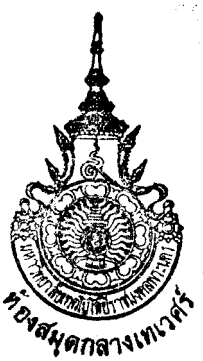
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร

อุดมวิชช์ พลเยี่ยม

ภาณุภัทร ตางาม

อมรรัตน์ ทองน้อย



งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณผลประโยชน์ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

งานห้องสมุดกลางเทเวศร์
ยบริการ...
25 ก.พ. 2552
เลขทะเบียน.....
เลขหมู่.....

ชื่อเรื่อง : **การสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร**

ผู้วิจัย : **ผศ. อุดมวิชช์ พลเยี่ยม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.พระนคร**
ผศ. ภาณุภัทร ตางาม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.กรุงเทพ
นางอมรรัตน์ ทองน้อย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

พ.ศ. : **2551**

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูน ต้นกัดลิ้น และต้นมะพอก การสกัดใช้เทคนิค Sequential Extraction และใช้วิธีการหมักแบบ Maceration โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบ 9 ชนิด ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพใช้วิธี Microplate broth dilution techniques การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใช้วิธี DPPH radical scavenging assay การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมใช้วิธี Folin-Ciocalteu methods การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*) ใช้วิธี Microculture Radioisotope Technique การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค(Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB)ใช้วิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA) และการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) ใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA)

ผลการวิจัยพบว่า

1. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากต้นตะบูน ต้นกัดลิ้น และต้นมะพอก ซึ่งมีค่า MIC 5.60 - 62.50 µg/ml นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพได้จำนวน 28, 7 และ 7 ชนิด ตามลำดับ

2. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากต้นตะบูน ต้นกัดลิ้น และต้นมะพอกที่สกัดด้วยเมทานอล มีค่า EC_{50} สูงกว่าสารที่สกัดด้วยเอทิลแอซิเตต และเมทานอล และมีค่า 35, 107 และ 200 µg/ml ตามลำดับ

3. ปริมาณฟีนอลของสารสกัดจากต้นตะบูนที่สกัดด้วยเมทานอล มีค่าสูงสุดคือ 95.977 mg GAE/g dw

4. ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย พบในสารสกัดจากต้นมะพอกด้วยเฮกเซน มีค่า IC_{50} 3.25 µg/ml

5. ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคพบในสารสกัดจากต้นกัดลิ้นด้วยเอทิลแอซิเตต มีค่า IC_{50} 50.00 µg/ml

6. ฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก พบในสารสกัด 7 ชนิด คือสารสกัดจากต้นตะบูนด้วยเฮกเซนและเมทานอล สารสกัดจากต้นกัดลิ้นด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล และสารสกัดจากต้นมะพอกด้วยเฮกเซน และเอทิลแอซิเตต มีค่า MIC 4.93 - 35.45 µg/ml

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

Title : **The Extraction and Biological Activity of Medicinal Plant Extracts.**

Researcher : **Udomwish Bhol yium,** Faculty of Science and Technology,RMUTP
Panupat Ta-Ngam, Faculty of Science and Technology, RMUTK
Amonratana Thongnoi, Science and Technology Research Institute of Thailand

Year : **2008**

ABSTRACT

The biological activity of crude hexane, ethylacetate and methanol extracts from stem bark of *Xylocarpus granatum* Koen., *Walsura trichostemon* Miq. and *Parinari anamense* Hance, with sequential extraction and maceration technique. The crude extract was employed to evaluate the biological activity such as the antimicrobial activities test by the Microplate broth dilution techniques, the antioxidant activities test by DPPH radical scavenging assay, the total phenolic contents test by the Folin–Ciocalteu method, the anti-malaria (*Plasmodium falciparum*) test by Microculture Radioisotope Technique, the anti-Mycobacterium Tuberculosis (anti-TB) test by Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA) and the anti-cancer(KB-Oral cavity cancer) test by Resazurin Microplate assay (REMA)

The results were as follows :

1.The antimicrobial activities of crude hexane ethylacetate and methanol extracts from stem bark of *Xylocarpus granatum* Koen., *Walsura trichostemon* Miq. and *Parinari anamense* Hance, the minimal inhibitory concentration (MIC) values were found to be 15.60 - 62.50 μg/ml and it microbial 28, 7 and 7 species, respectively.

2.The antioxidant activities of crude methanol extracts from stem bark of *Xylocarpus granatum* Koen., *Walsura trichostemon* Miq. and *Parinari anamense* Hance, show the EC_{50} were 35, 107 and 200 μg/ml, respectively.

3.The total phenolic contents of crude methanol extracts from stem bark of *Xylocarpus granatum* Koen. were 95.977 mg GAE/g dw

4.The anti-malaria of crude hexane extracts from stem bark of *Parinari anamense* Hance, show IC_{50} were 3.25 μg/ml.

5.Anti-Mycobacterium Tuberculosis (anti-TB) of crude ethylacetate extracts from stem bark of *Walsura trichostemon* Miq. show IC_{50} were 50.00 μg/ml.

6.Anti- cancer(KB-Oral cavity cancer) of crude hexane extracts from stem bark of *Xylocarpus granatum* Koen., *Walsura trichostemon* Miq. and *Parinari anamense* Hance, crude ethylacetate extracts from stem bark of *Walsura trichostemon* Miq. and *Parinari anamense* Hance, crude methanol extracts from stem bark of *Xylocarpus granatum* Koen.and *Walsura trichostemon* Miq. show the minimal inhibitory concentration (MIC) were 4.93 - 35.45 μg/ml

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินผลประโยชน์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 ของสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์จุฑา พีรพัชระ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้สนับสนุนการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ อาจารย์สุรพร กิตติสารวัณโณ คณบดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการทางเคมีอินทรีย์ในการทดลอง เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTECH) ที่ให้คำปรึกษาและการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้แก่คณะผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**I**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**II**
กิตติกรรมประกาศ	**III**
สารบัญ	**IV**
สารบัญตาราง	**VI**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**4**
2.1 พืชสมุนไพร	4
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร	7
2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร	9
2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	19
2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร	21
2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร	29
2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	35
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	36
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	**39**
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	39
3.2 สมุนไพร และจุลชีพ	40
3.3 วิธีการทดลอง	46
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	49
3.5 ระยะเวลาการทดลอง	49
3.6 สถานที่ทำการทดลอง	49

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง **50**

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ 51

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอล 63

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย 65

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค 66

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง 67

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ **68**

5.1 สรุปผลการทดลอง 68

5.2 อภิปรายผล 70

5.3 ข้อเสนอแนะ 71

บรรณานุกรม **72**

ภาคผนวก

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี	27
3.1 ชนิดของจุลินทรีย์ ลักษณะโดยทั่วไปและความสำคัญในการก่อโรคของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย	41
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกตะบูนด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	53
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกกัดลิ้น ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	57
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกมะพอกด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	61
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	63
4.5 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	64
4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	65
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	66
4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด	67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อน จึงส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพ(Biodiversity)ได้แก่ ความหลากหลายของพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ จากความหลากหลายทางชีวภาพดังกล่าวทำให้มีพืชสมุนไพรเป็นจำนวนมาก ซึ่งพืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมาแต่โบราณและสืบทอดต่อมาจนเกิดเป็นยากลางบ้านหรือยาแผนโบราณ(Traditional Medicine) พระราชบัญญัติคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย พ.ศ. 2542 ให้ความหมายของสมุนไพรว่า เป็น พืช สัตว์ จุลชีพ ธาตุวัตถุ สารสกัดดั้งเดิมจากพืชหรือสัตว์ที่ใช้แปรสภาพ ผสม ปรุงเป็นยาหรืออาหาร เพื่อการวินิจฉัย บำบัด รักษา ป้องกันโรค ส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์หรือสัตว์ และให้หมายความรวมถึงถิ่นกำเนิดหรือถิ่นที่อยู่อาศัยของสิ่งดังกล่าวด้วย

ในปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญต่อการนำพืชสมุนไพรมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่นในอุตสาหกรรมยา มีการค้นพบยาชนิดใหม่ๆ จากการค้นพบองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาแล้วนำมาใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาและสังเคราะห์ยาตามกรรมวิธีทางเภสัชกรรม เช่น ยาต้านมาลาเรีย ยาฆ่าแมลง ยารักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีการใช้สมุนไพรในรูปอาหารเสริมสุขภาพ (Health foods) และใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง เช่นกรดแอลฟาไฮดรอกซี(AHAs) ที่สกัดจากผลไม้เป็นต้น (รัตนา อินทรานุปกรณ์ , 2547 : 1-9)

การสกัดสารจากพืชสมุนไพรและการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ประโยชน์นั้นเป็นวิธีหนึ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างมากเพื่อนำมาใช้หาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่ๆ จากพืชชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นที่ได้รับความสนใจทำการศึกษาและวิจัยเป็นอย่างมาก และเป็นการนำสมุนไพรในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด (สุภาพ บุณยะรัตเวช, 2523 :118 และรัตนา อินทรานุปกรณ์ , 2547 : 63-79)

การตรวจสอบคุณสมบัติของสารสกัดในการต้านจุลินทรีย์โดยการนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายๆชนิดนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถชี้บ่งถึงประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างจำเพาะ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรไปทำให้บริสุทธิ์และพัฒนาต่อไป

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชกรรมแผนโบราณ

ประกอบกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) ซึ่งเน้นการพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมโดยให้ความสำคัญกับการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่น โดยใช้หลักเศรษฐกิจพอเพียงเป็นแนวทางสำคัญในการจัดการองค์ความรู้และสร้างภูมิคุ้มกันส่งเสริมการใช้ความหลากหลายทางชีวภาพในการสร้างความมั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความมุ่งมั่นที่จะนำพืชสมุนไพรซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นและเป็นเอกลักษณ์ของชาติมาศึกษาเพื่อเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพของพืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยการนำพืชสมุนไพรมาสกัดและนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งจะได้ข้อมูลเพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการค้นหาสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพร เพื่อนำไปพัฒนาเป็นยา เป็นอาหารเสริมหรือเป็นเครื่องสำอาง ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตเชิงอุตสาหกรรมและเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

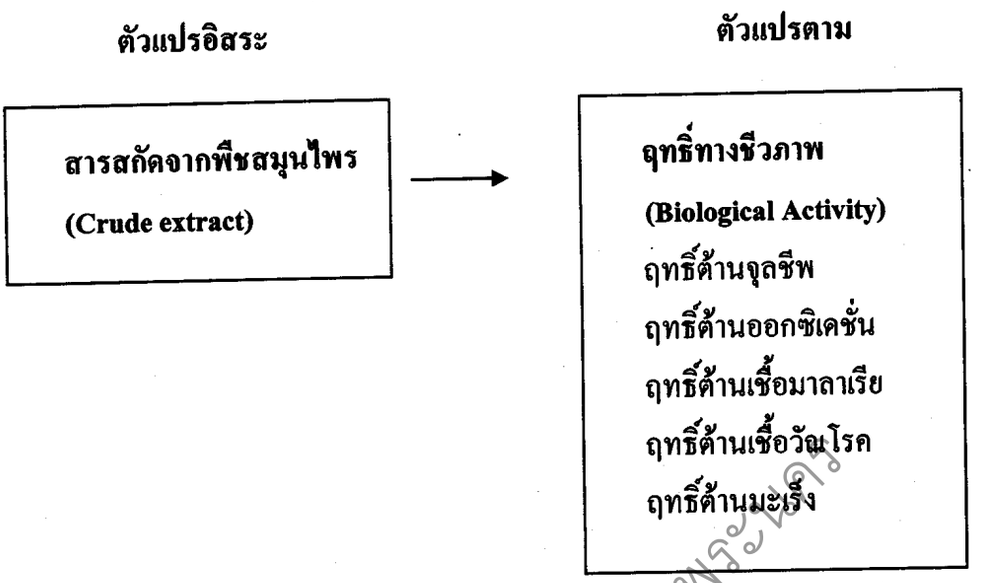
1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร
1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร
1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดจากพืชสมุนไพร
1.2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดจากพืชสมุนไพร
1.2.5 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือ ตะบูน กัดลิ้น และมะพอก
1.3.2 ส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือ ส่วนเปลือก
1.3.3 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนครฯ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร คณะผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 พืชสมุนไพร

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการวิจัยคือตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ข้อมูลอนุกรมวิธานที่สำคัญของพืชสมุนไพรประกอบด้วยชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อวงศ์ ชื่อพื้นเมือง ลักษณะทั่วไป ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และประโยชน์ดังนี้

2.1.1 ตะบูน

1. ชื่อวิทยาศาสตร์: *Xylocarpus granatum* Koen
2. ชื่อวงศ์ : MELIACEAE
3. ชื่อพื้นเมือง : ตะบูนขาว กระบูน กระบูนขาว ตะบูน (กลาง,ใต้) หยี่เหร่ (ใต้)
4. ลักษณะทั่วไป : เป็นพรรณไม้ยืนต้น พบมากในป่าชายเลน เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงกลาง สูง 8-20 เมตร ไม่ผลัดใบ ลำต้นสั้น แตกกิ่งใกล้โคนต้นมีพูพอนแผ่ออกคดเคี้ยวต่อเนื่องกับราก หายใจที่แบนคล้ายแผ่นกระดาน เปลือกเรียบบาง สีเหลืองแกมเขียวอ่อน หรือสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลแกมชมพู ลักษณะคล้ายต้นฝรั่งหรือต้นตะแบก เปลือกหลุดออกเป็นแผ่นไม่แน่นอน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

5. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนก ชั้นเดียว ไม่มียอด เรียงสลับ ใบย่อยมักมักมี1-2 คู่ เรียงตรงข้าม หรือเยื้องกันเล็กน้อย แผ่นใบรูปไข่กลับขนาด 2-5 x 7-14 ซม. แผ่นใบสมมาตรกัน ปลายใบกลม ฐานใบลิ่ม

ดอก ออกเป็นช่อที่ง่าม ช่อดอกแบบช่อแยกแขนง ยาว 3-8 ซม.แต่ละช่อมี 8-20 ดอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.2 ซม. เป็นดอกแยกเพศ ก้านดอกย่อยยาว 0.4-1 ซม.กลีบเลี้ยง 4 กลีบ ยาว 0.2 ซม. กลีบดอก 4 กลีบไม่ติดกัน สีขาวครีม เกสรเพศผู้8อันดอกมีกลิ่นหอมตั้งแต่บ่ายถึงค่ำ

ผล ลักษณะกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 15-20 ซม.แบ่งเป็น 4 พู เท่าๆกันแต่ละผลมี 7-17 เมล็ด ลักษณะโค้งนูน หนึ่ง ด้านกว้าง 6-10 ซม. ผลแก่สีน้ำตาลแดง คล้ายผลทับทิม ออกดอก ผล ตลอดทั้งปี การเจริญเติบโต มักขึ้นปะปนกับพันธุ์ไม้ป่าชายเลนหลายชนิด เช่นไม้พังกา หัวสุมดอกขาว ถั่วดำ ตาตุ่มทะเลและไม่โกงกางใบเล็กเป็นต้นขึ้นได้ดีในน้ำกร่อยพบบ้างเล็กน้อยในบริเวณน้ำ

6. ประโยชน์ : ใช้เผาทำถ่าน เป็นแหล่งอาศัยของสัตว์ป่า ต้นมาทำเสาและเป็นโครงสร้างหลักของโรงเรือนที่อยู่อาศัย นำเปลือกมาต้มน้ำย้อมเสื้อผ้า แห อวน เพื่อเพิ่มความคงทนและอายุใช้งาน

2.1.2 กัดลิ้น ราชบัณฑิตยสถาน (2538: 246) กล่าวถึงอนุกรมวิธานของกัดลิ้นดังนี้

1. ชื่อวิทยาศาสตร์: *Walsura trichostemon* Miq.

2. ชื่อวงศ์ : MELIACEAE

3. ชื่อพื้นเมือง : กัดลิ้น (นครราชสีมา พิจิตร) ขี้อ้าย (ลำปาง) มะค่าลิ้น (ปราจีนบุรี อุตรดิตถ์) ลำไยป่า(อุตรดิตถ์) ขี้อาย

4. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น กัดลิ้นเป็นไม้ขนาดกลาง สูง 15 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาลปนสีเทา แตกเป็นสะเก็ดบางๆ

ใบ ใบเป็นประกอบแบบขนนก ปลายใบคี่ เรียงเวียนสลับ มีใบย่อย 5 – 9 ใบ เรียงตรงกันข้าม รูปรีหรือรูปไข่กลับ ปลายใบเรียวแหลม โคนใบสอบเรียว ขอบใบเรียบ

ดอก ดอกออกเป็นช่อแยกแขนง ออกตามปลายกิ่ง ดอกขนาดเล็ก กลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ สีขาวปนเหลือง ออกดอกเดือนมีนาคม – พฤษภาคม

ผล ผลเป็นผลเดี่ยว รูปทรงกลม ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกสีเหลืองอ่อนแกมน้ำตาล เนื้อหุ้มเมล็ดสีขาว มีหนึ่งเมล็ด ออกผลเดือนพฤษภาคม – มิถุนายน

5. ประโยชน์ ราก ต้น แก้เส้นเอ็นพิการ เปลือก ห้ามเลือด ล้างบาดแผล พบกัดเลือดทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงใต้ของไทย ขึ้นตามป่าดิบแล้งต่างประเทศพบที่ พม่าและกัมพูชา ส่วนที่ใช้เป็นอาหาร ผลสุก เนื้อหุ้มเมล็ดสีขาวรับประทานได้ มีรสหวาน ถ้ารับประทานมากทำให้ระคายลิ้น นิยมนำไปทำส้มตำรวมกับผลไม้ที่มีรสฝาด เช่น ตะโกนา กล้วยดิบ เพื่อลดการระคาย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2.1.3 มะพอก

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Parinari anamense* Hance

2. ชื่อวงศ์ : CHRYSOBALANACEAE

3. ชื่อพื้นเมือง : พอก กระท้อนรอก (ตราด) จัด จั๊ด (ลำปาง) ตะเลาะ เหลอะ (ส่วย สุรินทร์) ตะโลก (เขมร สุรินทร์) ท่าลอก (พิษณุโลก นครราชสีมา ปราจีนบุรี) ประดงไฟ ประดงเลือด (ราชบุรี) มะคลอก (สุโขทัย อุตรดิตถ์) มะมื่อ หมักมื่อ (เหนือ) หมักมอก (พิษณุโลก) หมากรอก (ประจวบคีรีขันธ์)

4. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : สูง 10 – 20 เมตร ลำต้นเปลือกสีน้ำตาลแตกเป็นร่อง กิ่งอ่อนมีขนสีน้ำตาลปกคลุม

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

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

ผล : ผลรูปร่างไม่แน่นอนมักเป็นรูปกลม รีหรือเกือบกลม เมื่อแก่สีน้ำตาลผิวมีจุดสีขาวหรือเทาทั่วไป

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

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร

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

2.2.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

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

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

1. พืชสมุนไพรที่จะนำมาสกัด ต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง เพราะพืชหลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันหรือมีชื่อพ้องกัน โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่หายากและขาดแคลน ต้องตรวจสอบอย่างรอบครอบ

2. การเลือกเก็บพืชสมุนไพรที่สมบูรณ์ มีอายุตามชนิดของพืช สามารถออกดอกออกผลที่มีจำนวนมากพอ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มากพอดังนี้

2.1 รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโต หากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย

2.2 เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่

2.3 ใบและดอก เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน

2.4 ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร

2.5 ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือเมื่อสุกเต็มที่ ตามชนิดของพืชสมุนไพร

2.6 เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก

3. เก็บตัวอย่างให้ถูกฤดูกาลของพืชแต่ละชนิด เช่น พวก ขิง ข่า กระชายดำ จะมีเหง้าอยู่ใต้ดิน ในฤดูฝนเหง้าจะมีน้ำปริมาณมาก ทำให้มีปริมาณสารระเหยต่ำ ดังนั้นจึงควรเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้งจะได้ปริมาณสารระเหยที่มากกว่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4. วิธีการเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสมต่อการนำไปแยกสกัดสาร พืชบางชนิดต้องสกัดสด หรือบางชนิดต้องสกัดแห้ง

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

6. ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าและผลิตภัณฑ์ ต้องระวัง สิ่งปลอมปน การใช้ชื่ออื่นมาอ้าง และชื่อพ้องกัน

7. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วต้องการทำตัวอย่างแห้ง ต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์

2.2.3 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. การเตรียมตัวอย่างแบบสด พืชสมุนไพรสดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง

2. การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง เป็นการป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

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

4. พืชสมุนไพรแห้งควรเก็บในที่แห้ง มืด เย็น และมีอากาศหมุนเวียนและหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน

2.2.4 การทำให้สมุนไพรตัวอย่างมีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชสมุนไพรต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชสมุนไพรที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

การย่อยพืชสมุนไพรให้มีขนาดเล็กลง

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

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

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

นอกจากนี้อาจทำการย่อยเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เอนไซม์ (enzyme disintegration) หรือโดยใช้สารเคมี (chemical disintegration)

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

4. การย่อยสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากจนเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์แตกมากเกินไป ซึ่งบางครั้งทำให้สารสกัดขุ่น ขนาดของผงพืชสมุนไพรที่เหมาะสมหาได้จากการทดลองซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบสำคัญสูงสุด

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรนั้นมีข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์ การเลือกตัวทำละลาย การเลือกวิธีการสกัด วิธีการสกัด และการทำสารสกัดให้เข้มข้น

2.3.1 สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์

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

1. ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) หรือ ความชอบน้ำ (hydrophilicity)

ความชอบน้ำ (hydrophilicity) หรือความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของสารนั้นพิจารณาได้จากความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลาย ที่มีขั้วสูงไปหาขั้วต่ำตามลำดับ ดังนี้ น้ำ เมธานอล อะซีโตไนไตร(acetonitrile) เอธิลอะซีเตด (ethyl acetate) ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (chloroform) ปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane) สารสกัดหยาบที่จะนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์อาจละลายในตัวทำละลายได้ยาก ควรกรองสารละลายของสารสกัดหยาบเพื่อ แยกเป็นส่วนของตะกอนและส่วน ของสารละลาย (filtrate)หรือหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเป็นส่วนของตะกอนและส่วนลอย (supernatant) นอกจากนี้ยังสามารถสกัดแยกส่วนของสารสกัดหยาบด้วยการใช้ตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เข้ากัน เช่น น้ำ กับเอธิลอะซีเตด หรือคลอโรฟอร์มกับไดคลอโรมีเธนหรือเฮกเซน เป็นต้น โดยทำการสกัด ด้วยกรวยแยก จากนั้นจึงนำแต่ละ ส่วนมาแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดอื่น หรือแบ่งบางส่วนของสารที่แยกได้นั้นมาทดสอบฤทธิ์ทาง ชีวภาพก่อนที่จะแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไป

2. pKa

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3. ความคงตัวต่อความร้อน

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

4. ขนาดโมเลกุล

การแยกสารอาจไม่ได้แยกตามความมีขั้วของสาร แต่อาจแยกตามขนาดของโมเลกุล(size) หรือน้ำหนักโมเลกุล ของสาร เช่น การแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติด้วย Sephadex LH-20 column พบว่าสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะถูกชะ ออกมาจากคอลัมน์ก่อนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เป็นต้น ทั้งนี้การแยกสารตามขนาดโมเลกุลจะมีประโยชน์อย่างมากเมื่อ สารที่เป็นองค์ประกอบในสารผสมมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันแต่มีขั้วใกล้เคียงกันมาก จึงทำให้แยกออกจากกันได้ยากเมื่อ ใช้ normal phase หรือ reverse phase แต่หากแยกสารเหล่านี้ด้วย Sephadex LH-20 ที่อาศัยหลักการแยกสารตามขนาด โมเลกุลจะสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ตามต้องการ ในบางครั้งโปรตีนที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเข้ามารบกวนกระบวนการแยกสาร อีกทั้งโปรตีนมักไม่คงตัวต่อความ ร้อนจึงสลายตัวกลายเป็นสารรบกวนได้ วิธีกำจัดโปรตีนออกจากสารสกัดทางชีวภาพมักทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เข้า กับน้ำได้ เช่น เมธานอล เมื่อทำสารสกัดในชั้นเมธานอลให้แห้งสนิท (ปราศจากน้ำ) แล้ว จึงจะสกัดสารสกัดที่ได้นั้นซ้ำอีกครั้ง ด้วยเมธานอลเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีโปรตีนติดมาด้วย เพราะโปรตีนจะละลายมากับน้ำในระหว่างกระบวนการสกัด นอกจากนี้ ยังสามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้ด้วยการกรองผ่าน ultrafiltration membrane โดยใช้แรงดันสุญญากาศหรือแรงหมุนเหวี่ยง ช่วยไล่สารตัวอย่างให้ผ่านไปบนแผ่นกรอง สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเท่านั้นที่จะสามารถผ่านรูของแผ่นกรองไปได้ สำหรับ โปรตีนซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่นั้นไม่สามารถผ่านแผ่นกรองไปได้ อย่างไรก็ตามสารที่จะแยกด้วยวิธีนี้ได้ต้องมีขนาดโมเลกุล ใหญ่กว่า 2000 amu สำหรับสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากจะต้องแยกด้วยวิธีการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis) ซึ่งสามารถแยกโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า 2000-3000 amu ได้ โดยสารจะแพร่ผ่าน dialysis tubing ออกมายังสารละลายตัวกลางที่อยู่ ภายนอก โดยโปรตีนจะถูกกักเก็บไว้ใน tubing

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. สเตอริโอเคมี

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

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

ลิขสิทธิ์เทคโนโลยีการเกษตรพระนคร

2.3.2 การเลือกตัวทำละลาย

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 83-84) กล่าวถึงการเลือกตัวทำละลายสรุปได้ดังนี้

1. ความสามารถในการละลาย

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

2. ความคงตัว

ตัวทำละลายมีความคงตัว หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. การระเหย

ตัวทำละลาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4. สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด

สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด เช่นเมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

สถาบันวิทยบริการเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2.3.3 วิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 85-89) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. มาเซอเรชัน

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

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

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

2. เพอร์โคเลชัน

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงปล่อยตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วที่พอเหมาะ พร้อมกับเติมตัวทำละลายใหม่ลงไปเรื่อยๆ อย่าให้แห้งเก็บเพอร์โคเลตจนการสกัดสมบูรณ์โดยการตรวจสอบจากเพอร์โคเลตส่วนสุดท้าย นำเพอร์โคเลตที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

วิธีเพอร์โคเลชันจัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารจะใช้เพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายตัว และให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าหากัน

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง

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

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลืองแต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อนและตัวทำละลายที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของตัวทำละลายแตกต่างไปจากเดิม และผลการสกัดที่ไม่ดี

4. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) มีหลายวิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชที่ใช้ ดังนี้

4.1 การกลั่น (distillation) ในทางอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

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

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

4.2 การบีบหรือการอัด

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

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

4.3 วิธีเอ็นฟอยเรนซ์

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

4.4 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2.3.4 การเลือกวิธีการสกัด

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

1. ธรรมชาติของสมุนไพร โดยพิจารณาดังนี้

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

1.2 ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในตัวทำละลาย ถ้าละลายได้ง่ายใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้ยากใช้วิธีเพอร์เลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

1.3 ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด

หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีง่ายๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. ความต้องการการสกัด

หากต้องการสารสกัดเจือจาง ควรใช้ใช้วิธีมาเซอเรชัน แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

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

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การระเหย

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

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ

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

3. การทำให้แห้ง

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

4. อัลตราฟิลเทรชั่น

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

2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

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

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

1. แอลคาลอยด์

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

2. ไกลโคไซด์

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

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. แทนนิน

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

4. ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารมีสีเช่นสารสีแดง (carthamim) จากดอกคำฝอย สารสีเหลือง (luleolin) จากดอกสายน้ำผึ้ง

5. สเตอรอยด์

สเตอรอยด์เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมนและยาต้านอักเสบ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยา

6. เทอร์ปีนอยด์

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

7. น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย เป็นของเหลวมีกลิ่นหอมเฉพาะ ระเหยได้ในอุณหภูมิห้อง เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำหรือการบีบใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง และ สมุนไพร และใช้ขับลม ฆ่าเชื้อโรค

8. ยางไม้

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

9. สารอื่นๆ

ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เอ็นไซม์ วิตามิน เรซิน และบาลซัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

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

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหล่านี้ไม่จำเพาะเจาะจง และการให้ผลบวกก็เป็นเพียงการบอกถึงประเภทของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางชนิดเท่านั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสร้างคล้ายกันแต่เป็นสารต่างกลุ่มกันจะให้ผลบวกลวง ในอีกแง่หนึ่งการให้ผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเข้มข้นต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไม่พอต่อการตรวจสอบด้วยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี ดังนี้

2.5.1 การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการเกิดตะกอน

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

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรต

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2. กลุ่มแอลคาลอยด์

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

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

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

1. Steroid nucleus ใช้วิธี Liebermann-Burchard test ให้สีฟ้าหรือเขียว สารทดสอบต้องแห้งและปราศจากน้ำ

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.2 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์

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

3.3 กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยส่วนของ aglycone ของanthraquinones และน้ำตาลซึ่ง anthraquinones มีคุณสมบัติละลายได้ดีในด่าง แล้วเกิดเป็นสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึงไฮโดรไลซ์ anthraquinone glycosides ด้วยกรดหรือด่าง หรือ $FeCl_3$ หรือ sodium dithionate ให้กลายเป็น aglycone ของ anthraquinones แล้วจึงสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทดสอบกับด่างจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกว่า Borntrager test

3.4 กลุ่มไซยาโนจินิกกลีโกไซด์

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

การตรวจหาไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ในพืชตัวอย่างควรทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกัน แต่ใช้ภาวะเงื่อนไขที่แตกต่างกัน เช่น หลอดทดลองหนึ่งมีการเติมเอนไซม์อิมัลซิน (emulsion) กับ (linamarase) ลงไป แต่อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องเติม เพื่อให้แน่ใจว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกจริง เนื่องจากพืชบางชนิดถึงแม้จะมีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบจริง แต่อาจขาด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

เอนไซม์ เบตา-กลูโคซิเดสร่วมอยู่ในพืชนั้น จึงเติมเอนไซม์ทั้งคู่ลงในหลอดทดลองหลอดหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบกัน จะช่วยในการตัดสินใจว่าผลการตรวจสอบนั้นเป็นผลบวกจริง

3.5 กลุ่มไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์

การตรวจหาไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์อาจตรวจในสภาพของไกลโคไซด์หรือตรวจหาผลิตภัณฑ์ของไกลโคไซด์จากการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (enzymic hydrolytic products) เช่น ตรวจหาน้ำตาลกลูโคสหรือหมู่ซัลเฟตหรือโมเลกุลของไอโซไทโอไซยาเนต

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

3.6 กลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์

ฟลาโวนอยด์แบ่งออกเป็น typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids การตรวจสอบสารในกลุ่มนี้ ทำได้ดังนี้

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

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

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

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

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

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

4. กลุ่มคูมาริน

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

5. กลุ่มแทนนิน

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

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

2. การตรวจสอบด้วย bromine water หากเป็น condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine water

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

4. การตรวจสอบด้วย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น พบว่า condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. กลุ่มเทอร์พีนอยด์

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

2.5.2 การตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 77-79) กล่าวไว้สรุปได้ดังนี้

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
น้ำมันหอมระเหย (essential oils)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน: เอทิลแอซีเทต (toluene :ethyl acetate) 73:7	วานิลลิน : กรดซัลฟิวริก (vanillin : sulphuric acid)ให้สีแดง น้ำตาลหรือน้ำเงิน
แอลคาลอยด์ (alkaloids)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม(methanol chloroform) 85 : 15 หรือ โทลูอีน :เอทิลแอซีเทต: ไดเอทิลเอไมด์ (toluene : ethyl acetate : diethylamine) 70:20:10	น้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ให้สีส้ม
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เอทิลแอซีเทต : เมทานอล : น้ำ (ethyl acetate : methanol : water) 65:35:10 หรือ เอ็นบิวทานอล : กรดแอซีติก : น้ำ (n-buthanol : acetic acid :water) 4:1:5	น้ำยาเคดเด (Kedde reagent) ให้สีชมพู หรือน้ำเงินอมม่วงกับพวกคาร์ดีโนไลด์ (cardenolide) แอนติโมนีคลอไรด์ (antimony chloride) ให้สีน้ำเงินหรือเรืองแสงสีเหลืองอมเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm กับพวกบิวฟาไดอีโนไลด์ (bufadienolide)
ซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	ไซโคลเฮกเซน : ไดเอทิลเอมีน (cyclohexane : diethylamine) 9:1 หรือ คลอโรฟอร์ม : โทลูอีน: คลอโรฟอร์ม :เมทานอล: น้ำ (chloroform :methanol :water) 64:50:10	วานิลลิน: กรดซัลฟิวริก (vanillin :sulphuric acid) ให้สีน้ำเงิน
แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquuinone glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene : chloroform) 9:11 หรือ โทลูอีน : แอซีโทน : คลอโรฟอร์ม (toluene : acrtone :chloroform) 40:25:35 หรือ แอซีเทต : เมทานอล : น้ำ(ethyl acetate:methanol:water) 100:13.5:10	ปฏิกิริยาบอนเทรเกอร์ (Borntraeger reaction) แอนทราควิโนนให้สีแดงหรือเรืองแสงสีแดงเมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) 365 nm แอนโทรน (anthrone) ให้สีเหลืองหรือเรืองแสงสีเหลือง
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม :แอซิโทน : กรดฟอร์มิก (chloroform : acetone : formic acid) 75:16.5 :8.5 หรือ เอทิลแอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate : methanol:water) 100:13.5:10 หรือโทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene: chloroform) 9:11	เนเซอรัล โปรดักส์ (ไดฟีนิลโบริล ออกซีเอทิลลามีน) -พอลีเอทิลีนไกลคอล) (natural products (dephenylboryloxyethylamine)-polyethylene glycol) แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) –ฉ nm เรืองแสงสีเหลือง ส้ม หรือเขียว
คูมารินไกลโคไซด์ (coumarin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน :แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene :acetone: chloroform) 40 : 25:35 หรือ โทลูอีน:คลอโรฟอร์ม (toluene:chloroform) 9:11	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) หรือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) เรืองแสงสีน้ำเงินหรือเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
อิริดอยด์ไกลโคไซด์ (iridoid glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : เอทิลเอซีเทต (toluene:ethyl acetate) 93:7 หรือ คลอโรฟอร์ม : กรดแอซีติก : น้ำ (chloroform : acetic acid : water) 80:10:5:2:6	กรดเกลือ-กรดแอซีติก (hydrochloric acid: acetic acid) ให้สีน้ำเงินหรือน้ำตาล
แทนนิน (tannin)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เอ็น-บิวทานอล: กรดแอซีติก: น้ำ (n-butanol:acetic acid:water) 4:1:5 หรือ เอ็นบิวทานอล:โทลูอีน: เมทานอล : กรดแอซีติก : น้ำ (n-butanol: acetic acid:water) 80:10:5:2:6 หรือ เบนซีน:ไดออกเซน : กรดแอซีติก 90:25:4	1% เมทานอลิกเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% methanolic ferric chloride) ให้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน
	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (chloroform: methanol) 95:5 เอทิลแอซีเทต : เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate:methanol :water) 77:15:8	กรดซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ให้สีแดง

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547 : 77-79

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

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

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

1. Solid phase extraction (SPE)

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

2. Thin layer chromatography (TCL)

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

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

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

3. Column chromatography (CC)

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

การแยกสารตัวอย่างในคอลัมน์ออกเป็นแบนด์อาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีซึ่งหมายถึงการกระจาย (distribution) ของสารระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคคงที่ ดังสมการต่อไปนี้

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

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

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

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

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

ประจุ (charge) สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดเมื่อมีการปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของสารละลายด้วยกรดหรือด่างอาจจะทำให้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นถูกเปลี่ยนแปลงไปให้อยู่ในรูปของไอออนบวกหรือลบได้ ดังนั้นจึงนำคุณสมบัติการแตกตัวเป็นไอออนนี้มาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ดังต่อไปนี้

3.1 Ion-exchange chromatography

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.2 Ion-pair chromatography / ion-suppression chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารที่สามารถแยกไอออนสารตัวอย่างได้ด้วยวัฏภาคคงที่มีขั้วต่ำ เช่น reverse phase modified partition column โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อลดการแตกตัวเป็นไอออนของโมเลกุลสารตัวอย่าง ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างมีความเป็นกลาง(ไม่มีขั้ว) และสามารถจับกับวัฏภาคคงที่ที่ไม่มีขั้วได้ ในทำนองเดียวกัน ion-pair chromatography จะมีวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยโมเลกุลสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถแตกตัวได้ (ionizable group) และมีส่วนที่ชอบไขมัน (lipophillic region) ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอออนตรงข้าม (counter-ion) ที่จะทำให้เกิด reversible ion-pair กับสารตัวอย่าง โดยมี ionic modifier ทำหน้าที่จับคู่ (pairing) กับไอออนสารตัวอย่าง ในสารละลายแล้วทำให้เกิดสปีชีส์ที่ไม่มีขั้วที่สามารถแยกส่วน (partition) เข้าไปในวัฏภาคคงที่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุแล้วเกิดเป็นคู่ไอออน (ion –pair) กับสารตัวอย่างได้ ข้อดีของเทคนิคนี้คือใช้แยกสารตัวอย่างที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ในระบบเดียวกัน

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

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

4. Gradient high performance liquid chromatography (Gradient HPLC)

Gradient high performance liquid chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงความต่างระดับของความมีขั้ว (gradient) ของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ตลอดเวลา เพื่อแยกของผสมและชะองค์ประกอบทุกชนิดให้ออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับความมีขั้ว การชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย gradient elution มีข้อดีกว่า isocratic elution ซึ่งมีสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์คงที่ตลอดเวลา ตรงที่สามารถแยกสารที่มีขั้วใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถแยกสารที่มีขั้วสูงและต่ำออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการคู่ต่อมาการใช้ประโยชน์ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเป็นจำนวนมาก เช่น HPLC-UV, GC-MS, HPLC-MS และ HPLC-NMR เป็นต้น การวิเคราะห์สารที่แยกออกมาจาก HPLC column ด้วย UV และ NMR จะสามารถนำสารนั้นกลับคืนมาได้ ในขณะที่การวิเคราะห์ GC และ MS ไม่สามารถนำสารที่ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือดังกล่าวกลับคืนมาได้ อย่างไรก็ตามสารต่างชนิดกันอาจดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ ทำให้ UV มี

ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่ำกว่า MS นอกจากนี้ MS ยังมีความไว (sensitivity) ที่สูงกว่า UV จึงสามารถวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำมากได้ การแยกสารด้วย GC มีข้อด้อยกว่าการแยกด้วย HPLC เนื่องจาก GC เหมาะสำหรับการแยกสารที่สามารถระเหยได้และทนต่อความร้อน หากสารที่ต้องการแยกระเหยไม่ได้จะต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ที่ระเหยได้เสียก่อน จึงทำให้มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและเสียเวลามาก ดังนั้นในปัจจุบันจึงมักพบว่า HPLC-MS เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2546 : 56-65) กล่าวถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชกรรมและการใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษาสรุปได้ดังนี้

2.7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

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

2.7.2 Bio-assaying

1. หลักในการคัดเลือกวัสดุจากพืชสมุนไพร เช่น การสกัดสารและการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารก่อนจะศึกษาผลทางชีวภาพ การวางแนวทางการดำเนินงานตามเงื่อนงำจากการประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในยาสมุนไพรและความเชื่อตามขนบธรรมเนียม การตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีววิทยา ชีวเคมี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีและกายภาพ

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

2.7.3 การสำรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนา

การศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความหลากหลายของผลทางชีวภาพและสูตรโครงสร้างของสรออกฤทธิ์และเป้าหมายด้านเภสัชกรรมในการบำบัดรักษาที่ชัดเจน โดยอาศัยการพัฒนาในหลายสาขาวิชา เช่น พันธุกรรม ชีวโมเลกุล วิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิคที่ทันสมัย

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

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

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

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

ปัทมาวดี เสตะกัณฑะ. (2545) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย การผลิตยาต้านจุลชีพจากสมุนไพรไทยเป็นทางเลือกหนึ่งของการช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และการที่จะผลิตยาได้นั้น ต้องมีการศึกษาวิจัยที่ครบวงจร ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลเบื้องต้นด้านการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพร การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพร 10 วงศ์ 20 ชนิด จำนวน 48 สารสกัด โดยวิธี Agar dilution ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 21 ชนิด 24 สายพันธุ์ และเชื้อรา 1 สายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่า สมุนไพร 17 ชนิด จำนวน 35 สารสกัด มีฤทธิ์ต้านจุลชีพบางชนิดได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

และไม่พบสารสกัดจากสมุนไพรใดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ทุกชนิด ในจำนวนนี้มีสมุนไพร 7 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้หลายชนิด และสมควรนำไปศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตยา ได้แก่ กะเม็ง (Eclipta prostrata L.) , กระเจี๊ยบแดง (Hibiscus sabdariffa L) , โด่ดอกขาว (Elephantopus mollis H.B.K.) , ปีบ (Millingtonia hortensis L.f.) , ผักขมหิน (Boerhavia diffusa L.) , ยมหิน (Chukrasia tabularis A. Juss.) และเหงือกปลาหมอ(Acanthus ebracteatus Vahl)

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

วาทินี 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

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

สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี่ยวไชยพันธุ์ (2548) ศึกษาการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแกว่นป่า โดยใช้วิธี DPPH และ เทคนิคโครมาโทกราฟฟี่ผิวบาง (TLC) พบว่าสารสกัดเมทานอลของผลมะแกว่นป่ามีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายชนิด การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ใช้คอลัมน์ซิลิกาเจลและคอลัมน์ของเรซิน Diaion

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

HP-20 ตามลำดับ พบว่าสามารถแยกสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยการใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 70 : 30 และสารต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้เป็นสารประกอบพวก Condensed tannin

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

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

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

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

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. 96 well plate
2. Appendoft
3. Sterile Plastic pipette
4. Milipore filter
5. Filter Disc
6. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
7. ชุดกรองสาร

3.1.2 เครื่องมือ

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

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mueller Hinton agar(NHA)
2. Mueller Hinton broth(MHB)
3. Tryptic soy agar (TSA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.3.4 สารเคมี

2. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
3. ethanol
4. Methanol
5. Hexane
6. Ethylacetate
7. Folin-Ciocalteu's reagent
8. Sodium carbonate (Na_2CO_3)
9. 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
10. Dihydroartemisinine
11. Rifampicin
12. Streptomycin
13. Isoniazid
14. Ofloxacin

3.2 สมุนไพร และจุลชีพ

3.2.1 สมุนไพร

1. ตะบูน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Xylocarpus granatum* Koen

ชื่อวงศ์ : MELIACEAE

2. กัดลิ้น

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Walsura trichostemon* Miq.

ชื่อวงศ์ : MELIACEAE

3. มะพอก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Parinari anamense* Hance

ชื่อวงศ์ : CHRYSOBALANACEAE

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.2.2 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการวิจัยมีจำนวน 35 ชนิดประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียจำนวน 30 ชนิด เชื้อรา 2 ชนิดและยีสต์ 3 ชนิด ลักษณะโดยทั่วไป และความสำคัญในการก่อโรคแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ชนิดของจุลินทรีย์ ลักษณะโดยทั่วไปและความสำคัญในการก่อโรคของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

ชนิดของจุลินทรีย์	ลักษณะโดยทั่วไป	ความสำคัญในการก่อโรค
1. *Streptococcus milleri* group	แบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก	เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นบริเวณลำคอ ทางเดินปัสสาวะและทางเดินอาหาร เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในลำคอและช่องปาก
2. *Streptococcus mutans* ATCC 27175	แบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก	เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในช่องปากทำให้เกิดโรคฟันผุ
3. *Streptococcus pneumoniae*	แบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก	เยื่อหุ้มสมองอักเสบเฉียบพลัน ปอดอักเสบ ติดเชื้อในกระแสเลือด และหูชั้นกลางอักเสบเฉียบพลัน
4. *Streptococcus sobrinus*	แบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก	ทำให้เกิดฟันผุเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย ในช่องปาก ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลได้ เป็นสาร glucans ที่มีลักษณะเหนียวข้น ไม่ละลายน้ำเคลือบอยู่ที่ฟันเชื้อจุลินทรีย์ จะใช้ glucans เป็นอาหารในระหว่างกระบวนการ metabolism เกิดการสร้างกรดไปทำลายสารเคลือบฟันเป็นสาเหตุทำให้ฟันผุ
5. *Bacillus subtilis* ATCC 26633	แบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวก สร้างสปอร์ได้ เติบโตได้ในที่มีอกซิเจน	โดยปกติไม่ทำให้เกิดโรคแต่อาจก่อโรคได้โดยการปนเปื้อนไปกับอาหาร แล้วทำให้เกิดเมือกในอาหารและทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ
6. *Bordetella pertussis*	แบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ มีแคปซูล	สาเหตุของโรคไอกรนโดยเชื้อชอบเกาะกับเยื่อบุผิวที่หลอดลมและขั้วปอดที่มีซิเลีย และทวีจำนวนอย่างรวดเร็ว การติดเชื้อจะเกิดที่ผิวเซลล์เยื่อบุผิวเท่านั้น โดยไม่เข้าสู่กระแสเลือด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ลักษณะโดยทั่วไป	การก่อโรค
7. *Corynebacterium diphtheriae*	แบคทีเรียรูปท่อน คล้ายกระบอง แกรมบวก	ทำให้เกิดโรคคอตีบ เชื้อจะสร้างสารพิษ diphtheria toxin ออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดเยื่อเมือกเทียมอุดกั้นทางเดินหายใจ สารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายส่งผลให้เซลล์และอวัยวะต่างๆถูกทำลาย
8. *Vibrio cholerae*	แบคทีเรียรูปท่อน โค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอหิวาห์ตกโรค เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้เล็ก และสร้างสารพิษที่เรียกว่าcholera toxin บนเยื่อบุเซลล์ของผนังลำไส้ทำให้เกิดการขับเคลื่อแร่ โพแทสเซียม โซเดียมคลอไรด์ ไบคาร์บอเนต และน้ำออกจาก เซลล์สู่โพรงลำไส้ ทำให้ผู้ป่วยคลื่นไส้อาเจียนอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง
9. *Vibrio paraheamolyticus*	แบคทีเรียรูปท่อน โค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ กระเพาะอาหาร-ลำไส้อักเสบเชื้อนี้มักปนเปื้อนไปกับอาหารทะเลพวก กุ้ง ปู ปลา หอย จะเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุกๆ 10 ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ ทำให้มีอาการท้องร่วงรุนแรง มีอุจจาระเหลวเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือน กุ้งเน่า มักมีอาการปวดเกร็งที่ท้อง ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมีอาการอาเจียนร่วมด้วย มีระยะฟักตัวค่อนข้างสั้น คืออาจเกิดอาการในประมาณ 15-24 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหาร
10. *Staphylococcus* coagulase-negative	แบคทีเรียทรงกลม เรียงตัวเป็นลักษณะคล้ายพวงองุ่นแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เป็นเชื้อที่ให้ผลลบ	เป็นเชื้อประจำถิ่นของผิวหนังและเยื่อเมือกของร่างกาย เป็นแบคทีเรียที่สามารถติดเชื้อกับผู้ป่วยที่ได้รับ ยากดภูมิคุ้มกัน หรือผู้ป่วยที่ต่อสายสวนท่อไต มีรายงานว่ามีหลาย species ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection) ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยต้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนครฯ

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ลักษณะโดยทั่วไป	การก่อโรค
	ต่อการทดสอบโคแอกูเลส (coagulase-negative staphylocooci)	อยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้นและทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น
11. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923	แบคทีเรียทรงกลมเรียงตัวเป็นลักษณะคล้ายพวงองุ่น แกรมบวก	เป็นสาเหตุของโรคฝี หนอง กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด กลุ่มอาการผิวหนังกำพร้าหลุดลอกหรือRitt's disease และโรคอาหารเป็นพิษ
12. *S. aureus* (MRSA) N1	แบคทีเรียทรงกลมเรียงตัวเป็นลักษณะคล้ายพวงองุ่นแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เป็นเชื้อที่ให้ผลลบต่อการทดสอบโคแอกูเลส (coagulase-negative staphylocooci)	แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุด เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายคน พบได้ที่บริเวณผิวหนังและ ในรูจมูก เป็นสาเหตุของโรคฝี หนอง กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด กลุ่มอาการผิวหนังกำพร้าหลุดลอกหรือRitt's disease กลุ่มอาการช็อคที่เกิดจากสารพิษ และโรคอาหารเป็นพิษ methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) เป็นเชื้อ *S.aureus* ที่ดื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์หลายกลุ่ม เช่นยาเพนนิซิลิน เตตราไซคลีน ซัลโฟนาไมด์ ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration ; MIC) ต่อยาเมทิซิลลินมากกว่าหรือเท่ากับ16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
13. *S. aureus* (MRSA)20625		
14. *S. aureus* (MRSA)20626		
15. *S.aureus* (MRSA)20627		
16. *S. aureus* (MRSA)20628		
17. *S. aureus* (MRSA)20630		
18. *S. aureus* (MRSA)20631		
19. *S.aureus* (MRSA)20632		
20. *S.aureus* (MRSA)20633		
21. *S.aureus* (MRSA)20635		
22. *S.aureus* (MRSA)20636		
23. *S.aureus* (MRSA)20652		
24. *S. aureus* (MRSA)20653		
25. *S. aureus* (MRSA)20654		

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ลักษณะโดยทั่วไป	การก่อโรค
26. *S. aureus* (VRSA)20622	แบคทีเรียทรงกลม เรียงตัวเป็นลักษณะคล้ายพวงองุ่นแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่	เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะแวนโคมัยซิน (vancomycin-resistant *S. aureus* หรือ VRSA) เป็นสาเหตุของโรคฝี หนอง กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด การอักเสบที่ผิวหนัง แผลเรื้อรัง กลุ่มอาการผิวหนังกำพร้าหลุดลอกหรือ Ritt's disease กลุ่มอาการช็อคที่เกิดจากสารพิษ โรคอาหารเป็นพิษ ลำไส้อักเสบ
27. *S. aureus* (VRSA)20623		
28. *S. aureus* (VRSA)21083		
29. *S. aureus* (hVISA) ATCC 700698	แบคทีเรียทรงกลม เรียงตัวเป็นลักษณะคล้ายพวงองุ่นแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่	heteroresistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินระดับปานกลางเป็นสาเหตุของโรคฝี หนอง กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด การอักเสบที่ผิวหนัง แผลเรื้อรัง กลุ่มอาการผิวหนังกำพร้าหลุดลอกหรือRitt's disease กลุ่มอาการช็อคที่เกิดจากสารพิษ และโรคอาหารเป็นพิษ ลำไส้อักเสบ
30. *Enterococcus faecalis* (VRE) ATCC 5129	แบคทีเรียรูปกลม แกรมบวก เรียงตัวเป็นคู่สองหรือสายยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่	เป็นเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ในอุจจาระคนและสัตว์เลือดอุ่นอาจแพร่กระจายอยู่ในขนหนังของสัตว์ ในน้ำ ในดินและอาหาร เป็นเชื้อ ที่ทนต่อการแช่เยือกแข็ง เชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยา แวนโคมัยซินvancomycin-resistant enterococci (VRE)
31. *Trichophyton rubrum*	เชื้อรา	ทำให้เกิดโรคกลาก เชื้อราที่ผิวหนัง เชื้อราที่เล็บ
32. *T.mentagrophytes*		
33. *Candida krucei*		
34. *Candida tropicalis*		

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ลักษณะโดยทั่วไป	การก่อโรค
35. *Candida albicans*	ยีสต์ที่มีรูปร่างทั้งในแบบ yeast form และmycelial form แล้วแต่ระยะเวลาของการเจริญเติบโต แบ่งตัวโดย budding อาจสร้าง pseudomycelium โดย bud มาจับติดกันและยาวออกเป็นเส้น	พบทั่วไปตามผิวหนัง ภายในปาก ช่องคลอด และในอุจจาระทำให้เกิดอาการช่องคลอดอักเสบ ตกขาวผิดปรกติและทำให้ลิ้นเป็นฝ้าขาว ผู้หญิงจำนวนไม่น้อย จะมีเชื้อราชนิดนี้อยู่ในช่องคลอด แต่จะไม่แสดงอาการอักเสบ เนื่องจากแบคทีเรียที่ไม่มีพิษภัยในช่องคลอดคอยสร้างกรด ช่วยควบคุมไม่ให้เชื้อราเจริญงอกงาม แต่ถ้าหากมีภาวะบางอย่าง ที่ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ถูกทำลายเช่น การกินยาปฏิชีวนะ ติดต่อกันนาน ๆ หรือการสวนล้างช่องคลอด จะทำให้เชื้อราเจริญได้ นอกจากนี้การกินยาคุมกำเนิด หรือการตั้งครรภ์ ก็อาจเปลี่ยนแปลงสภาพภายในช่องคลอด ทำให้เชื้อราเจริญได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.2.3 เชื้อมาลาเรีย

เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการวิจัยคือ *Plasmodium falciparum.*

3.2.4 เชื้อวัณโรค

เชื้อวัณโรคที่ใช้ในการวิจัยคือ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

3.2.5 มะเร็งในช่องปาก

เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. ทำการสำรวจอนุกรมวิธานของพืชสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือตะบูน กัดลิ้น และมะพอก และรับรองพืชสมุนไพรตัวอย่าง โดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์(Voucher Specimens)

2. นำเปลือกตะบูน กัดลิ้น และมะพอก มาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C

3. นำเปลือกตะบูน กัดลิ้น และมะพอกที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากเปลือกตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูงคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ ดังนี้

1. นำเปลือกตะบูน กัดลิ้น และมะพอกที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 0.5 Kg แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือเฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

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

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสาร โดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

ดังนั้นการสกัดพืชสมุนไพร 3 ชนิดคือตะบูน กัดลิ้น และมะพอกโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบรวมทั้งสิ้น 9 ชนิด ดังนี้ สารสกัดหยาบจากเปลือกตะบูนชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล สารสกัดหยาบจากเปลือกกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล และสารสกัดหยาบจากเปลือกมะพอกชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ทำการเจือจางสารสกัดสมุนไพรและตัวควบคุมบวก (positive control) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการตามลำดับ ทำแผนผังระบุชนิดและตำแหน่งที่หยอดสารละลายสารสกัดสมุนไพรและตัวควบคุมบวกใน 96-well microtiter plate แต่ละความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดให้ทำ 3 หลุม ภายหลังการบ่มเชื้อ 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อแบคทีเรียและ 48 ชั่วโมงสำหรับเชื้อรา อ่านผลการทดลองเป็นค่า Absorbance ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วแปลผลการทดลอง โดยเปรียบเทียบค่า Absorbance ของ broth media และ bacterial suspension ก่อนการบ่ม กับค่า Absorbance ของ broth media และลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดสมุนไพร โดยเปรียบเทียบค่า Absorbance ของ broth media และ bacterial suspension และลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดสมุนไพร ถ้าค่า Absorbance ของ broth media และ bacterial suspension และลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดสมุนไพรมีค่าต่ำกว่าแสดงว่าสารละลายสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดสมุนไพรตัวสุดท้ายที่มีค่าต่ำกว่า คือ ค่า MIC

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอล

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ANTIOXIDANT ACTIVITY) โดยการนำสารสกัดมาทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenl-2-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 EC_{50} ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการลดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร $DPPH_{เริ่มต้น}$ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) เป็น positive control สารตัวอย่างและ BHT ละลายใน DMSO โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

ปริมาณสารประกอบฟีนอลจากสารสกัดหยาบ สามารถวัดได้โดยการใช้ 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 Na_2CO_3 (7.5%, w/v) ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบฟีนอล รายงานเป็น มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับกรดแกลลิดต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ 1 กรัม

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

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

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

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

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

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

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และจะรายงานผลเป็นค่า MIC (μg/ml)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก

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

ถ้าสามามารถต้านมะเร็งได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ถ้าสามามารถต้านมะเร็งได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และจะรายงานผลเป็นค่า MIC (μg/ml)

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2550 – 30 กันยายน 2551

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

1. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
2. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
3. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
4. คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
5. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งประกอบด้วยฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ต้านมะเร็ง ของสารสกัดหยาบจากเปลือกของพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือต้นตะบูน ต้นกัดลิ้น และต้นมะพอก การสกัดใช้เทคนิค Sequential Extraction และใช้วิธีการหมักแบบ Maceration โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอลได้สารสกัดหยาบ 9 ชนิด คือสารสกัดหยาบจากเปลือกตะบูนชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล สารสกัดหยาบจากเปลือกกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล และสารสกัดหยาบจากเปลือกมะพอกชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ

คณะผู้วิจัยนำเสนอผลการทดลองดังนี้

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอล

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

4.4 การทดสอบาฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

5.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกของต้นตะบูน

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC) ของเชื้อจุลินทรีย์ 35 ชนิด ได้ผลการทดสอบดังนี้

1. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนด้วยเฮกเซนเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 26 ชนิดดังนี้ *S. milleri* group ,*S. mutans* ATCC 27175,*S. sobrinus* ,*B. subtilis* ATCC 26633, *B. pertussis* , *C. diphtheriae, V. cholerae* ,*V. paraheamolyticus* ,*Staphylococcus* coagulase-negative ,*S. aureus* ATCC 25923 *S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625, *S. aureus* (MRSA)20626 ,*S.aureus* (MRSA)20627, *S. aureus* (MRSA)20630 ,*S. aureus* (MRSA)20631, *S.aureus* (MRSA)20632, *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20635, *S.aureus* (MRSA)20636, *S.aureus* (MRSA)20652 ,*S. aureus* (MRSA)20653, *S. aureus* (MRSA)20654, *S. aureus* (VRSA)20623, *S. aureus* (hVISA) ATCC 700698 ,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes* ได้โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 62.5 – 1,000 μg/ml

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเฮกเซนไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. pneumoniae, S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20628 , *S. aureus* (VRSA)20622, *S. aureus* (VRSA)21083, *E. faecalis* (VRE) ATCC 51299, *C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเอทิลแอซิเตตเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 26 ชนิดดังนี้ *S. milleri* group ,*S. mutans* ATCC 27175,*S. sobrinus* ,*Bacillus subtilis* ATCC 26633, *B. pertussis* ,*C. diphtheriae, V. cholerae* ,*V. paraheamolyticus*,*S. aureus* ATCC 25923 *S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625, *S. aureus* (MRSA)20626 ,*S.aureus* (MRSA)20627,*S. aureus* (MRSA)20628 ,*S. aureus*(MRSA)20630,*S. aureus*(MRSA)20631,*S.aureus* (MRSA)20632, *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20635, *S.aureus* (MRSA)20636, *S.aureus* (MRSA)20652 ,*S. aureus* (MRSA)20653, *S. aureus* (MRSA)20654 ,*S. aureus* (VRSA)20623,*S. aureus* (hVISA) ATCC 700698, *S. aureus* (VRSA)21083 โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 15.6 – 1,000 μg/ml

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเอทิลแอซิเตตไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. pneumoniae* ,*Staphylococcus* coagulase-negative, *S. aureus* (VRSA)20622 , *E. faecalis* (VRE) ATCC 51299 ,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes* , *C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเมทานอลเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อจุลินทรีย์ได้ 30 ชนิด ดังนี้ *S. milleri* group ,*S. mutans* ATCC 27175,*S. sobrinus* ,*B. subtilis* ATCC 26633, *B. pertussis* , *C. diphtheriae*, *Vibrio cholerae* ,*V. paraheamolyticus* ,*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625, *S. aureus* (MRSA)20626 ,*S.aureus* (MRSA)20627, *S. aureus* (MRSA)20628 , *S. aureus* (MRSA)20630 ,*S. aureus* (MRSA)20631, *S.aureus* (MRSA)20632, *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20635, *S.aureus* (MRSA)20636, *S.aureus* (MRSA)20652 ,*S. aureus* (MRSA)20653, *S. aureus* (MRSA)20654 , *S. aureus* (VRSA)20622 , *S. aureus* (VRSA)20623,*S. aureus* (hVISA) ATCC 700698, *S. aureus* (VRSA)21083, *E. faecalis* (VRE) ATCC 51299 ,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes* โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 7.8 – 500 μg/ml

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเมทานอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. pneumoniae* , ,*Staphylococcus* coagulase-negative *C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกตะบูนแสดงดังตารางที่ 4.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกตะบูนด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (µg/ml)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	*S. milleri* group	125.00	31.25	15.60
2	*S. mutans* ATCC 27175	62.50	15.60	15.60
3	*S. pneumoniae*	> 1000	> 1000	> 1000
4	*S. sobrinus*	1000	250	15.60
5	*B. subtilis* ATCC 26633	1000	1000	125
6	*B. pertussis*	500	500	250
7	*C. diptheriae*	62.50	15.60	15.60
8	*V. cholerae*	500	1000	250
9	*V. paraheamolyticus*	500	1000	31.25
10	*Staphylococcus* coag negative	500	> 1000	> 1000
11	*S. aureus* ATCC 25923	1000	250	62.50
12	*S. aureus* (MRSA) N1	>1000	250	62.50
13	*S. aureus (*MRSA) 20625	1000	250	31.25
14	*S. areus* (MRSA) 20626	1000	31.25	7.8
15	*S. aureus* (MRSA) 20627	1000	62.50	15.60
16	*S. aureus* (MRSA) 20628	>1000	250	125
17	*S. aureus* (MRSA) 20630	1000	250	62.50
18	*S. aureus* (MRSA) 20631	1000	250	62.50
19	*S. aureus* (MRSA) 20632	1000	500	62.50
20	*S. aureus* (MRSA) 20633	1000	500	125
21	*S. aureus* (MRSA) 20635	1000	500	62.50
22	*S. aureus* (MRSA) 20636	1000	62.5	62.50
23	*S. aureus* (MRSA) 20652	62.50	1000	62.50
24	*S. aureus (MRSA)* 20653	1000	125	125
25	*S. aureus* (MRSA) 20654	1000	500	125
26	*S. aureus* (VRSA) 20622	>1000	> 1000	125
27	*S. aureus* (VRSA) 20623	1000	500	62.50

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (µg/ml)		
		Hexane	**Ethylacetate**	**Methanol**
28	*S. aureus* (hVISA) ATCC 700698	1000	250	62.50
29	*S. aureus* (VRSA) 21083	>1000	62.50	62.50
30	*E. faecalis* (VRE) ATCC 51299	>1000	> 1000	250
31	*Trichophyton rubrum*	250	> 1000	125
32	*T. mentagrophytes*	500	> 1000	500
33	*Candida albicans*	>1000	> 1000	> 1000
34	*C. krucei*	>1000	> 1000	> 1000
35	*C. tropicalis*	>1000	> 1000	> 1000

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกกัดลิ้น

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC) ของเชื้อจุลินทรีย์ 35 ชนิด ได้ผลการทดสอบดังนี้

1. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเฮกเซนเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 18 ชนิดดังนี้ *S. milleri* group ,*S. mutans* ATCC 27175, *S. sobrinus* , *C. diphtheriae, V. paraheamolyticus* ,*Staphylococcus* coagulase-negative ,*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* (MRSA)20626 ,*S.aureus* (MRSA)20627,*S. aureus* (MRSA)20630 *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20635, *S.aureus* (MRSA)20652 ,*S. aureus* (MRSA)20654, *S. aureus* (VRSA)20623, ,*S. aureus* (hVISA) ATCC 700698,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes* โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 62.5 – 1,000 µg/ml

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเฮกเซนไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. pneumoniae, B. subtilis* ATCC 26633, *B. pertussis, S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625, *S. aureus* (MRSA)20628, *V. cholerae,S. aureus* (MRSA)20631, *S.aureus*(MRSA)20632,*S.aureus*(MRSA)20636, *S. aureus* (MRSA)20653 ,*S. aureus* (VRSA)20622, *S. aureus* (VRSA)21083, *E. faecalis* (VRE) ATCC 5129,*C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเอทิลแอซิเตตเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ได้เพียงชนิดเดียวคือ *S. milleri* group โดยมีค่า MIC เท่ากับ 500 µg/ml

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเอทิลแอซิเตตไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. mutans* ATCC 27175 *S. pneumoniae, S. sobrinus* ,*B. subtilis* ATCC 26633, *B. pertussis* ,*C. diphtheriae, V. cholerae* ,*V. paraheamolyticus* ,*Staphylococcus* coagulase-negative ,*S. aureus* ATCC 25923 *S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625, *S. aureus* (MRSA)20626 ,*S.aureus* (MRSA)20627, *S. aureus* (MRSA)20628 , *S. aureus* (MRSA)20630 , *S. aureus* (MRSA)20631, *S.aureus* (MRSA)20632, *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20635, *S.aureus* (MRSA)20636, *S.aureus* (MRSA)20652 ,*S. aureus* (MRSA)20653, *S. aureus* (MRSA)20654 , *S. aureus* (VRSA)20622 ,*S. aureus* (VRSA)20623,*S. aureus* (hVISA)

ATCC 700698, *S. aureus* (VRSA)21083, *E. faecalis* (VRE) ATCC 51299 ,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes* ,*C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเมทานอลเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เชื้อจุลินทรีย์ได้ 28 ชนิดดังนี้ *S. milleri* group ,*S. mutans* ATCC 27175,*S. sobrinus* ,*B. subtilis* ATCC 26633, *B. pertussis* , *C. diphtheriae*, *Vibrio cholerae* ,*V. paraheamolyticus* ,*S. aureus* ATCC 25923 *S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625, *S. aureus* (MRSA)20626 ,*S.aureus* (MRSA)20627, *S. aureus* (MRSA)20628 , *S. aureus* (MRSA)20630 ,*S. aureus* (MRSA)20631, *S.aureus* (MRSA)20632, *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20635, *S.aureus* (MRSA)20636, *S.aureus* (MRSA)20652 ,*S. aureus* (MRSA)20653, *S. aureus* (MRSA)20654 , *S. aureus* (VRSA)20622 , *S. aureus* (VRSA)20623,*S. aureus* (hVISA) ATCC 700698, *S. aureus* (VRSA)21083, *E. faecalis* (VRE) ATCC 51299 โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 15.6 – 500 µg/ml

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเมทานอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. pneumoniae* , ,*Staphylococcus* coagulase-negative ,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes* , *C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกกัดลิ้นแสดงดังตารางที่ 4.2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกกัดลิ้น ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (µg/ml)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	*S. milleri* group	500	500	125
2	*S. mutans* ATCC 27175	62.50	> 1000	500
3	*S. pneumoniae*	> 1000	> 1000	> 1000
4	*S. sobrinus*	1000	> 1000	15.6
5	*B. subtilis* ATCC 26633	> 1000	> 1000	250
6	*B. pertussis*	> 1000	> 1000	250
7	*C. diptheriae*	500	> 1000	250
8	*V. cholerae*	> 1000	> 1000	500
9	*V. paraheamolyticus*	500	> 1000	250
10	*Staphylococcus* coag negative	1000	> 1000	> 1000
11	*S. aureus* ATCC 25923	1000	> 1000	62.5
12	*S. aureus* (MRSA) N1	> 1000	> 1000	125
13	*S. aureus* (MRSA) 20625	> 1000	> 1000	62.5
14	*S. areus* (MRSA) 20626	1000	> 1000	31.25
15	*S. aureus* (MRSA) 20627	1000	> 1000	125
16	*S. aureus* (MRSA) 20628	> 1000	> 1000	250
17	*S. aureus* (MRSA) 20630	1000	> 1000	250
18	*S. aureus* (MRSA) 20631	> 1000	> 1000	125
19	*S. aureus* (MRSA) 20632	> 1000	> 1000	125
20	*S. aureus* (MRSA) 20633	1000	> 1000	500
21	*S. aureus* (MRSA) 20635	1000	> 1000	62.50
22	*S. aureus* (MRSA) 20636	> 1000	> 1000	125
23	*S. aureus* (MRSA) 20652	1000	> 1000	500
24	*S. aureus (MRSA)* 20653	> 1000	> 1000	125
25	*S. aureus* (MRSA) 20654	1000	> 1000	500
26	*S. aureus* (VRSA) 20622	> 1000	> 1000	125

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (μg/ml)		
		Ethylacetate	**Ethylacetate**	**Ethylacetate**
27	*S. aureus* (VRSA) 20623	1000	> 1000	250
28	*S. aureus* (hVISA) ATCC 700698	1000	> 1000	62.50
29	*S. aureus* (VRSA) 21083	> 1000	> 1000	125
30	*E. faecalis* (VRE) ATCC 51299	> 1000	> 1000	1000
31	*Trichophyton rubrum*	1000	> 1000	> 1000
32	*T. mentagrophytes*	1000	> 1000	> 1000
33	*Candida albicans*	> 1000	> 1000	> 1000
34	*C. krucei*	> 1000	> 1000	> 1000
35	*C. tropicalis*	> 1000	> 1000	> 1000

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกมะพอก

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC) ของเชื้อจุลินทรีย์ 35 ชนิด ได้ผลการทดสอบดังนี้

1. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเฮกเซน เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 25 ชนิดดังนี้ *S. milleri* group ,*S. mutans* ATCC 27175, *S. sobrinus* , ,*C. diphtheriae*, ,*Staphylococcus* coagulase-negative ,*S. aureus* ATCC 25923 , *S.aureus* (MRSA)20635, , *S.aureus* (MRSA)20652 „ , *S. aureus* (VRSA)20623 และ *S. aureus* (hVISA) ATCC 700698. โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 62.5 – 1,000 µg/ml

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเฮกเซนไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. pneumoniae, S. aureus* (MRSA)20628 , *Bacillus subtilis* ATCC 26633, *B. pertussis* ,*V.cholerae*,, ,*V.paraheamolyticus, S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625, *S. aureus* (MRSA)20626 ,*S.aureus* (MRSA)20627, *S. aureus* (MRSA)20630 ,*S. aureus* (MRSA)20631, *S.aureus* (MRSA)20632, *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20636, *S. aureus* (MRSA)20653, *S. aureus* (MRSA)20654, *S. aureus* (VRSA)20622, *S. aureus* (VRSA)21083, *E. faecalis* (VRE) ATCC 51299, ,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes, C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเอทิลแอซิเตตเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้5 ชนิด คือ *S. milleri* group , *B. subtilis* ATCC 26633,*C. diphtheriae* , *S. aureus* (MRSA)20626 และ*S. aureus* (MRSA)20652. โดยมีค่าMIC เท่ากับ 1,000 µg/ml

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเอทิลแอซิเตตไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. mutans* ATCC 27175, *S. pneumoniae* , *S. sobrinus* , *B. pertussis*, *V. cholerae* ,*V. paraheamolyticus* ,*Staphylococcus* coagulase-negative , *S. aureus* ATCC 25923 *S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625 ,*S.aureus* (MRSA)20627, *S. aureus* (MRSA)20628 , *S. aureus* (MRSA)20630 , *S. aureus* (MRSA)20631, *S. aureus* (MRSA)20632, *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20635, *S.aureus* (MRSA)20636,*S. aureus* (MRSA)20653, *S. aureus* (MRSA)20654 , *S. aureus* (VRSA)20622,*S. aureus* (VRSA)20623, *S. aureus* (hVISA)

ATCC 700698, *S. aureus* (VRSA)21083, *E. faecalis* (VRE) ATCC 51299 ,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes* ,*C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเมทานอล เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 26 ชนิดดังนี้ *S.milleri* group, *S.sobrinus*, *B.subtilis*ATCC 26633, *B. pertussis* ,*C. diphtheriae*, ,*V. paraheamolyticus*, *Staphylococcus* coagulase-negative ,*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* (MRSA) N1, *S. aureus* (MRSA)20625, *S. aureus* (MRSA)20626 ,*S.aureus* (MRSA)20627, *S. aureus* (MRSA)20628, *S. aureus* (MRSA)20630 ,*S. aureus* (MRSA)20631, *S.aureus* (MRSA)20632, *S.aureus* (MRSA)20633, *S.aureus* (MRSA)20635, *S.aureus* (MRSA)20636, *S.aureus*(MRSA)20652 ,*S. aureus* (MRSA)20653, *S. aureus* (MRSA)20654 , *S. aureus* (VRSA)20622 , *S. aureus* (VRSA)20623,*S. aureus* (hVISA) ATCC 700698, *S. aureus* (VRSA)21083, โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 31.25 – 1,000 µg/ml

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเมทานอล ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้คือ *S. mutans* ATCC 27175, *S. pneumoniae*,*V. cholerae E. faecalis* (VRE) ATCC 51299,*T. rubrum* ,*T.mentagrophytes* , *C. albicans* , *C. krucei* และ *C. tropicalis*

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกมะพอกแสดงดังตารางที่ 4.3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกมะพอกด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (µg/ml)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	*S. milleri* group	500	1000	62.5
2	*S. mutans* ATCC 27175	62.5	> 1000	> 1000
3	*S. pneumoniae*	> 1000	> 1000	> 1000
4	*S. sobrinus*	62.5	> 1000	62.5
5	*B. subtilis* ATCC 26633	> 1000	1000	500
6	*B. pertussis*	> 1000	> 1000	500
7	*C. diptheriae*	500	1000	1000
8	*V. cholerae*	> 1000	> 1000	> 1000
9	*V. paraheamolyticus*	> 1000	> 1000	62.5
10	*Staphylococcus* coag negative	1000	> 1000	500
11	*S. aureus* ATCC 25923	1000	> 1000	250
12	*S. aureus* (MRSA) N1	> 1000	> 1000	125
13	*S. aureus* (MRSA) 20625	> 1000	> 1000	31.25
14	*S. areus* (MRSA) 20626	> 1000	1000	31.25
15	*S. aureus* (MRSA) 20627	> 1000	> 1000	125
16	*S. aureus* (MRSA) 20628	> 1000	> 1000	125
17	*S. aureus* (MRSA) 20630	> 1000	> 1000	125
18	*S. aureus* (MRSA) 20631	> 1000	> 1000	125
19	*S. aureus* (MRSA) 20632	> 1000	> 1000	250
20	*S. aureus* (MRSA) 20633	> 1000	> 1000	125
21	*S. aureus* (MRSA) 20635	1000	> 1000	250
22	*S. aureus* (MRSA) 20636	> 1000	> 1000	250
23	*S. aureus* (MRSA) 20652	500	1000	1000
24	*S. aureus (MRSA)* 20653	> 1000	> 1000	250
25	*S. aureus* (MRSA) 20654	> 1000	> 1000	250
26	*S. aureus* (VRSA) 20622	> 1000	> 1000	250

ภาควิชาเคมีเทคนิค วิทยาลัยเทคโนโลยีและการจัดการอุตสาหกรรม

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (µg/ml)		
		Ethylacetate	**Ethylacetate**	**Ethylacetate**
27	*S. aureus* (VRSA) 20623	1000	> 1000	250
28	*S. aureus* (hVISA) ATCC 700698	1000	> 1000	250
29	*S. aureus* (VRSA) 21083	> 1000	> 1000	250
30	*E. faecalis* (VRE) ATCC 51299	> 1000	> 1000	> 1000
31	*Trichophyton rubrum*	> 1000	> 1000	> 1000
32	*T. mentagrophytes*	> 1000	> 1000	> 1000
33	*Candida albicans*	> 1000	> 1000	> 1000
34	*C. krucei*	> 1000	> 1000	> 1000
35	*C. tropicalis*	> 1000	> 1000	> 1000

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอล

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

นำสารสกัดหยาบ(Crude Extract) จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ได้ผลการทดสอบดังนี้

1. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีค่า EC_{50} เท่ากับ > 1000, 100 และ 35 µg/ml ตามลำดับ

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีค่า EC_{50} เท่ากับ > 1000, > 1000 และ 107 µg/ml ตามลำดับ

3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีค่า EC_{50} เท่ากับ > 1000, > 1000 และ 200 µg/ml ตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแสดงดังตารางที่ 4.4

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

สารสกัด	DPPH EC_{50} (µg/ml)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
Standard (BHT)	9.5		
ตะบูน	> 1000	100	35
กัดลิ้น	> 1000	> 1000	107
มะพอก	> 1000	> 1000	200

4.2.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

นำสารสกัดหยาบ(Crude Extract) จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ได้ผลการทดสอบดังนี้

1. ปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเฮกเซน เอทิล-แอซิเตต และเมทานอล ค่า 2.855, 64.704 และ 95.977 mg GAE/g dw ตามลำดับ

2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิล-แอซิเตต และเมทานอล ค่า 2.644, 12.036 และ 55.166 mg GAE/g dw ตามลำดับ

2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเฮกเซน เอทิล แอซิเตต และเมทานอล ค่า 3.195, 12.084 และ 42.758 mg GAE/g dw ตามลำดับ

ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

สารสกัด	Total Phenolic (mg GAE/g dw)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
ตะบูน	2.855	64.704	95.977
กัดลิ้น	2.644	12.036	55.166
มะพอก	3.195	12.084	42.758

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

นำสารสกัดหยาบ(Crude Extract) จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย(Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*) ได้ผลการทดสอบดังนี้

สารสกัด จำนวน 1 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย คือสารสกัดของเปลือกมะพอกด้วยเฮกเซน สามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย และมีค่า IC_{50} 3.25 µg/ml ส่วนสารสกัดอื่นๆ ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

สารสกัด	IC_{50} (µg/ml)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
ตะบูน	-	-	-
กัดลิ้น	-	-	-
มะพอก	3.25	-	-

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

นำสารสกัดหยาบ(Crude Extract) จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB) ได้ผลการทดสอบดังนี้

สารสกัด จำนวน 1 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคคือ สารสกัดของเปลือกกัดลิ้นด้วยเอทิลแอซิเตต สามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และมีค่า IC_{50} 50.00 µg/ml ส่วนสารสกัดอื่นๆ ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคแสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

สารสกัด	MIC (µg/ml)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
ตะบูน	-	-	-
กัดลิ้น	-	50.00	-
มะพอก	-	-	-

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer)นำสารสกัดหยาบ(Crude Extract) จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) ได้ผลการทดสอบดังนี้สารสกัด จำนวน 7 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

1. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเฮกเซนและเมทานอลมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีค่า MIC เท่ากับ35.45 และ 31.63 μg/ml ตามลำดับ

ส่วนสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเอทิลแอซิเตตไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตตและเมทานอลมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีค่า MIC เท่ากับ 4.93, 1.35 และ 15.04 μg/ml ตามลำดับ

3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเฮกเซน และเอทิลแอซิเตตมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีค่า MIC เท่ากับ 34.12 และ 19.09 μg/ml ตามลำดับ

ส่วนสารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเมทานอลไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ผลการทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปากแสดงดังตารางที่ 4.8

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเปลือกของตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

สารสกัด	MIC (μg/ml)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
ตะบูน	35.45	-	31.63
กัดลิ้น	4.93	1.35	15.04
มะพอก	34.12	19.03	-

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

5.1.1.1 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกตะบูน

1. สารสกัดจากเปลือกตะบูนด้วยเฮกเซน แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 26 ชนิด
2. สารสกัดจากเปลือกตะบูนด้วยเอทิลแอซิเตต แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 26 ชนิด
3. สารสกัดจากเปลือกตะบูนด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 30 ชนิด

5.1.1.2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกกัดลิ้น

1. สารสกัดจากเปลือกกัดลิ้นด้วยเฮกเซน แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 18 ชนิด
2. สารสกัดจากเปลือกกัดลิ้นด้วยเอทิลแอซิเตต แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 1 ชนิด
3. สารสกัดจากเปลือกกัดลิ้นด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 28 ชนิด

5.1.1.3 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกมะพอก

1. สารสกัดจากเปลือกมะพอกด้วยเฮกเซน แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 25 ชนิด
2. สารสกัดจากเปลือกมะพอกด้วยเอทิลแอซิเตต แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 5ชนิด
3. สารสกัดจากเปลือกมะพอกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 27 ชนิด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

5.1.2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอล

5.1.2.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูน กัดลิ้น และมะพอกชั้นเมทานอล แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยมีค่า EC_{50} 35, 107 และ 200 µg/ml

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูน กัดลิ้น และมะพอกชั้นเฮกเซนไม่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

5.1.2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอล

1. สารสกัดจากเปลือกตะบูนด้วยเมทานอล มีค่า Total Phenolic สูงสุดคือ 95.977 mg GAE/g dw

2. สารสกัดจากแปลือกกัดลิ้นด้วยเฮกเซน มีค่า Total Phenolic ต่ำสุดคือ 2.855 mg GAE/g dw

5.1.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย(Anti-malaria ; *Plasmodium falciparum*) มีสารสกัด 1 ชนิดคือสารสกัดจากเปลือกมะพอกด้วยเฮกเซน สามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยมีค่า IC_{50} 3.25 µg/ml ส่วนสารสกัดอื่นไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย

5.1.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB) มีสารสกัด จำนวน 1 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคคือ สารสกัดจากเปลือกกัดลิ้นด้วยเอทิลแอซิเตต สามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 90 โดยมีค่า IC_{50} 50.00 µg/ml ส่วนสารสกัดอื่นๆ ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

5.1.5 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) มีสารสกัด จำนวน 7 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ดังนี้

1. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นตะบูนชั้นเฮกเซนและเมทานอลมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีค่า MIC เท่ากับ35.45 และ 31.63 μg/ml ตามลำดับ

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตตและเมทานอลมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีค่า MIC เท่ากับ 4.93, 1.35 และ 15.04 μg/ml ตามลำดับ

3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของต้นมะพอกชั้นเฮกเซน และเอทิลแอซิเตตมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง มีค่า MIC เท่ากับ 34.12 และ 19.09 μg/ml ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผล

ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดคือ ตะบูน กัดลิ้น และมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอลจะได้สารสกัดหยาบรวมทั้งสิ้น 9 ชนิด ซึ่งจากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพมีประเด็นที่เป็นข้อสังเกตดังนี้

1. ฤทธิ์ต้านจุลชีพ สารสกัดจากเปลือกตะบูนด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้จำนวนมากที่สุด โดยสามารถออกฤทธิ์ต้านจุลชีพที่มีค่า MIC 15.60- 62.50 μg/ml จำนวน 18 ชนิด

2. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอล สารสกัดจากเปลือกตะบูนด้วยเมทานอลมีความสามารถในการลด DPPH ได้ดีที่สุดและมีค่า EC_{50} 35 μg/ml

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย สารสกัดจากเปลือกมะพอกด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียเพียงชนิดเดียว โดยมีค่า IC_{50} 3.25 μg/ml

4. ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค สารสกัดจากเปลือกกัดลิ้นด้วยเอทิลแอซิเตตมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคเพียงชนิดเดียวโดยมีค่า IC_{50} 50.00 μg/ml

5. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง สารสกัดจากเปลือกกัดลิ้นด้วยเอทิลแอซิเตตมีค่า MIC 1.35 μg/ml

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องการสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในครั้งนี้เป็นการนำส่วนของเปลือกของพืชสมุนไพรมาทำการสกัด ทำให้ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพเฉพาะส่วนดังกล่าว ดังนั้นสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป ควรทำวิจัยในลักษณะเดียวกันนี้ โดยศึกษาเพิ่มในส่วนอื่นๆได้แก่ ราก เมล็ด ใบ ดอก และผล ของพืชสมุนไพร เพื่อให้ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพที่ครอบคลุม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยเชิงพาณิชย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บรรณานุกรม

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

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

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

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

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

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

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

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

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

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

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

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

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

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

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

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

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

28. 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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี ศิลปากร พระนคร

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

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

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

คณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

นายอุดมวิชช์ พลเยี่ยม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 6
สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
สัดส่วนที่ทำการวิจัย 70 %

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

นายภาณุภัทร ตางาม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8
สาขาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
สัดส่วนที่ทำการวิจัย 20 %

นางอมรรัตน์ ทองน้อย
นักวิชาการ ระดับ 7
ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
สัดส่วนที่ทำการวิจัย 10 %

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร