $\mu\text{g/ml}$
3. สารสกัดจากใบของมะตูมด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125.00 $\mu\text{g/ml}$

4.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพจากผลของมะดุก

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากผลของมะดุก

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	31.25	31.25	125.00
2	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 27175	>1000	1000	1000
3	<i>Vibrio cholerae</i>	1000	125.00	1000
4	<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	125.00	15.60	>1000

จากตารางที่ 4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากผลของมะดุก

1. สารสกัดจากผลของมะดุกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 $\mu\text{g/ml}$
2. สารสกัดจากผลของมะดุกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 $\mu\text{g/ml}$
3. สารสกัดจากผลของมะดุกด้วยเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125.00 $\mu\text{g/ml}$

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดุกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ ดังนี้

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี

1. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากเปลือกพบสารกลุ่ม alkaloids tannins phenolic compounds flavonoids steroids และ antraquinones
2. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบพบสารกลุ่ม alkaloids tannins phenolic compounds flavonoids triterpenes steroids และ antraquinones
3. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากผลพบสารกลุ่ม alkaloids phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides และ antraquinones

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

5.1.2.1 การทดสอบ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดุกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50} เท่ากับ 98 $\mu\text{g/ml}$
2. สารสกัดจากใบของมะดุกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50} เท่ากับ 137 $\mu\text{g/ml}$
3. สารสกัดจากผลของมะดุกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50} เท่ากับ 31 $\mu\text{g/ml}$

5.1.2.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดุกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 61.87 mg GAE/g dw
2. สารสกัดจากใบของมะดุกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 48.11 mg GAE/g dw
3. สารสกัดจากผลของมะดุกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 95.23 mg GAE/g dw

5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดุก

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดุกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 µg/ml
2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดุกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 µg/ml
3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดุกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 µg/ml

5.1.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากใบของมะดุก

1. สารสกัดจากใบของมะดุกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 µg/ml
2. สารสกัดจากใบของมะดุกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 µg/ml
3. สารสกัดจากใบของมะดุกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125.00 µg/ml

5.1.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากผลของมะดุก

1. สารสกัดจากผลของมะดุกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 µg/ml
2. สารสกัดจากผลของมะดุกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 µg/ml
3. สารสกัดจากผลของมะดุกด้วยเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125.00 µg/ml

5.2 อภิปรายผล

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะตูมพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ทำการทดลองโดยใช้เปลือก ใบและผลของมะตูมมาทำการแยกสารโดยการหมักและสกัดตามลำดับความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์จำนวน 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ ทั้งหมด 9 ชนิด นำมาทดสอบข้อมูลทางพิษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ จากผลการศึกษาค้นพบประเด็นที่สำคัญดังนี้

5.2.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณ DPPH พบว่าสารสกัดจากผลของมะตูมชั้น ที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50} เท่ากับ 31 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนการทดสอบปริมาณสารประกอบ ฟีนอลพบว่ามีสารสกัดจากผลของมะตูมที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 95.23 mg GAE/g dw

5.2.2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะตูมด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดจากใบของมะตูมที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 $\mu\text{g/ml}$ และสารสกัดจากใบของมะตูมด้วยเอทิลเอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 $\mu\text{g/ml}$ และ สารสกัดจากผลของมะตูมด้วยเอทิลเอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 $\mu\text{g/ml}$

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านมะเร็ง ของสารบริสุทธิ์ในระดับโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการต่อยอดการวิจัยต่อไป

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

- ชฎารัตน์. 2544. **ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองของสารสกัดจากต้นกระท่อมน์**. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- เชษฐ รัตนอาจารย์. 2548. **ผลของสารสกัดไฟลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธีรศักดิ์ โจรนารธา และคณะ. 2551. **การประชุมวิชาการจับกระแสการรักษาและยาใหม่ 3**. คณะเภสัชศาสตร์ และชมรมศิษย์เก่าคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- นริศา คำแก่น . 2551. **การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรมะขาม**. กรุงเทพฯ : ก๊อบปี้บ็อกซ์.
- เต็ม สมิตินันท์ และวีระชัย ณ นคร. 2534. **พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน**. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวัฒนธรรมแห่งชาติ.
- บุญส่ง คงคาทิพย์ และคณะ. 2545. **การสกัด การแยกสารออกฤทธิ์จากต้นเบาหวาน**. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- ปัทมาวดี เสตะกัณณะ. **การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรมะขาม** วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 44, 2 (2545) : 110-124
- พิมพ์ ลีลาพรพิสิฐ สุมาลี พุกษากร และไชยวัฒน์ ไชยสุต.2549. **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิ่วของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของไทย**. รายงานการวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พิมพ์ ลีลาพรพิสิฐ อุดมภรณ์ ขาสสุวรรณ นิสิต กิตติพงษ์พัฒนาและจตุรงค์ รจนากุล.2547. **การศึกษาพิษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหารและเครื่องสำอาง**.รายงานการวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และ ทรงพร จึงมันคง. 2546. **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชสมุนไพรมะขามจังหวัดอุบลราชธานี**. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

- รัตนา อินทรานุกุล. 2547. การตรวจสอบและการสกัดสาระสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ราชบัณฑิตยสถานจัดพิมพ์. 2538. อนุกรมวิธานพืช อักษร ก ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. เพื่อนพิมพ์.
- วาทีณี จตุรพรชัย. 2546. การสกัดและผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศไทย. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วัชรีย์ คุณกิตติ และคณะ. 2547. การพัฒนาและประเมินผลทางคลินิกของเวชภัณฑ์จากขี้ผึ้งว่านหางจระเข้ ส่วนสกัดจากใบบัวบก ใบฝรั่ง และใบช่อยเพื่อใช้รักษาโรคในช่องปาก. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วันดี กฤษณพันธ์. 2529. พฤษเคมีเบื้องต้น. เกล็ดขมิ้นจืด. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1. หน้า 37-100 กรุงเทพฯ. Text Journal Corporation Co., Ltd.
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. เกล็ดขมิ้นไทย รวมสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- ศรีสมพร ปรีเปรม. รูปแบบของยาที่เตรียมจากพืชสมุนไพร ในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “สมุนไพรกับการพึ่งตนเอง” มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2536.
- สุภาพ บุญยะรัตเวช. 2523. การทดสอบประเภทของสารเคมีในพืชสมุนไพร. วารสารวิจัยจุฬา. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2546. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 12 (1) . พืชสมุนไพรและพืชมีพิษ เล่ม 1 : ซีเอ็ดยูเคชั่น จำกัด.
- สรศักดิ์ เหลี้ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี้ยวไชยพันธุ์. 2548. การแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะม่วงวันป่า. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อาทร รุ่งไพบูลย์. 2538. พฤษศาสตร์พื้นบ้าน สยามเภสัชพฤษฯ ภูมิปัญญาของชาติ (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์, ภาควิชาเภสัชพฤษศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

- Brien JO, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267, 2000, 5421-5426
- Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. *American Journal Clinical Pathology* 45:493-6.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. *Food Science Technology* 28:25-30.
- B. Pratumvinit, T. Srisapoomi, P. Worawattananon , N. Opartkiattikul, W. Jiratchariyakul and T. Kummalue., 2009. ***In vitro* antineoplastic effect of *Ficus hispida* L. plant against breast cancer cell lines**. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(4), 255-261
- Changsen C, Franzblau SG, Palittapongarnpim P. **Improved green fluorescent protein reporter gene based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter**. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, 2003, 3682-3687.
- Javanmardi, J., C. Stushnoff, E. Locke, and J. M. Vivanco. 2003. **Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions**. *Food Chemistry* 83:547-550
- Sithisarn,P., Supabphol,R. and Gritsanapan,W.,2005. **Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209)**, *Journal of Ethnopharmacology*, 99,109–112.
- Julie Nguyen-Pouplin , Hop Tran , Hung Tran , Tuyet Anh Phan, Christiane Dolecek , Jeremy Farrar , Tinh Hien Tran, Philippe Caron , Bernard Bodo, Philippe Grellier .,2007. **Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam**. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 417–427.

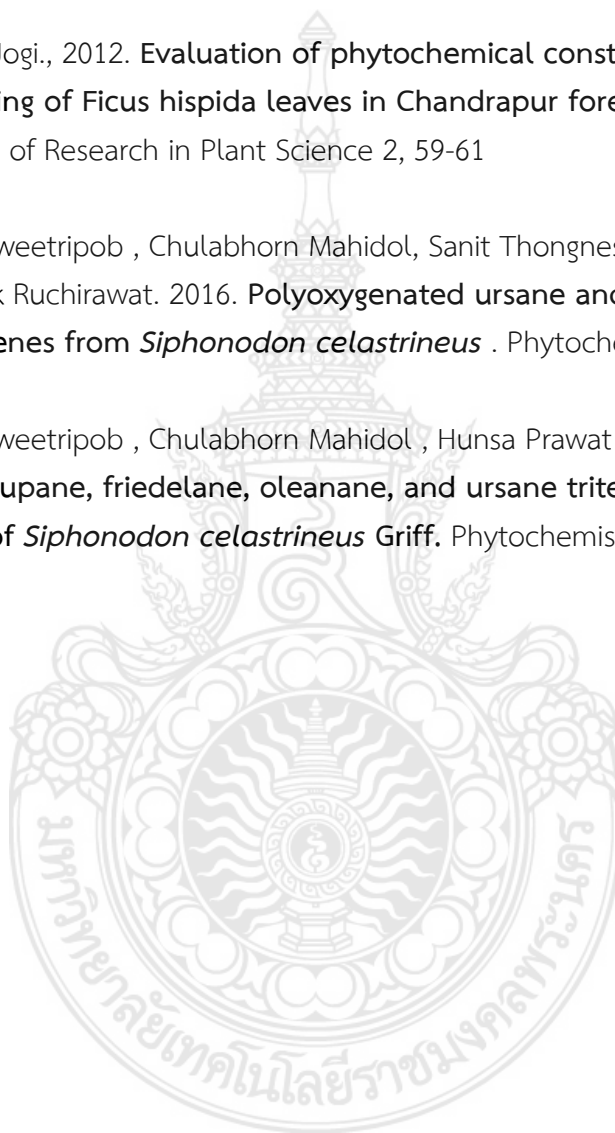
Krishna Murti, Vijay Lambole, Mayank Panchal., 2011. **Effect of *Ficus hispida* L. on normal and dexamethasone suppressed wound healing.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 47,

N. Swathi, A. Sreedevi and K. Bharathi.,2011. **Evaluation of Nephroprotective Activity of Fruits of *Ficus hispida* on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity.** Pharmacognosy Journal 3, 62-68.

Pravin Suresh Jogi., 2012. **Evaluation of phytochemical constituents and biological screening of *Ficus hispida* leaves in Chandrapur forest region.**International Journal of Research in Plant Science 2, 59-61

Wirongrong Kaweetripob , Chulabhorn Mahidol, Sanit Thongnest, Hunsu Prawat , Somsak Ruchirawat. 2016. **Polyoxygenated ursane and oleanane triterpenes from *Siphonodon celastrineus*** . Phytochemistry 129, 58-67.

Wirongrong Kaweetripob , Chulabhorn Mahidol , Hunsu Prawat , Somsak Ruchirawat. 2013. **Lupane, friedelane, oleanane, and ursane triterpenes from the Stem of *Siphonodon celastrineus* Griff.** Phytochemistry 96, 404-417.



ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ นามสกุล – นายอุดมเดชา พลเยี่ยม
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงาน กลุ่มวิชาเคมี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร เลขที่ 1381 ถนนพิบูลสงคราม เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800
4. ประวัติการศึกษา วท.ม. (วิชาเอกเคมี) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีประยุกต์ และ เคมีศึกษา

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล นางสาวสังเวย เสวกวิหารี
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงาน กลุ่มวิชาเคมี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร เลขที่ 1381 ถนนพิบูลสงคราม เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800
4. ประวัติการศึกษา วศ.ม. (วิศวกรรมคอมพิวเตอร์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ วิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

