รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านจุลชีพของเห็ดและพืชสมุนไพร

อุดมวิชช์ พลเยี่ยม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณผลประโยชน์ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Mushrooms and Medicinal Plant

Udomwish Polyium

This Research in Funded by
Institute of Research and Development
Rajamangala University of Technology Phra Nakorn
Fiscal Year 2009

ชื่อเรื่อง : ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านจุลชีพของเห็ดและพืชสมุนไพร

ผู้วิจัย : อุดมวิชช์ พลเยี่ยม

พ.ศ. : 2552

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และใบมะพอก การสกัดใช้เทคนิค Sequential Extraction และใช้วิธีการหมักแบบ Maceration โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบ 18 ชนิด ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB- human mouth carcinoma) ฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (human small cell lung cancer : NCI-H187) และฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม (breast cancer : MCF-7) ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค(Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB) ด้วยวิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA)

ผลการวิจัยพบว่า

1. สารสกัดจากรากกัดลิ้นด้วยด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 1.11- 22.90 μg/ml.

2. สารสกัดจากใบกัดลิ้นด้วยด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 10.42 – 40.14 μg/ml.

3. สารสกัดจากรากมะพอกด้วยด้วยเฮกเซน และเอทิลแอซิเตต มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 16.05 - 29.50μg/ml.

4. สารสกัดจากเปลือกตะบันด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก โดยมีค่า IC_{50} 27.77 μg/ml.

5. สารสกัดจากรากกัดลิ้นด้วยด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 3.30 – 39.29 μg/ml.

6. สารสกัดจากใบกัดลิ้นด้วยด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 17.02 – 25.76μg/ml.

7. สารสกัดจากรากมะพอกด้วยเฮกเซน และเอทิลแอซิเตต มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดโดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 39.83 – 48.90 μg/ml..

8. สารสกัดจากรากกัดลิ้นด้วยด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 0.84 – 26.87 μg/ml.

9. สารสกัดจากรากกัดลิ้นด้วยด้วยเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม โดยมีค่า IC_{50} ระหว่าง 26.07- 36.37 μg/ml.

10. สารสกัดจากใบกัดลิ้นด้วยด้วยเอทิลแอซิเตต และสารสกัดจากใบมะพอกด้วยเฮกเซน มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคโดยมีค่า MIC_{50} of 50.00 μg/ml.

Title : **Cytotoxic and Antimicrobial Activies of Mushrooms and Medicinal Plant**
Researcher : **Udomwish Polyium**
Year : **2008**

ABSTRACT

Extractions of bioactive constituent from the *Russula eburneureolata Hongo.,* stem bark of *Xylocarpus gangeticus* Parkins., root and leaf of *Walsura trichostemon* Miq. and *Parinari anamense* Hance, with a polarity sequential extraction and maceration technique with hexane, ethyl acetate and methanol.,respectively. Crude extract was employed to evaluate the biological activity for their cytotoxic activity against human mouth carcinoma (KB), human small cell lung cancer (NCI-H187) and breast cancer (MCF-7) cancer cell lines, tested using the Resazurin microplate assay (REMA). and Antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain (Anti-TB) using the Green Fluorescent Protein Microplate Assay (GFPMA)

The results were as follows :

1. crude hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the root of *Walsura trichostemon* Miq. showed inhibitory effect against KB cancer cell lines with IC_{50} values of 1.11- 22.90 μg/ml.

2. crude hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the leaf of *Walsura trichostemon* Miq. showed inhibitory effect against KB cancer cell lines with IC_{50} values of 10.42 – 40.14 μg/ml.

3. crude hexane and ethyl acetate extracts from the root of *Parinari anamense* Hance. showed inhibitory effect against KB cancer cell lines with IC_{50} values of 16.05 - 29.50μg/ml.

4. crude methanol extracts from the stem bark of *Xylocarpus gangeticus* Parkins. showed inhibitory effect against KB cancer cell lines with IC_{50} values of 27.77 μg/ml.

5. crude hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the root of *Walsura trichostemon* Miq. showed inhibitory effect against NCI-H187cancer cell lines with IC_{50} values of 3.30 – 39.29 μg/ml.

6. crude hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the leaf of *Walsura trichostemon* Miq. showed inhibitory effect against NCI-H187 cancer cell lines with IC_{50} values of 17.02 – 25.76μg/ml.

7. crude hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the root of *Parinari anamense* Hance. showed inhibitory effect against NCI-H187 cancer cell lines with IC_{50} values of 39.83 – 48.90 μg/ml.

8. crude hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the root of *Walsura trichostemon* Miq. showed inhibitory effect against MCF-7cancer cell lines with IC_{50} values of 0.84 – 26.87 μg/ml.

9. crude hexane, ethyl acetate and methanol extracts from the leaf of *Walsura trichostemon* Miq. showed inhibitory effect against MCF-7cancer cell lines with IC_{50} values of 26.07- 36.37 μg/ml.

10. Crude ethyl acetate extract leaf of *Walsura trichostemon* Miq. and Crude hexane extract of leaf of *Parinari anamense* Hance. showed inhibitory effect against *M. tuberculosis* with MIC_{50} of 50.00 μg/ml.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านจุลชีพของเห็ดและพืชสมุนไพรนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินผลประโยชน์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 ของสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์จุฑา พีระพัชระ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้สนับสนุนการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ อาจารย์สุรพร กิตติสารวัณโณ คณบดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการทางเคมีอินทรีย์ในการทดลอง เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTECH) ที่ให้คำปรึกษาและการทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VI

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 เห็ดและพืชสมุนไพร 4

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร 9

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร 11

2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร 20

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร 22

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร 30

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 37

2.8 ลักษณะทั่วไปของมะเร็งและวัณโรค 38

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง 54

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 54

3.2 เห็ด สมุนไพร และจุลชีพ 55

3.3 วิธีการทดลอง 56

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 58

3.5 ระยะเวลาการทดลอง 58

3.6 สถานที่ทำการทดลอง 58

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	**59**
4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง	59
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค	68
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	**71**
5.1 สรุปผลการทดลอง	71
5.2 อภิปรายผล	72
5.3 ข้อเสนอแนะ	72
บรรณานุกรม	**73**
ภาคผนวก	**77**
ประวัตินักวิจัย	77

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี	28
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเฮกเซน	59
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเอทิลแอซิเตต	60
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเมทานอล	61
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยเฮกเซน	62
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเอทิลแอซิเตต	63
4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเมทานอล	64
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเฮกเซน	65
4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเอทิลแอซิเตต	66
4.9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเมทานอล	67
4.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเฮกเซน	68
4.11 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเอทิลแอซิเตต	69
4.12 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเมทานอล	70

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

ประเทศไทยมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อน ส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพ(Biodiversity) ทั้งพันธุ์พืช พันธุ์สัตว์ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จากความหลากหลายทางชีวภาพดังกล่าวทำให้มีพืชสมุนไพรเป็นจำนวนมาก ซึ่งพืชสมุนไพรถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคมาแต่โบราณ และสืบทอดต่อมาจนเกิดเป็นยากลางบ้านหรือยาแผนโบราณ(Traditional Medicine) พระราชบัญญัติคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย พ.ศ. 2542 ให้ความหมายของสมุนไพรว่า เป็น พืช สัตว์ จุลชีพ ธาตุวัตถุ สารสกัดดั้งเดิมจากพืชหรือสัตว์ที่ใช้แปรสภาพ ผสม ปรุงเป็นยาหรืออาหาร เพื่อการวินิจฉัย บำบัด รักษา ป้องกันโรค ส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์หรือสัตว์ และให้หมายความรวมถึงถิ่นกำเนิดหรือถิ่นที่อยู่อาศัยของสิ่งดังกล่าวด้วย ส่วนเห็ดนอกจากใช้บริโภคเป็นอาหาร เป็นอาหารเสริม บางชนิดมีสรรพคุณเป็นยา จึงมีความสนใจการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสารสกัดสารบริสุทธิ์จากเห็ดใช้เป็นยา(pharmaceutica)

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

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

มั่นคงของภาคเศรษฐกิจท้องถิ่นและชุมชน รวมทั้งพัฒนาขีดความสามารถและสร้างนวัตกรรมจากทรัพยากรชีวภาพที่เป็นเอกลักษณ์ของประเทศ

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ(Biological activity) ชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข ในการป้องกันและการรักษาโรค โดยการนำเห็ดและพืชสมุนไพร มาสกัดและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และ ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย เพื่อเพิ่มคุณค่าและพัฒนาศักยภาพของพืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด เพื่อพัฒนาไปเป็นยา อาหารเสริมหรือเครื่องสำอาง ซึ่งนำไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเห็ดและพืชสมุนไพร

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดจากเห็ดและพืชสมุนไพร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือต้นตะบัน (*Xylocarpus gangeticus* Parkins.) ต้นกัดลิ้น(*Walsura trichostemon* Miq.) และต้นมะพอก (Parinari anamense Hance) และส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยคือ ราก และใบ

1.3.2 เห็ดที่ใช้ในการวิจัยคือเห็ดดิน (*Russula eburneureolata Hongo*)

1.3.3 เชื้อวัณโรคที่ใช้ในการวิจัยคือ Mycobacterium tuberculosis ($H_{37}Ra$)

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

1.3.5 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ตัวแปรอิสระ		ตัวแปรตาม
สารสกัดจากพืชสมุนไพร **(Crude extract)**	→	**ฤทธิ์ต้านมะเร็ง** **(Anti-Cancer)** **ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค** **(Anti-Mycobacterium tuberculosis)**

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านจุลชีพของเห็ดและพืชสมุนไพรคณะผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 เห็ดและพืชสมุนไพร

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.8 ลักษณะทั่วไปของมะเร็งและวัณโรค

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ดและพืชสมุนไพร

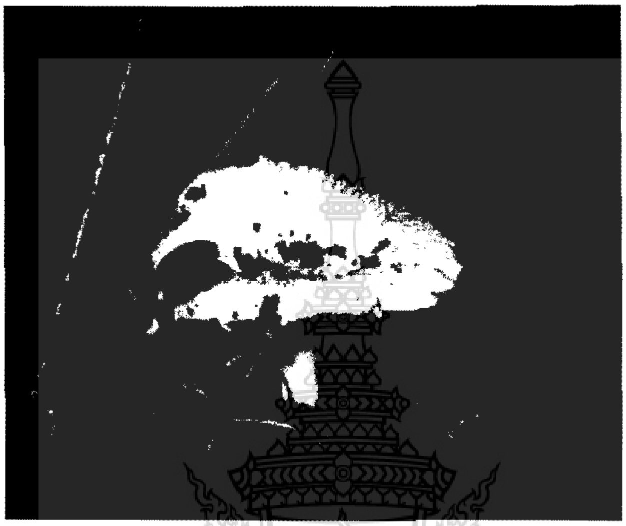
พืชสมุนไพรและเห็ดที่นำมาใช้ในการวิจัยคือเห็ดดิน ตะบัน กัดลิ้น และมะพอก ข้อมูลอนุกรมวิธานที่สำคัญของพืชสมุนไพรประกอบด้วยชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อวงศ์ ชื่อพื้นเมือง ลักษณะทั่วไป ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และประโยชน์ดังนี้

2.1.1 เห็ดดิน

1. ชื่อวิทยาศาสตร์ : Russula eburneureolata Hongo.
2. ชื่อวงศ์ : RUSSULACEAE
3. ชื่อสามัญ – ชื่อพื้นเมือง : เห็ดดิน เห็ดหน้าขาว
4. ลักษณะชีววิทยา มีลักษณะ สีขาว รูปร่างคล้ายกระจกนูน ไม่มีน้ำยาง ครีบมีสีขาว ครีบมีแอ่งเล็กๆ ติดก้าน การเรียงตัวของครีบมีขนาดเดียว ครีบบาง ก้านเป็นรูปทรงกระบอก ก้านมีความเปราะ ไม่มีเยื่อหุ้มโคนและไม่มีวงแหวนรอบดอกเห็ด สปอร์รูปร่างกลมสีขาวอมเขียว มีปุ่มนูนสานกันเป็นร่างแห ลักษะพิเศษ เปราะบาง นิเวศวิทยา บริเวณที่เก็บตัวอย่างเป็นตอไม้ผุพัง หรือต้นไม้ที่มีใบหล่นเต็ม ในป่าเต็งรัง พื้นดินมีความชื้นสูง ต้นไม้ยืนต้นใกล้บริเวณนั้น ได้แก่ ต้นชาด ต้นกุง

ต้นแดง เป็นดอกเดี่ยวพบเป็นกลุ่มน้อยกว่า 10 ดอก พบในเดือน มิถุนายน – ตุลาคม พบบ่อยและมีปริมาณมากในป่าหนองโน

5. ประโยชน์ : นำมาประกอบอาหารนิยมนำมา แกง นึ่ง หมก อ่อม ซุบ และป่น



http://www.nongno-rmu.org/index.php?option=com_content&view=article&id=52:2009-06-22-04-59-57&catid=35:2009-06-21-18-23-46&Itemid=54

2.1.2 ตะบัน

1. ชื่อวิทยาศาสตร์: Xylocarpus gangeticus Parkins.
2. ชื่อวงศ์ : MELIACEAE
3. ชื่อพื้นเมือง : ตะบัน oranga mangrove
4. ลักษณะทั่วไป : เป็นพรรณไม้ยืนต้น ลำต้นเปลือกสีดำมีปุ่มตามลำต้นและแตก กิ่งก้านเป็นพุ่มขนาดเล็กกว่าตะบูน ใบมีสีเขียวเข้มไม่ผลัดใบ ดอกขนาดเล็ก ผลคล้ายตะบูนมีขนาดทั่วไปเล็กกว่าผลตะบูน
5. ประโยชน์ : ใช้เผาทำถ่านที่ให้ความร้อนสูงกว่าไม้ชนิดอื่น เป็นแหล่งอาศัยของสัตว์น้ำ สัตว์ป่านำลำต้นมาทำเสาเข็ม และเป็นโครงสร้างหลักของโรงเรือนที่อยู่อาศัย

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

2.1.3 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

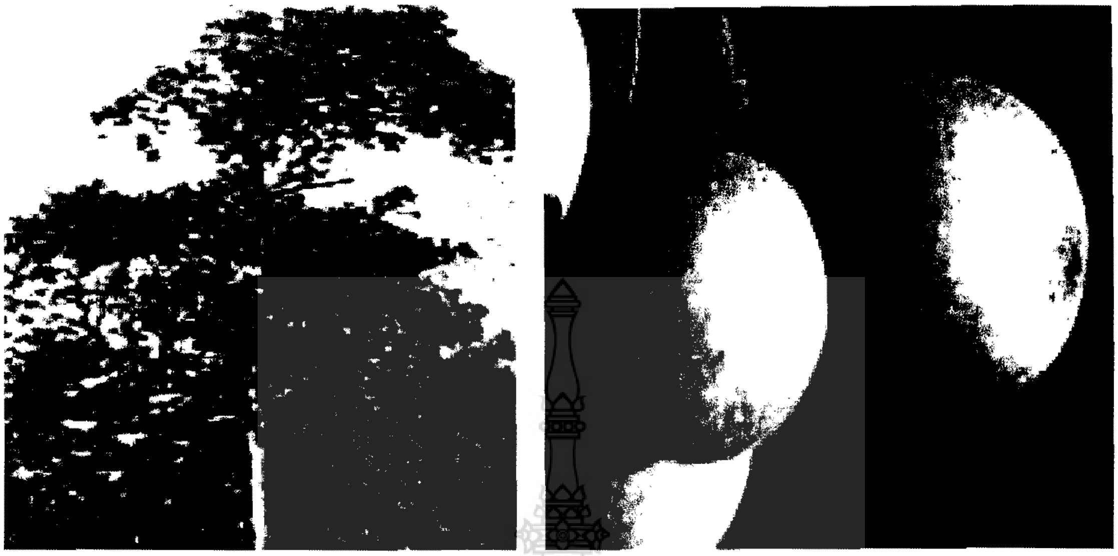
ต้น กัดลิ้นเป็นไม้ขนาดกลาง สูง 15 เมตร เปลือกต้นสีน้ำตาลปนสีเทา แตกเป็นสะเก็ดบางๆ

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 ขึ้นตามป่าดิบแล้ง ต่างประเทศพบที่ พม่าและกัมพูชา ส่วนที่ใช้เป็นอาหาร ผลสุก เนื้อหุ้มเมล็ดสีขาวรับประทานได้ มีรสหวาน ถ้ารับประทานมากทำให้ระคายลิ้น นิยมนำไปทำส้มตำรวมกับผลไม้ที่มีรสฝาด เช่น ตะโกนา กล้วยดิบ เพื่อลดการระคาย



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

2.1.4 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 ใช้ทาเครื่องเงินให้เป็นเงา ทากระดาษร่มกันน้ำซึม ใช้เป็นส่วนของสารเคลือบธนบัตร ให้มีความทนทานเป็นเงาและเนื้อกระดาษไม่ติดกัน

(http://www.dnp.go.th/Pattani_botany/
http://picasaweb.google.com/lh/photo/
http://www.wangtakrai.com/panmai/images/panmai/341.jpg

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร

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

2.2.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

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

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

1. พืชสมุนไพรที่จะนำมาสกัด ต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง เพราะพืชหลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันหรือมีชื่อพ้องกัน โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่หายากและขาดแคลน ต้องตรวจสอบอย่างรอบครอบ

2. การเลือกเก็บพืชสมุนไพรที่สมบูรณ์ มีอายุตามชนิดของพืช สามารถออกดอกออกผลที่มีจำนวนมากพอ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มากพอดังนี้

2.1 รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโต หากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย

2.2 เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่

2.3 ใบและดอก เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน

2.4 ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร

2.5 ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือเมื่อสุกเต็มที่ ตามชนิดของพืชสมุนไพร

2.6 เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก

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

4. วิธีการเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสมต่อการนำไปแยกสกัดสาร พืชบางชนิดต้องสกัดสด หรือบางชนิดต้องสกัดแห้ง

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

6. ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าและผลิตภัณฑ์ ต้องระวัง สิ่งปลอมปน การใช้ชื่ออื่นมาอ้าง และชื่อพ้องกัน

7. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วต้องการทำตัวอย่างแห้ง ต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์

2.2.3 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. การเตรียมตัวอย่างแบบสด พืชสมุนไพรสดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง

2. การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง เป็นการป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

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

4. พืชสมุนไพรแห้งควรเก็บในที่แห้ง มืด เย็น และมีอากาศหมุนเวียนและหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน

2.2.4 การทำให้สมุนไพรตัวอย่างมีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชสมุนไพรต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชสมุนไพรที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

การย่อยพืชสมุนไพรให้มีขนาดเล็กลง

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

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

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

นอกจากนี้อาจทำการย่อยเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เอนไซม์ (enzyme disintegration) หรือโดยใช้สารเคมี (chemical disintegration)

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

4. การย่อยสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากจนเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์แตกมากเกินไป ซึ่งบางครั้งทำให้สารสกัดขุ่น ขนาดของผงพืชสมุนไพรที่เหมาะสมหาได้จากการทดลองซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบสำคัญสูงสุด

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

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

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

ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรนั้นมีข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์ การเลือกตัวทำละลาย การเลือกวิธีการสกัด วิธีการสกัด และการทำสารสกัดให้เข้มข้น

2.3.1 สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์

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

1. ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) หรือ ความชอบน้ำ (hydrophilicity)

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

2. pKa

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

3. ความคงตัวต่อความร้อน

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

4. ขนาดโมเลกุล

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

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

5. สเตอริโอเคมี

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

โดยทั่วไปสามารถแบ่งไอโซเมอร์ (isomer) ออกเป็นหลายชนิดดังแผนภาพที่ 1 นอกจากนี้ยังสามารถแบ่ง stereoisomer ออกเป็น 2 ชนิด คือ enantiomer และ diastereomer โดยที่ enantiomer คือ โมเลกุลที่เป็นภาพกระจกเงา (mirror image) ซึ่งกันและกัน เนื่องจาก enantiomer ทั้งสองมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ เหมือนกัน ดังนั้นจึงไม่สามารถแยก enantiomer ออกจากกันด้วยวัฏภาคคงที่ชนิด conventional reversed-phase stationary phase ได้ สำหรับ diastereomer ซึ่งโมเลกุลทั้งสองไม่ได้เป็น ภาพกระจกเงาซึ่งกันและกันนั้น มีคุณสมบัติทาง เคมีและกายภาพแตกต่างกันบ้าง จึงสามารถแยกออกจากกันด้วย conventional stationary phase ได้ นอกจากนี้ยัง สามารถแบ่ง diastereomer ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ optically active isomer และ non-optically active geometric isomer โมเลกุลที่มี optical actiชนิดนี้ไม่มีสมมาตร (symmetry) ภายในโมเลกุล ไม่สามารถซ้อนทับ (superimpose) กับโมเลกุลที่เป็นกระจกเงากันได้ โดยทั่วไปโมเลกุลชนิดนี้จะมีหมู่แทนที่โดยรอบ tetrahedral carbon atom ที่แตกต่างกันทั้ง 4 หมู่ ซึ่ง chiral molecule ของ lactic acid ที่มี central stereogenic center จะไม่มีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุล (internal symmetry plane) (รูปที่ 1) ดังนั้น lactic acid จึงมี chiral enantiomeric form 2 แบบ ในทางตรงกันข้าม propanoic acid ซึ่งมีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุลจัดเป็น achiral molecule ความแตกต่างระหว่าง enantiomer ทั้งสอง คือ มีปฏิกิริยากับ chiral molecule ชนิดอื่นได้แตกต่างกัน และมี 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)

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 คุณสมบัติสารสำคัญมีขั้วก็ควรเลือกตัวทำละลายหรือตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกันในสารสกัด

2. ความคงตัว

ตัวทำละลายมีความคงตัว หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. การระเหย

ตัวทำละลาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4. สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด

สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด เช่นเมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.3.3 วิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 85-89) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. มาเซอเรชัน

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในตัวทำละลายที่เหมาะสม จะทำเป็นเวลานาน 7 วัน หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างที่หมักผง

สมุนไพรอยู่นั้นควรเขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกาก (marc) ออกจากตัวทำละลาย วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายน้อย และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะสมกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย เมื่อสารในสมุนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจนสมบูรณ์

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

2. เพอร์โคเลชัน

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

วิธีเพอร์โคเลชันจัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารจะใช้เพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายตัว และให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าหากัน

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง

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

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลืองแต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และตัวทำละลายที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของตัวทำละลายแตกต่างไปจากเดิม และผลการสกัดที่ไม่ดี

4. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) มีหลายวิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชที่ใช้ ดังนี้

4.1 การกลั่น (distillation) ในทางอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ

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

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

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

4.2 การบีบหรือการอัด

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

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

4.3 วิธีเอ็นฟอยเรนซ์

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

4.4 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย

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

2.3.4 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 ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรซันหรือเพอร์โคเลชัน

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด

หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีง่ายๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. ความต้องการการสกัด

หากต้องการสารสกัดเจือจาง ควรใช้ใช้วิธีมาเซอเรซัน แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

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

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การระเหย

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

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ

การกลั่นในภาวะสุญญากาศ(Distillation in vacuo) เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากตัวทำละลายสกัด โดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ 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

5. สเตอรอยด์

สเตอรอยด์เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมนและยาต้านอักเสบ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยา

6. เทอร์ปีนอยด์

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

7. น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย เป็นของเหลวมีกลิ่นหอมเฉพาะ ระเหยได้ในอุณหภูมิห้อง เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำหรือการบีบใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง และ สมุนไพร และใช้ขับลม ฆ่าเชื้อโรค

8. ยางไม้

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

9. สารอื่นๆ

ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เอ็นไซม์ วิตามิน เรซิน และบาลซัม

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

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

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหล่านี้ไม่จำเพาะเจาะจง และการให้ผลบวกก็เป็นเพียงการบอกถึงประเภทของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบางชนิดเท่านั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสร้างคล้ายกันแต่เป็นสารต่างกลุ่มกันจะให้ผลบวกลวง ในอีกแง่หนึ่งการให้ผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเข้มข้นต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไม่พอต่อการตรวจสอบด้วยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี ดังนี้

2.5.1 การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการเกิดตะกอน

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

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรต

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

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

2. กลุ่มแอลคาลอยด์

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

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

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

1. Steroid nucleus ใช้วิธี Liebermann-Burchard test ให้สีฟ้าหรือเขียว สารทดสอบต้องแห้งและปราศจากน้ำ

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

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

3.2 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์

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

3.3 กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

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

3.4 กลุ่มไซยาโนจินิกส์ไกลโคไซด์

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

การตรวจหาไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ในพืชตัวอย่างควรทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกัน แต่ใช้ภาวะเงื่อนไขที่แตกต่างกัน เช่น หลอดทดลองหนึ่งมีการเติมเอนไซม์อิมัลซิน(emulsion) กับ (linamarase) ลงไป แต่อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องเติม เพื่อให้แน่ใจว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกจริง เนื่องจากพืชบางชนิดถึงแม้จะมีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบจริง แต่อาจขาดเอนไซม์เบตา-กลูโคซิเดสร่วมอยู่ในพืชนั้น จึงเติมเอนไซม์ทั้งคู่ลงในหลอดทดลองหลอดหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบกัน จะช่วยในการตัดสินใจว่าผลการตรวจสอบนั้นเป็นผลบวกจริง

3.5 กลุ่มไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์

การตรวจหาไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์อาจตรวจในสภาพของไกลโคไซด์หรือตรวจหาผลิตภัณฑ์ของไกลโคไซด์จากการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (enzymic hydrolytic products) เช่น ตรวจหาน้ำตาลกลูโคสหรือหมู่ซัลเฟตหรือโมเลกุลของไอโซไทโอไซยาเนต

การตรวจหาในสภาพไกลโคไซด์จัดเป็นวิธีที่นิยมและง่ายต่อการตรวจหา โดยนำพืชที่ต้องการมาต้มในแอลกอฮอล์เดือด เพื่อขจัดฤทธิ์ของเอนไซม์ จากนั้นทำการสกัดพืชด้วยน้ำต้มเดือดหรือเอทานอลหรือเมทานอล หากพืชมีองค์ประกอบเป็นพวกไขมันมากควรกำจัดไขมันออก แล้วทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator) และแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ซึ่งมีอะลูมินา (alumina) เป็นตัวดูดซับหรือมีเรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบได้ (anion exchange resin) เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออน นำไกลโคไซด์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกในสารละลายผสมของแอลกอฮอล์และน้ำ จากนั้นศึกษาเอกลักษณ์ของไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ด้วยเปเปอร์โครมาโทกราฟีหรืองคเลขกระดาษ (paper

chromatography) ในระบบตัวทำละลาย (solvent system) ของบิวทานอล-กรดแอซิติก- น้ำ (butanol-acetic acid-water) จากนั้นฉีดพ่นด้วย 0.2 โมลาร์ของ ซิลเวอร์ไนเทรต (silver nitrate) และอบให้แห้ง ด้วย 0.2 โมลาร์ของโพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) ถ้าหากเป็นไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ จะสังเกตเห็นจุดสีเหลือปรากฏขึ้นบนพื้นสีแดง

3.6 กลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์

ฟลาโวนอยด์แบ่งออกเป็น typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids การตรวจสอบสารในกลุ่มนี้ ทำได้ดังนี้

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

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

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

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

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

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

4. กลุ่มคูมาริน

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

5. กลุ่มแทนนิน

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

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

2. การตรวจสอบด้วย bromine water หากเป็น condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine water

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

4. การตรวจสอบด้วย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น พบว่า condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. กลุ่มเทอร์พีนอยด์

การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์อาศัยหลักการเกิดสีกับน้ำยาทดสอบบางชนิด เช่น น้ำยา 2,6-ได-เทอร์-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) ของสมุนไพรนั้นเนื่องจากไม่มีพืชสมุนไพรใดที่มีองค์ประกอบและปริมาณสารที่เหมือนกันทุกอย่าง ทำให้ได้ลักษณะโครมาโทแกรมเฉพาะตัวของพืชสมุนไพรนั้น

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

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

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	**ตัวดูดซับ (Adsorbent)**	**ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)**	**น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)**
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 หรือ โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene: chloroform) 9:11	เนเซอรัล โปรดักส์ (ไดฟีนิลโบริล ออกซีเอทิลลามีน) -พอลีเอทีลีนไกลคอล) (natural products (dephenylboryloxyethylamine)-polyethylene glycol) แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) –ถ nm เรืองแสงสีเหลือง ส้ม หรือเขียว
คูมารินไกลโคไซด์ (coumarin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน :แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene :acetone: chloroform) 40 : 25:35 หรือ โทลูอีน:คลอโรฟอร์ม (toluene:chloroform) 9:11	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) หรือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) เรืองแสงสีน้ำเงินหรือเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm
อิริดอยด์ไกลโคไซด์ (iridoid glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : แอทิลแอซีเทต (toluene:ethyl acetate) 93:7 หรือ คลอโรฟอร์ม : กรดแอซีติก : น้ำ (chloroform : acetic acid : water) 80:10:5:2:6	กรดเกลือ-กรดแอซีติก (hydrochloric acid: acetic acid) ให้สีน้ำเงินหรือน้ำตาล
แทนนิน (tannin)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เอ็น-บิวทานอล: กรดแอซีติก: น้ำ (n-butanol:acetic acid:water) 4:1:5 หรือ เอ็นบิวทานอล:โทลูอีน: เมทานอล : กรดแอซีติก : น้ำ (n-butanol: acetic acid:water) 80:10:5:2:6 หรือ เบนซีน: ไดออกเซน : กรดแอซีติก 90:25:4	1% เมทานอลิกเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% methanolic ferric chloride) ให้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

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

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547 : 77-79

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

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

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

1. Solid phase extraction (SPE)

Solid phase extraction เป็นการแยกสารโดยให้สารที่สนใจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่สารที่ไม่สนใจหรือไม่ต้องการจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะสาร ที่สนใจให้ออกจากคอลัมน์ในภายหลัง โดยทั่วไปสารที่สนใจจะจับอยู่กับวัฏภาคคงที่ (Stationary phase)ซึ่งเป็นสารดูดซับ (adsorbent) ที่มีรูปร่างเป็นเม็ดเล็ก (bead) หรือเรซิน (rasin) ซึ่งอาจเป็น normal phase, reverse phase หรือ ion-exchange media ก็ได้ และสามารถบรรจุไว้ในคอลัมน์ได้ซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นไซริงค์ (syring) ตัวอย่างเช่น นำสารที่สกัดด้วยน้ำมาแยกด้วย SPE ที่มีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase พบว่าสารที่มีขั้วต่ำจะติดอยู่ในคอลัมน์แต่สารที่มีขั้วสูงจะถูกชะออกมาก่อน

จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่มีขั้นต่ำชะสารที่ติดอยู่ในคอลัมน์ออกมา ซึ่งสารที่ถูกชะออกมานี้ค่อนข้างจะบริสุทธิ์ ในปัจจุบันได้มีการนำ SPEไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีขั้วต่ำ โดยสารที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำจะจับอยู่กับเรซินที่เป็น reverse phase การแยกสารโดยปรับความแรงของ eluting power ให้เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อชะสารออกมาเป็นลำดับตามความมีขั้ว ใช้ศึกษาความเหมือนกันของสารเนื่องจากสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันจะจับกับวัฏภาคคงที่ได้เหมือนกันและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนกันอีกด้วย จึงช่วยในการจัดสินใจว่าสารสกัดหยาบที่แยกด้วย SPEมาแล้วจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่เคยแยกได้หรือไม่ นอกจากนี้ยังใช้ SPE เตรียมสารปริมาณมากให้บริสุทธิ์ขึ้น หรือนิยมใช้แยกสารสกัดหยาบก่อนที่จะแยกต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดอื่น ซึ่งการแยกในขั้นแรกด้วย SPE นี้เรียกว่า clean-up โดยจะแยกสารปนเปื้อนจำนวนมากออกไปจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สนใจ เช่น การใช้ SPEกำจัดสารที่มีขั้วจำนวนมากที่ไม่ต้องการและมีที่มาจาก buffer salt หรือส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ใช้SPE ในการเตรียมสารให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยผ่านสารละลายที่เจือจางลงไปในคอลัมน์ SPE จากนั้นชะสารที่ต้องการซึ่งติดค้างอยู่บนคอลัมน์ให้ออกมาโดยใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อยๆ นิยมใช้ SPE เพื่อเตรียมสารในปริมาณน้อยมาก เช่น เมแทบอไลท์ของยาในตัวอย่างเลือด สารปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในน้ำทะเล และสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ให้บริสุทธิ์มากขึ้น ก่อนนำไปแยกต่อไปด้วยเทคนิคอื่นทางโครมาโทกราฟี

2. Thin layer chromatography (TCL)

Thin layer chromatography 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 ที่ดีจะต้องเป็นค่าที่ไม่ทำให้สารที่สนใจติดค้างอยู่จุดเริ่มต้นหรือเคลื่อนที่ด้ำกลเกินไปจนใกล้หรือติดตัก solvent front เมื่อหาสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เหมาะสมแล้วจึงนำตัวอย่างที่ต้องการแยกในปริมาณสูงขึ้นมาแยกในคอลัมน์ต่อไป อย่างไรก็ตามไม่สามารถนำสภาวะหรือสัดส่วนขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จาก TCL มาใช้กับ CC ได้โดยตรง เนื่องจากคอลัมน์เป็นการเคลื่อนที่แบบสองทิศทางและมีสมดุลเกิดขึ้นในคอลัมน์ แต่ TCL นั้นมีสมดุลระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตลอดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อต้องการนำสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ใน TLC ไปใช้ในการแยกสารด้วย CC จึงแนะนำให้ลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC ลงเล็กน้อย(ในกรณี

ที่วัฏภาคคงที่เป็น normal phase) และเพิ่มความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC มากขึ้นเล็กน้อย (ในกรณีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase) เพื่อให้การแยกสารในคอลัมน์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

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

3. Column chromatography (CC)

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

การแยกสารตัวอย่างในคอลัมน์ออกเป็นแบนด์อาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีซึ่งหมายถึงการกระจาย (distribution) ของสารระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคคงที่ ดังสมการต่อไปนี้

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

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

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

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

โดยทั่วไปแล้ววัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวมักเกิดพันธะเคมีกับตัวรองที่เฉื่อย (inert support) ได้เป็น bonded phase ซึ่งหมายถึงพันธะที่คงตัว เช่น พันธะระหว่าง silanol group (Si-OH) บน silica support กับ chlorosilane ซึ่งสารจำพวก silane มักเป็นสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain)ที่มีคาร์บอนมาเชื่อมต่อกันยาวประมาณ 1,2,6, 8 หรือ 18คาร์บอน ดังนั้น bonded phase chromatography หรือ modified partition chromatography จึงเป็นการแยกสารที่อาศัยหลักการร่วมกันระหว่างการแยกส่วน (partition) และการดูดซับ (adsorption) สำหรับความแตกต่างระหว่าง normal phase กับ reverse phase คือ normal phase มีวัฏภาคคงที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น silica column มี silanol group ที่มีขั้วสูงกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ในขณะที่ reverse phase จะมีวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ เช่น สายไฮโดรคาร์บอนที่สร้างพันธะกับ silica support เป็นเสมือนวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำและมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำที่มีขั้วสูง ซึ่งอาจผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น เมธานอลหรืออะซีโตไนไตร์ (acetonitrite) อย่างไรก็ตาม หากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กำลังแยกอยู่นั้นมีขั้วต่ำและไม่ชอบน้ำ มันจึงอาจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ได้ ดังนั้นจึงแนะนำให้ติดตามการชะสารออกจากคอลัมน์โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่อยู่ในส่วนสกัดต่างๆ ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสารใดติดค้างอยู่ในคอลัมน์

ประจุ (charge) สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดเมื่อมีการปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของสารละลายด้วยกรดหรือด่างอาจจะทำให้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นถูกเปลี่ยนแปลงไปให้อยู่ในรูปของไอออนบวกหรือลบได้ ดังนั้นจึงนำคุณสมบัติการแตกตัวเป็นไอออนนี้มาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ดังต่อไปนี้

3.1 Ion-exchange chromatography

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

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

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

สามารถแยกเมแทบอไลท์ทุติยภูมิในปริมาณมากด้วย affinity chromatography เนื่องจากเทคนิคนี้ทำได้ยากและต้องใช้เวลานานมากในการเตรียมลิแกนด์ที่เหมาะสมให้มีปริมาณเพียงพอต่อการแยกสารแต่ละครั้ง หากสารผสมเมื่อเริ่มต้นนั้นซับซ้อนเช่นในกรณีสารสกัดหยาบจากพืชหรือจุลินทรีย์ที่มักมีสารอื่นเข้ามารบกวนการแยกหรือขัดขวางการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์และลิแกนด์ (receptor –ligand interaction) หรือสารเหล่านี้เข้าไปดูดซับแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับวัฏภาคคงที่ จะทำให้การแยกสารไม่สมบูรณ์ และยิ่งไปกว่านั้นการได้สารกลับคืนมา(recovery) จะขึ้นอยู่กับแรงที่จับกันอย่างผันกลับได้ ซึ่งการรบกวนของสารหลายชนิดอาจขัดขวางการได้สารกลับคืนมาด้วย

4. Gradient high performance liquid chromatography (Gradient HPLC)

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

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2546 : 56-65) กล่าวถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชกรรมและการใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษาสรุปได้ดังนี้

2.7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

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

2.7.2 Bio-assaying

1. หลักในการคัดเลือกวัสดุจากพืชสมุนไพร เช่น การสกัดสารและการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารก่อนจะศึกษาผลทางชีวภาพ การวางแนวทางการดำเนินงานตามเงื่อนงำจากการประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในยาสมุนไพรและความเชื่อตามขนบธรรมเนียม การตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีววิทยา ชีวเคมี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีและกายภาพ

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

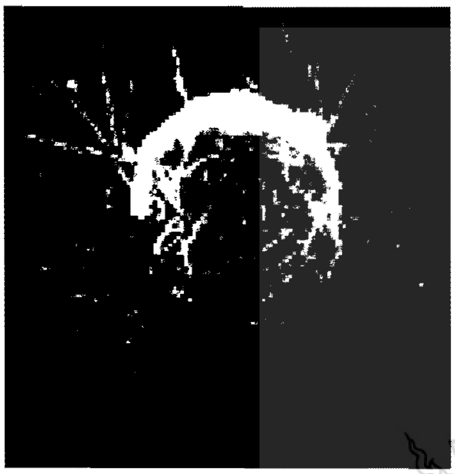
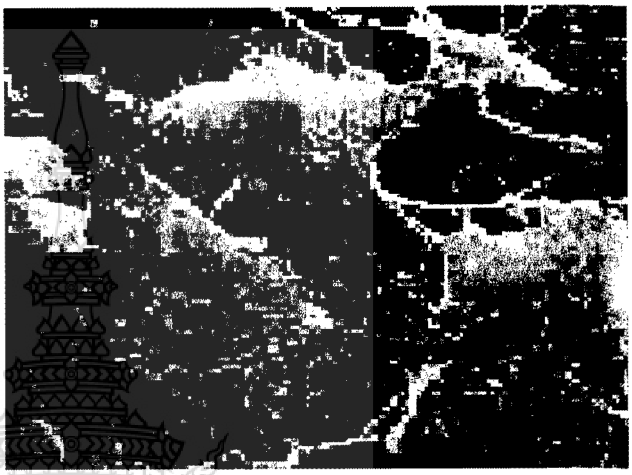
2.7.3 การสำรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนา

การศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความหลากหลายของผลทางชีวภาพและสูตรโครงสร้างของสรออกฤทธิ์และเป้าหมายด้านเภสัชกรรมในการบำบัดรักษาที่ชัดเจน โดยอาศัยการพัฒนาในหลายสาขาวิชา เช่น พันธุกรรม ชีวโมเลกุล วิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิคที่ทันสมัย

2.8 ลักษณะทั่วไปของมะเร็งและวัณโรค

2.8.1 มะเร็ง

2.8.1.1 ที่มาของคำว่ามะเร็ง

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

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

2.8.1.2 คำศัพท์พื้นฐานบางคำ

มีคำศัพท์พื้นฐานบางคำที่จำเป็นควรทราบ ดังนี้

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

- ก้อนเนื้องอกที่ไม่อันตราย (Benign) หมายถึง ก้อนเนื้อที่ไม่มีแนวโน้มที่จะแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ

- ก้อนเนื้อร้าย (Malignant) หมายถึง ก้อนเนื้อ ซึ่งมีความสามารถในการกระจาย หรือแพร่กระจายปยังอวัยวะอื่นๆ

2.8.1.3 ความหมายของมะเร็ง

สำหรับความหมายของ 'มะเร็ง' มีการให้ความหมายดังนี้

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

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

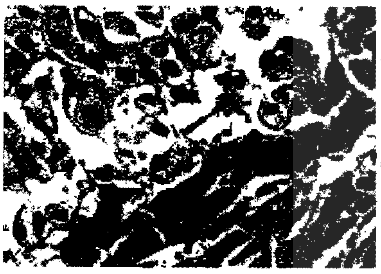
2.8.1.4 ประเภทของมะเร็ง

มะเร็งมีมากมายกว่า 200 ชนิด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

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

1. มะเร็งกลุ่ม Carcinoma

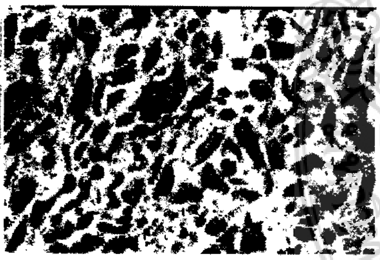
(ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วย จะอยู่ในประเภทนี้) หมายถึง มะเร็งซึ่งมาจากเซลล์เยื่อบุผิวของอวัยวะทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ซึ่งเซลล์เยื่อบุผิวของร่างกายมี 4 ชนิดใหญ่ได้แก่



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

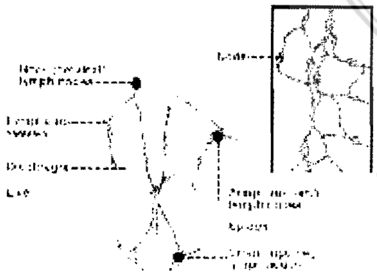
มะเร็งสามารถเกิดขึ้นได้จากเซลล์เยื่อบุอวัยวะชนิดต่างๆ เหล่านี้ ตัวอย่างเช่น มะเร็งเต้านม (Breast Carcinoma) ส่วนใหญ่เกิดจากเซลล์เยื่อบุของต่อมสร้างน้ำนม

2. กลุ่ม Sarcoma



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

3. กลุ่ม Lymphoma

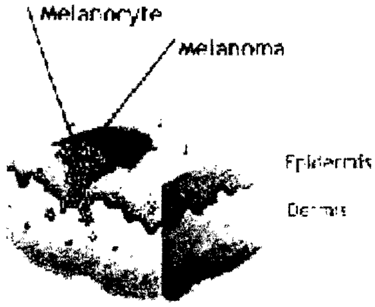


หมายถึง มะเร็งที่พัฒนามาจากต่อมน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อของระบบภูมิต้านทาน

4. กลุ่ม Leukemias

หมายถึง มะเร็งของระบบโลหิต เกิดจากความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่อยู่ในไขกระดูก (Bone Marrow)

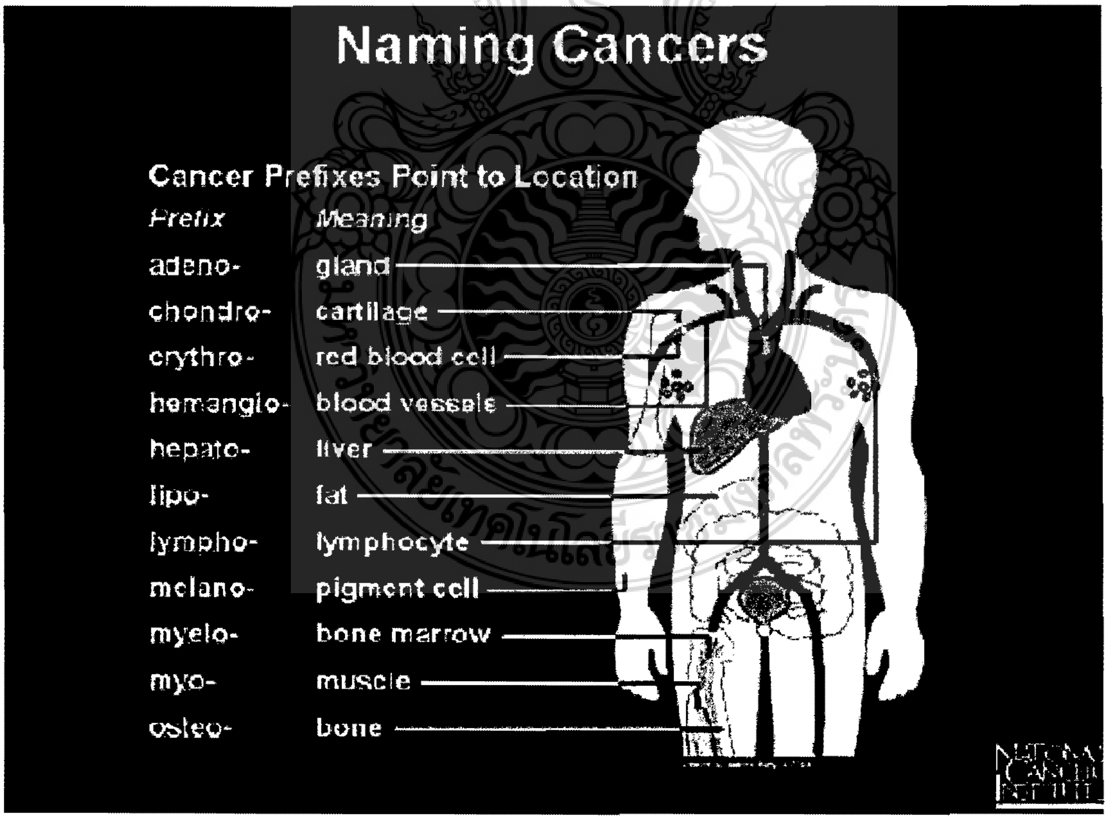
5. กลุ่ม Melanoma



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

2.8.1.5 การตั้งชื่อมะเร็ง

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



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

2.8.1.6 ความรุนแรงของมะเร็ง

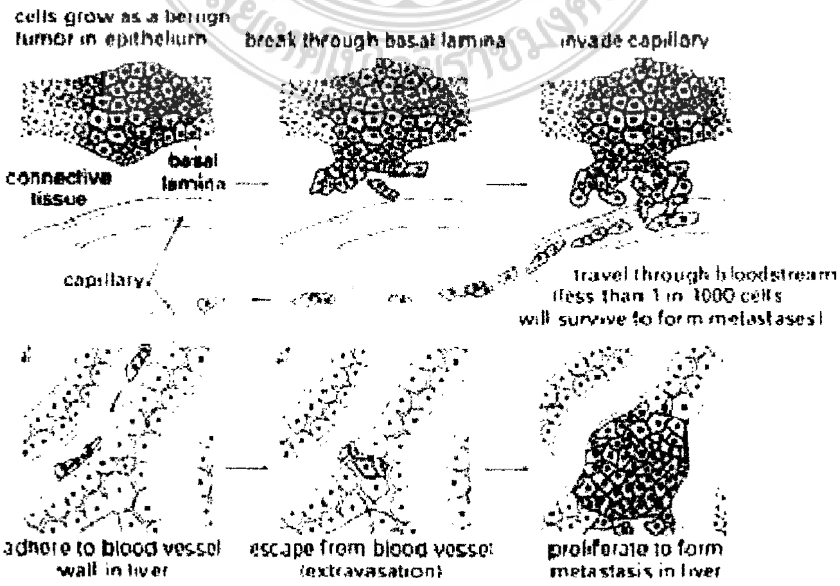
ในทางพยาธิวิทยา จะแบ่งความรุนแรงของมะเร็งออกเป็น 4 ขั้น ตามการจำแนกลักษณะของเซลล์มะเร็ง (Differentiation) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กล่าวคือ ตั้งแต่ขั้นที่มีการจำแนกลักษณะของเซลล์ชัดเจน (Well Differentiation) ซึ่งถือว่ามีความรุนแรงน้อย จนกระทั่งถึงขั้นที่ 4 ที่เซลล์ไม่มีการจำแนกลักษณะเลย (Undifferentiation)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

ในด้านการรักษา มีการแบ่งความรุนแรงของมะเร็งตามระยะของโรค โดยอาศัยการลุกลามของโรคออกไปเป็นระยะๆ ดังนี้

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

2.8.1.7 มะเร็งมีการแพร่กระจายอย่างไร

โดยทางกระแสเลือด เซลล์มะเร็งจะหลุดเข้ากระแสเลือด แล้วไปเจริญเติบโตในอวัยวะต่างๆ เช่น ปอด ตับ กระดูก สมองเป็นต้น
โดยทางกระแสน้ำเหลือง เซลล์มะเร็งหลุดเข้าหลอดน้ำเหลืองแล้วไปเจริญเติบโต ในต่อมน้ำเหลืองบริเวณใกล้เคียง ทำให้ต่อมน้ำเหลืองมีขนาดโตได้มาก ๆ จากต่อมน้ำเหลืองนี้เอง เซลล์มะเร็งอาจจะแพร่กระจาย เข้าสู่หลอดเลือดอีกทอดหนึ่งได้



โดยการฝังตัวของเซลล์มะเร็ง (Implantation) โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากตำแหน่งเดิม ไปเจริญที่ส่วนอื่น อาจจะเป็นการหลุดโดยธรรมชาติ หรือโดยมีการกระตุ้น เช่น จากการผ่าตัด เป็นต้น

โดยการไปจับหรือรวมตัวตามพื้นผิวของผนังเยื่อบุ (Transcoelomic) โดยเซลล์มะเร็งหลุดจากก้อนมะเร็ง ไปงอกตามพื้นผิวของเยื่อบุต่างๆ เหมือนกับต้นกาฝาก ที่แพร่จากกิ่งไม้กิ่งหนึ่งไปยังกิ่งติดๆ กัน เช่น ตามพื้นผิวของเยื่อบุช่องท้อง ช่องปอด เป็นต้น

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

2.8.1.8 การแบ่งตัวของเซลล์

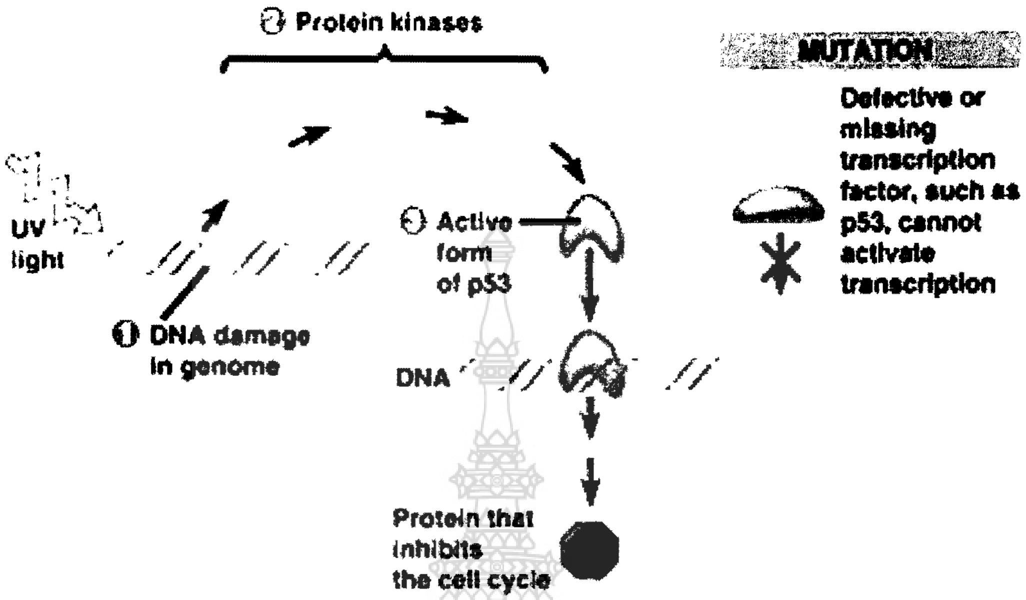
ยีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์

การที่เซลล์มะเร็ง แบ่งเซลล์ไปได้เรื่อยๆ โดยไม่สามารถควบคุมได้ แสดงว่า กลไกการควบคุมการแบ่งเซลล์มีความผิดปกติ โดยปกติยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- ยีนที่ทำงานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์
- ยีนที่ทำงานโดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์

1. ยีนที่ทำงานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์

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



(b) P53 Cell cycle-inhibiting pathway

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

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

2. ยีนที่ทำงานโดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์

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

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

2.8.1.9 มะเร็งเกิดขึ้นได้อย่างไร

อาจจะสรุปได้ว่า มีเหตุส่งเสริมที่สำคัญ 2 อย่างร่วมกัน อันจะทำให้เซลล์นั้นๆ ทำงานผิดปกติไป คือ
- เหตุส่งเสริม หรือเหตุที่ขึ้นอยู่กับภาวะภายในร่างกาย
- เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายนอกร่างกาย

เหตุส่งเสริมหรือที่ขึ้นอยู่กับภาวะภายในร่างกาย

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

2. เชื้อชาติ มะเร็งบางชนิด จะพบมากในเฉพาะบางเชื้อชาติ เช่น มะเร็งโพรงหลังจมูก พบมากในชาวจีน เป็นต้น

3. เพศ มะเร็งบางชนิดพบมากในเพศชาย เช่น มะเร็งปอด มะเร็งตับ แต่มะเร็งบางชนิดพบมากในเพศหญิง เช่น มะเร็งเต้านม

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

5. กรรมพันธุ์ (Genetics)

6. ความผิดปกติต่างๆ เช่น ในกรณีที่เป็นไฝ หรือปานดำ มีโอกาสจะกลายเป็นมะเร็งผิวหนังเมลาโนบาชนิดร้าย (Malignant Melanoma)

เหตุส่งเสริมที่อยู่ภายนอกร่างกาย

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

ในหญิงสูงอายุ ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกได้ง่าย รังสีต่างๆ เป็นต้น

2. สารเคมี (Chemical Agents)

3. ฮอร์โมน (Hormone)

4. เชื้อไวรัส มีไวรัสหลายชนิด เป็นสาเหตุทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ ไวรัสเหล่านี้เรียกว่า "ไวรัสที่ทำให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็ง" (Oncogenic Viruses, Tumour Viruses) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของกรดนิวคลีอิก คือ ไวรัสดีเอ็นเอ และไวรัสอาร์เอ็นเอ เมื่อไวรัสเข้าไปในเซลล์แล้ว ก็จะมีการเพิ่มจำนวน (Productive Infection) หรืออาจจะไม่เพิ่มจำนวนก็ได้ แต่จะสามารถทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงในรูปร่างไปได้ (Transformation) จากการที่ยีนหรือ DNAของไวรัส (Viralgnome หรือ Viral DNA) ไปแทนที่ DNA ของเซลล์

สำหรับในคน ไวรัสอาจจะเป็นสาเหตุ หรือเกี่ยวข้องกับมะเร็งบางชนิด เช่น Epstein-Barr Virus มีความสัมพันธ์กับมะเร็งโพรงหลังจมูก และมะเร็งของต่อม น้ำเหลืองเบอร์คิตต์ (Burkitt's Lymphoma) หรือ Herpes Simplex Virus ชนิดที่ 2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมะเร็งปากมดลูก มะเร็งเม็ดเลือดขาวบางชนิด เป็นต้น

5. สารพิษ (Toxin)

6. พยาธิบางชนิด เช่น พยาธิใบไม้ในตับ

7. ภาวะขาดอาหาร

2.8.1.10 กลไกการเกิดมะเร็ง

การเกิดโรคมะเร็งเป็นขบวนการหลายขั้นตอน มีกลไกที่สลับซับซ้อน ที่ทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตจากเซลล์มะเร็งเพียงเซลล์เดียว กลายเป็นก้อนมะเร็งขึ้นมา ต่อมา จะมีการลุกลามเฉพาะที่ และเกิดการแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นในที่สุด

ปัจจุบัน พอจะสรุปขบวนการของการเกิดมะเร็งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ

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

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

2.8.2 วัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรัง ทำให้มีการอักเสบในปอด ซึ่งในผู้ใหญ่มักจะพบส่วนใหญ่เป็นที่ปอด ในเด็กอาจเป็นที่อวัยวะอื่นร่วมด้วย เช่น ต่อมน้ำเหลือง เยื่อหุ้มสมอง กระดูก

2.8.2.1 สาเหตุ

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

2.8.2.2 ประเภทของวัณโรค

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

2.8.2.3 ระบาดวิทยา

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

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

2.8.2.4ระยะฟักตัว

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

2.8.2.5อาการและอาการแสดง

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

2.8.2.6วัณโรคปอด

เด็กเกือบทั้งหมดที่เป็นวัณโรคจะเริ่มต้นเป็นจุดที่ปอดก่อน เด็กจะมีไข้ต่ำๆ เบื่ออาหาร น้ำหนักตัวลดลง บางคนมีอาการไอเรื้อรัง บางคนมีไอซ้อนๆ กันคล้ายไอกรน เด็กโตบางคนอาจบ่นเจ็บหน้าอก และเหนื่อยหอบ ถ้าเป็นมากจะมีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด

(Alkaloid) ไกลโคไซด์ (Glycoside) แทนนิน (Tannins) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) สเตอรอยด์ (Steroid) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) ยางไม้ (Gums) และอื่นๆ

1. แอลคาลอยด์

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

2. ไกลโคไซด์

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

3. แทนนิน

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

4. ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารมีสีเช่นสารสีแดง (carthamim) จากดอกคำฝอย สารสีเหลือง (luleolin) จากดอกสายน้ำผึ้ง

2.8.2.7วัณโรคเยื่อหุ้มสมอง

ในเด็กโตจะเริ่มด้วยอาการเป็นไข้ 1-2 สัปดาห์ ปวดศีรษะ อาเจียน คอแข็ง ซึมมากจนถึงไม่รู้สึกตัว บางรายอาจมีอาการชัก มีอัตราตายสูงและมีความพิการเหลืออยู่ถ้าได้รับการรักษาช้า

2.8.2.8วัณโรคของต่อมน้ำเหลือง

จะมีต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ รักแร้ ขาหนีบโต และบางรายจะโตมากจนมีแผลแตกออกมา มีหนองข้นไหลออกมา เป็นแผลเรื้อรัง อาจจะลุกลามมีต่อมน้ำเหลืองโตติดๆ กันหลายเม็ดถ้าไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคโดยเนิ่นๆ แผลจะไม่หาย

2.8.2.9การวินิจฉัยโรค

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

2.8.2.10การรักษา

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

2.8.2.11การแยกผู้ป่วย

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

2.8.2.12 การป้องกัน

1. หลีกเลี่ยงการสัมผัสกับผู้ป่วยที่กำลังมีอาการไอ และยังไม่ได้รับการรักษา

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

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

2.8.2.13 การค้นหาผู้ป่วย

การค้นหาผู้ป่วย เนื่องจากเด็กมักจะได้รับเชื้อมาจากผู้ใหญ่ที่สัมผัสดังนั้น เมื่อพบผู้ป่วยวัณโรคจึงต้องสอบสวนค้นหาโรคในผู้ใกล้ชิดให้พบ และให้การรักษาเพื่อป้องกันการแพร่เชื้อไปยังผู้อื่น

2.8.2.14 การรักษา

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

ยาวัณโรคในปัจจุบันหลักๆจะมีอยู่ 4 ชนิดคือ

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

ยาที่กล่าวมาในข้างต้นนี้มีผลข้างเคียงของยาทุกตัว จึงต้องอยู่ในการควบคุมดูแลของแพทย์ ถ้าซื้อหรือหามารับประทานเองอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต

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

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

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 พบว่าเมล็ดมะเกี๋ยงมีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 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) ศึกษาการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแกว๋นป่า โดยใช้วิธี DPPH และ เทคนิคโครมาโทกราฟฟี่ผิวบาง (TLC) พบว่าสารสกัดเมทานอลของผลมะแกว๋นป่ามีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายชนิด การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ใช้คอลัมน์ซิลิกาเจลและคอลัมน์ของเรซิน Diaion

HP-20 ตามลำดับ พบว่าสาารถแยกสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยการใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ใน อัตราส่วน 70 : 30 และสารต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้เป็นสารประกอบพวก Condensed tannin

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

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

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

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

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

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

3.1.2 สารเคมี

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

3.2 เห็ด พืชสมุนไพร และจุลชีพ

3.2.1 เห็ด

1. เห็ดดิน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Russula eburneureolata* Hongo.

ชื่อวงศ์ : RUSSULACEAE

3.2.2 สมุนไพร

1. ตะบัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Xylocarpus gangeticus* Parkins.

ชื่อวงศ์ : MELIACEAE

2. กัดลิ้น

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Walsura trichostemon* Miq.

ชื่อวงศ์ : MELIACEAE

3. มะพอก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Parinari anamense* Hance

ชื่อวงศ์ : CHRYSOBALANACEAE

3.2.3 เชื้อวัณโรค

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

3.2.4 เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

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

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างเห็ดและพืชสมุนไพร

1. ทำการสำรวจอนุกรมวิธานของเห็ดและพืชสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ เห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และ ใบมะพอก และรับรองพืชสมุนไพรตัวอย่าง โดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์(Voucher Specimens)

2. นำเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และใบมะพอก มาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C

3. นำเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และใบมะพอกที่แห้งแล้ว ไปบด ให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender) และนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และใบมะพอก ใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูงคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ ดังนี้

1. นำเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และใบมะพอกที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 0.5 Kg แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือเฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

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

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

ดังนั้นการสกัดเห็ดและพืชสมุนไพร 6 ชนิดคือเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และ ใบมะพอกโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบรวมทั้งสิ้น 18 ชนิด ดังนี้

1. สารสกัดหยาบจากเห็ดดินชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล
2. สารสกัดหยาบจากเปลือกตะบันชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล
3. สารสกัดหยาบจากรากกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล
4. สารสกัดหยาบจากใบกัดลิ้นชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล
5. สารสกัดหยาบจากรากมะพอกชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล
6. สารสกัดหยาบจากใบมะพอกชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

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

ถ้าสามามารถต้านมะเร็งได้น้อยกว่าร้อยละ 50 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ถ้าสามามารถต้านมะเร็งได้มากกว่าร้อยละ 50 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และจะรายงานผลเป็นค่า IC_{50} (μg/ml)

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

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

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าร้อยละ 90 แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ถ้าสามามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 90 แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และจะรายงานผลเป็นค่า MIC (μg/ml)

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2551 – 30 กันยายน 2552

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

1. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร
2. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร คือ เห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และใบมะพอก โดยใช้วิธีการหมักแบบ Maceration และเทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอลได้สารสกัดหยาบ 18 ชนิ ดทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดหยาบ ผลการทดลองเป็นดังนี้

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 6 ชนิด ที่ได้จากการสกัดเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.1-4.3

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเฮกเซน

สารสกัดชั้นเฮกเซน	IC_{50} (μg/ml)
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	1.11
ใบกัดลิ้น	40.14
รากมะพอก	29.50
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.1 มีสารสกัดชั้นเฮกเซน 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปากคือรากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และรากมะพอกโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.11, 40.14 และ 29.50 μg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเอทิลแอซิเตต

สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต	IC_{50} (μg/ml)
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	2.07
ใบกัดลิ้น	10.42
รากมะพอก	16.05
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.2 มีสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปากคือ รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และรากมะพอกโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.07, 10.42 และ 16.05 μg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก ของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเมทานอล

สารสกัดชั้นเมทานอล	**IC_{50} (µg/ml)**
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	22.90
ใบกัดลิ้น	23.52
รากมะพอก	-
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.3 มีสารสกัดชั้นเมทานอล 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปากคือรากกัดลิ้น ใบกัดลิ้นและเปลือกตะบัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.90, 23.52 และ 27.77 µg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน รากมะพอกและใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก

4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 6 ชนิด ที่ได้จากการสกัดเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (human small cell lung cancer : NCI-H187) ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.4-4.6

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเฮกเซน

สารสกัดชั้นเฮกเซน	IC_{50} **(µg/ml)**
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	1.56
ใบกัดลิ้น	23.26
รากมะพอก	48.90
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.4 มีสารสกัดชั้นเฮกเซน 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดคือรากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และรากมะพอก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.56, 23.26 และ 48.90 µg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยเอทิลแอซิเตต

สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต	IC_{50} **(μg/ml)**
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	3.30
ใบกัดลิ้น	17.02
รากมะพอก	39.83
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.5 มีสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดคือรากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และรากมะพอก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.30, 17.02 และ 39.83 μg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยเมทานอล

สารสกัดชั้นเมทานอล	IC_{50} (μg/ml)
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	39.29
ใบกัดลิ้น	25.76
รากมะพอก	-
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.6 มีสารสกัดชั้นเมทานอล 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดคือใบกัดลิ้น และรากกัดลิ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25.76 และ 39.29 μg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากมะพอก และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด

4.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 6 ชนิด ที่ได้จากการสกัดเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม (breast cancer : MCF-7)ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.7-4.9

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยเฮกเซน

สารสกัดชั้นเฮกเซน	IC_{50} **(µg/ml)**
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	0.84
ใบกัดลิ้น	26.07
รากมะพอก	-
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.7 มีสารสกัดชั้นเฮกเซน 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมคือรากกัดลิ้นและใบกัดลิ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.84 และ 26.07 µg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากมะพอก และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยเอทิลแอซิเตต

สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต	IC_{50} (µg/ml)
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	26.87
ใบกัดลิ้น	36.37
รากมะพอก	-
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.8 มีสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมคือรากกัดลิ้น และ ใบกัดลิ้นโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.87 และ 36.37 µg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากมะพอก และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยเมทานอล

สารสกัดชั้นเมทานอล	**IC_{50} (μg/ml)**
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	20.91
ใบกัดลิ้น	26.08
รากมะพอก	-
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.9 มีสารสกัดชั้นเมทานอล 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมคือรากกัดลิ้นและใบกัดลิ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.91 และ 26.08 μg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากมะพอก และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ทำการทดสอบโดยนำสารสกัดหยาบจำนวน 6 ชนิด ที่ได้จากการสกัดเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Anti-Mycobacterium tuberculosis. anti-TB) ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4.10 - 12

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยเฮกเซน

สารสกัดชั้นเฮกเซน	MIC (μg/ml)
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	-
ใบกัดลิ้น	-
รากมะพอก	-
ใบมะพอก	50.00

จากตารางที่ 4.10 มีสารสกัดชั้นเฮกเซนชนิดเดียวที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคคือใบมะพอก โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50.00 μg/ml ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และ รากมะพอก และ ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพรด้วยเอทิลแอซิเตต

สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต	MIC (µg/ml)
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	-
ใบกัดลิ้น	50.00
รากมะพอก	-
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.11 มีสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตตชนิดเดียวที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคคือใบกัดลิ้น โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50.00 µg/ml ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น รากมะพอก และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร ด้วยเมทานอล

สารสกัดชั้นเมทานอล	MIC (µg/ml)
เห็ดดิน	-
เปลือกตะบัน	-
รากกัดลิ้น	-
ใบกัดลิ้น	-
รากมะพอก	-
ใบมะพอก	-

จากตารางที่ 4.12 ไม่มีสารสกัดชั้นเมทานอล ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

5.1.1.1 ฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก

1. สารสกัดชั้นเฮกเซน 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปากคือรากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และรากมะพอกโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.11, 40.14 และ 29.50 μg/ml ตามลำดับ

2. สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต 3 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปากคือ รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และรากมะพอกโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.07, 10.42 และ 16.05 μg/ml ตามลำดับ

3. สารสกัดชั้นเมทานอล 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปากคือรากกัดลิ้น ใบกัดลิ้นและเปลือกตะบัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.90, 23.52 และ 27.77 μg/ml ตามลำดับ

5.1.1.2 ฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด

1. สารสกัดชั้นเฮกเซน 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดคือรากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และรากมะพอก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.56, 23.26 และ 48.90 μg/ml ตามลำดับ

2. สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดคือรากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น และรากมะพอก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.30, 17.02 และ 39.83 μg/ml ตามลำดับ

3. สารสกัดชั้นเมทานอล 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดคือใบกัดลิ้น และรากกัดลิ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25.76 และ 39.29 μg/ml ตามลำดับ

5.1.1.3 ฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

1. สารสกัดชั้นเฮกเซน 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมคือรากกัดลิ้นและ ใบกัดลิ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.84 และ 26.07 μg/ml ตามลำดับ ส่วนเห็ดดิน เปลือกตะบัน รากมะพอก และใบมะพอก ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

2. สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมคือรากกัดลิ้นและ ใบกัดลิ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.87 และ 36.37 μg/ml ตามลำดับ

3. สารสกัดชั้นเมทานอล 2 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมคือรากกัดลิ้นและ ใบกัดลิ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.91 และ 26.08 μg/ml ตามลำดับ

5.1.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

1. สารสกัดชั้นเฮกเซนมีชนิดเดียวที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคคือใบมะพอก โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50.00 μg/ml

2. สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตตชนิดเดียวที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคคือใบกัดลิ้น โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50.00 μg/ml

3. สารสกัดชั้นเมทานอลไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

5.2 อภิปรายผล

การสกัดสารจากเห็ดและพืชสมุนไพร คือ เห็ดดิน เปลือกตะบัน รากกัดลิ้น ใบกัดลิ้น รากมะพอก และใบมะพอก ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอลได้สารสกัดหยาบ 18 ชนิด และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค จากผลการศึกษามีประเด็นที่เป็นข้อสังเกตดังนี้

1. สารสกัดจากเห็ดดินและเปลือกตะบัน ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

2. สารสกัดจากรากกัดลิ้นและใบกัดลิ้นของตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในช่องปาก มะเร็งปอดและมะเร็งเต้านม

3. สารสกัดจากชั้นเฮกเซนของใบมะพอก และสารสกัดจากชั้นเอทิลแอซิเตตของใบกัดลิ้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดจากเห็ดและพืชสมุนไพรในครั้งนี้เป็นการนำบางส่วนของพืชสมุนไพรมาทำการศึกษา ทำให้ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพเฉพาะส่วนดังกล่าว ดังนั้นในการวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาส่วน ต่างๆ ได้แก่ ราก เมล็ด ใบ ดอก และผล ของพืชสมุนไพรให้ครบทุกส่วน เพื่อจะได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพ(ฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และอื่นๆ) ที่ครอบคลุม ซึ่งจะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกสารสกัดจากพืชสมุนไพรไปทำให้บริสุทธิ์และพัฒนาต่อยอดการวิจัยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

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. เชฎฐ รัตนาจารย์. 2548. **ผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

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

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

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

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

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

12. ปัทมาวดี 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. **การพัฒนาและประเมินผลทางคลินิกของเวชภัณฑ์จากวุ้นว่านหางจรเข้ ส่วนสกัดจากใบบัวบก ใบฝรั่ง และใบข่อยเพื่อใช้รักษาโรคในช่องปาก.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุดมวิชช์ พลเยี่ยม

(ภาษาอังกฤษ) Asst.Prof .Udomwish Polyium

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-4507-00329-499

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ตำแหน่งทางบริหาร รองผู้อำนวยการ สถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

สาขาวิชาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

เลขที่ 1381 ถนนพิบูลสงคราม เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800โทรศัพท์

0-2913-2424 ต่อ 122 โทรสาร 0-2587-0472 , 0-2585-9175

e-mail address : udomwish@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ระดับ	คุณวุฒิ	วิชาเอก	พ.ศ.	สถาบัน
ปริญญาตรี	ค.บ.	เคมี (เกียรตินิยม)	2539	สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
ปริญญาโท	วท.ม.	เคมี	2544	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

เคมีอินทรีย์ และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

7. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

ชื่อผลงานวิจัย	สถานภาพ	พ.ศ.
1. การศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์กระดาษจากฟางข้าว	ผู้ร่วมวิจัย	2544
2. ภาวะผู้นำของผู้บริหาร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตโชติเวช	ผู้ร่วมวิจัย	2545
3. ความต้องการศึกษาต่อและคุณลักษณะของผู้สำเร็จการศึกษา สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตโชติเวช	ผู้ร่วมวิจัย	2546
4. รูปแบบการเรียนของนักศึกษา สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตโชติเวช	ผู้ร่วมวิจัย	2547
5. ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการสำเร็จการศึกษาตามกำหนดเวลาและหลังกำหนดเวลาของนักศึกษาหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล พระนคร	ผู้ร่วมวิจัย	2550
6. รูปแบบการเรียนที่ส่งผลต่อผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร	ผู้ร่วมวิจัย	2550
7. การสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพร	หัวหน้าโครงการวิจัย	2551
8. ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนวิชาเคมีของนักศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร	หัวหน้าโครงการวิจัย	2551
9. การศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตกลุ่มสาขาวิชาเคมีประยุกต์ของสถาบันอุดมศึกษาในประเทศไทย	หัวหน้าโครงการวิจัย	2551
10. การพัฒนาบทเรียนคอมพิวเตอร์ช่วยสอนวิชาเคมีชีวอินทรีย์	หัวหน้าโครงการวิจัย	2551