

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีของเปลือกชুমเห็ดเทศ

The Chemical Constituents of the Barks of
Cassia alata Linn.

ผู้วิจัย **ดร. พัทธนิ เจริญยิ่ง**

ประจำปีงบประมาณ 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนครั้งนี้ ขอขอบคุณ
 ผศ.ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ ที่ปรึกษาโครงการ และทีมงานวิจัยคุณภุชงค์ เรืองธรรม
 คุณบัญญัติ พล ขจรชรรคเพชร คุณอัญมณี คำมุข คุณจันทกา ชูโชติรส คุณจินตนา กุบกระโทก
 และคุณชมพูนุท อย่างละมัย ที่ได้ช่วยร่วมมือในการทำวิจัยด้วยความตั้งใจ จนงานวิจัยสำเร็จลงได้
 ขอขอบคุณ คุณรัชดา จันทรพิชญ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ช่วยทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
 ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอม
 เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยเหลือด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย



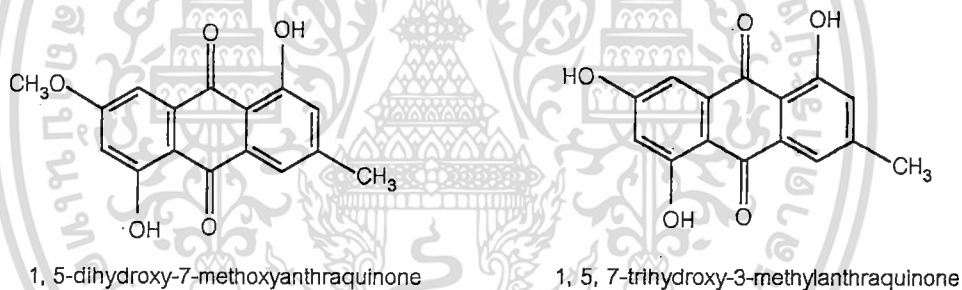
RCH
 OK
 495
 L58
 เลขหมู่.....พ516๖
 เลขทะเบียน.....54535
 วัน,เดือน,ปี 21 ส.ค. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b..... ๒๑๑๕๑๕๓
 i.....

Abstract

This research was to investigate the chemical constituent and biological activities of the crude extracts from *Cassia alata* barks. The crude extracts was primarily test on antioxidant and anticancer. The antioxidant activity in vitro was measured by means of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay. The results found that the crude chloroform extract had moderately activity. In addition, the crude chloroform extract also showed moderated cytotoxicity against human cancer cell lines. Moreover, the pure compounds were purified by chromatography techniques. The structures of two pure compounds were determined by spectroscopy techniques that they are in anthraquinone group.



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญกราฟ	ฎ
สารบัญภาคผนวก	ฏ
อักษรย่อ	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 พื้นฐานการพัฒนายาจากสมุนไพร	4
2.1.1 สมุนไพรดิบ	4
2.1.2 สารสกัดดิบ	4
2.1.3 สารบริสุทธิ์	4
2.1.4 ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป	4
2.2 ส่วนของพืชที่ใช้ทำยา	4
2.2.1 ราก	5
2.2.2 เหง้า	5
2.2.3 รากหัว	5
2.2.4 หัว	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.5 ใบ	5
2.2.6 ดอก	6
2.2.7 ผล	6
2.2.8 เมล็ด	6
2.2.9 เปลือกไม้	6
2.2.10 เนื้อไม้	6
2.2.11 พืชล้มลุกทั้งต้น	6
2.3 สารสำคัญที่พบในพืชสมุนไพร	6
2.3.1 สารปฐมภูมิ	7
2.3.2 สารทุติยภูมิ	7
2.4 วิธีการสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สำคัญจากพืชสมุนไพร	11
2.4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช	11
2.4.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างพืช	12
2.4.3 การสกัดสารที่สำคัญของพืช	12
2.5 การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด	13
2.6 การทำสารสกัดให้เข้มข้น	14
2.7 การแยกส่วนผสม	14
2.7.1 วิธีทางเคมี	14
2.7.2 วิธีทางกายภาพ	15
2.8 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช	15
2.8.1 การศึกษาโดยอาศัยการตรวจสอบทางเภสัชวิทยา	15
2.8.2 การศึกษาโดยอาศัยการตรวจสอบสารเคมี	15
2.9 การทำให้สารบริสุทธิ์	16
2.9.1 คอลัมน์โครมาโตกราฟี	16
2.9.2 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี TLC	17
2.10 ชุมเห็ดเทศ	18
2.10.1 ลักษณะ	19
2.10.2 สารประกอบที่สำคัญ	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.10.3 ลักษณะทางภูมิศาสตร์	19
2.10.4 พฤษเคมี	19
2.10.5 เภสัชวิทยา	19
2.10.5.1 ฤทธิ์ด้านเชื้อรา	19
2.10.5.2 ฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย	20
2.10.5.3 ฤทธิ์เป็นยาระบาย	20
2.11 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	20
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	23
3.1 ขั้นตอนการวิจัย	23
3.2 วิธีการทดลอง	23
3.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) ในแต่ละชั้นตัวทำละลาย	24
3.2.2 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี	24
3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC Screening for Radical Scavengers	25
3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Radical scavenging assay	26
3.2.5 การแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
4.1 ผลการสกัดตัวอย่างพืชด้วยวิธีแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	27
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด โดยวิธี การฟอกจางสีสารละลาย DPPH และวิธี DPPH radical scavenging assay	27
4.3 ผลการแยกสารสกัดหยาบจากชั้นคลอโรฟอร์มโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด	31
4.3.1 ผลการแยกสารสกัดจากสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม	32
4.3.2 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2	33
4.3.3 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/2	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.4 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/3	36
4.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2	37
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	39
4.5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB และ BC	39
4.5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB และ BCของส่วนย่อย	
ในชั้นสารสกัดคลอโรฟอร์ม	39
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	41
5.1 สรุปผลการวิจัย	41
5.2 ข้อเสนอแนะ	42
ภาคผนวก	43



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างของ BHT	7
รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของแอลคาลอยด์	7
รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ Non-Phenolic Aromatics	8
รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้าง Simple Phenols	9
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ Phenol Ethers	9
รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของ Phenylpropanoids	10
รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของ Quinones	10
รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างของ Flavonoids	11
รูปที่ 2.8 ชุมเห็ดเทศ	18
รูปที่ 2.9 สูตรโครงสร้างของ emodin และ rhein	19
รูปที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของแอนทราควิโนนที่มีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซี และเมททอกซีที่แตกต่างกัน	21
รูปที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของ kaempferol	22
รูปที่ 3.1 ลักษณะของแผ่น TLC ก่อนและหลังพ่นด้วย DPPH	25
รูปที่ 4.1.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน	28
รูปที่ 4.1.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของ สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน	28
รูปที่ 4.2.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม	29
รูปที่ 4.2.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม	29
รูปที่ 4.3.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล	30
รูปที่ 4.3.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล	30
รูปที่ 4.4.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/2/1	35
รูปที่ 4.4.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH	

สารบัญญรูป (ต่อ)

	หน้า
ของสาร ส่วนย่อย 2/2/1 ^{ชั้น} เฮกเซน	35
รูปที่ 4.5.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/3/2	36
รูปที่ 4.5.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/3/2	37
รูปที่ 4.6.1 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1	37
รูปที่ 4.6.2 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/3/2	38



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า	
ตาราง 4.1	แสดงค่าน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย	27
ตาราง 4.2	แสดงค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ชั้นตัวทำละลายต่างๆ	31
ตาราง 4.3.1	ผลการแยกสารสกัดหยาบจากชั้นคลอโรฟอร์มและค่าประสิทธิภาพ การต้านอนุมูลอิสระ	33
ตาราง 4.3.2	ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2 และค่าประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระ	34
ตาราง 4.3.3	ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/2	35
ตาราง 4.3.4	ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/3	37
ตาราง 4.4.1	แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 2/2/1 ด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$	38
ตาราง 4.4.2	แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 2/3/2 ด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$	39
ตาราง 4.4.3	ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง KB และ BC	39
ตาราง 4.4.4	ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง KB และ BC ของส่วนย่อยในชั้นคลอโรฟอร์ม	40

สารบัญภาคผนวก

		หน้า
ภาคผนวกที่ 1	วิธีการพล็อตกราฟเพื่อหาค่า ED ₅₀	45
ภาคผนวกที่ 2	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ตัวทำละลายชั้นต่าง ๆ	45
กราฟผนวกที่ 2-1	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ชั้นตัวทำละลายเฮกเซน	45
กราฟผนวกที่ 2-2	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ชั้นตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม	46
กราฟผนวกที่ 2-3	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ชั้นตัวทำละลายเมทานอล	46
ภาคผนวกที่ 3	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของ BHT	47
ภาคผนวกที่ 4	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัด 7 ส่วนย่อย จากสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม	48
กราฟผนวกที่ 4-1	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 1	48
กราฟผนวกที่ 4-2	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2	48
กราฟผนวกที่ 4-3	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 3	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก (ต่อ)

		หน้า
กราฟผนวกที่ 4-4	กราฟแสดงประสิทธิภาพการดำเนินงาน อนุมัติอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 4	49
กราฟผนวกที่ 4-5	กราฟแสดงประสิทธิภาพการดำเนินงาน อนุมัติอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 5	50
กราฟผนวกที่ 4-6	กราฟแสดงประสิทธิภาพการดำเนินงาน อนุมัติอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 6	50
กราฟผนวกที่ 4-7	กราฟแสดงประสิทธิภาพการดำเนินงาน อนุมัติอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 7	51
ภาคผนวกที่ 5	กราฟแสดงประสิทธิภาพการดำเนินงาน อนุมัติอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2	51
กราฟผนวกที่ 5-1	กราฟแสดงประสิทธิภาพการดำเนินงาน อนุมัติอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/1	51
กราฟผนวกที่ 5-2	กราฟแสดงประสิทธิภาพการดำเนินงาน อนุมัติอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/2	52
กราฟผนวกที่ 5-3	กราฟแสดงประสิทธิภาพการดำเนินงาน อนุมัติอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/3	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญกราฟ

	หน้า
กราฟ 4.3.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัด 7 ส่วนย่อย	32
กราฟ 4.3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของ สารสกัด 3 ส่วนย่อย	33



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อ

ชื่อย่อ	ความหมาย
BHT	Butylated hydroxytoluene
ED ₅₀	Effective Dose 50
TLC	Thin Layer Chromatography
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
KB	Oral human epidermoid carcinoma
BC	Breast cancer



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

มนุษย์ได้รู้จักการนำเอาพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่สมัยโบราณกาลแล้ว โดยเป็นส่วนหนึ่งของปัจจัยสี่ในรูปแบบของอาหาร ยารักษาโรค น้ำหอม และเครื่องสำอาง ซึ่งความต้องการพืชสมุนไพรได้พัฒนาควบคู่ไปกับความเจริญรุ่งเรืองทางด้านวัฒนธรรม ความเป็นอยู่ สังคม และเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการเลือกใช้สมุนไพรในการรักษาโรคของบรรพบุรุษนั้นถือได้ว่าเป็นศาสตร์อันล้ำลึกและเป็นมรดกทางวัฒนธรรมที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง สำหรับประเทศไทยได้มีการใช้สมุนไพรกันมานานแล้ว จะเห็นได้จากการใช้ยาสมุนไพรของไทยมีการใช้กันอย่างกว้างขวางในทุกครัวเรือนตั้งแต่ก่อนที่ระบบการแพทย์แผนปัจจุบันจะเข้ามาแพร่หลายในประเทศไทยดังเช่นทุกวันนี้ก็ยังมีการใช้ยาสมุนไพรไทยกันอยู่

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาทางด้านสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติกันมากยิ่งขึ้นเพราะเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคต่าง ๆ ที่การแพทย์แผนปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาได้ซึ่งอาจจะใช้การรักษาควบคู่กันไปเพื่อให้ประสิทธิภาพในการรักษาดีขึ้น นอกจากนั้นพืชสมุนไพรได้เข้ามามีส่วนร่วมทางอ้อมเพื่อการนำมาใช้กับชีวิตประจำวัน พบว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดมีสารสำคัญที่สามารถแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เป็นสาเหตุให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้มากมาย เช่นโรคมะเร็ง เนื้องอก การเกิดริ้วรอยก่อนวัย เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยมากมายที่ให้ความสนใจ เกี่ยวกับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพร โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species) หรือจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยตรง โดยกลไกที่เกิดขึ้นคือ สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนอะตอม (H) แก่อนุมูลอิสระ ในพืชสมุนไพรจะมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic) โดยเฉพาะสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และสารประกอบโพลีไฮดรอกซี (polyhydroxy) ซึ่งจะมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

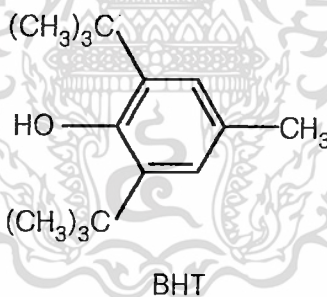
ในงานวิจัยนี้เราได้เลือกสมุนไพรชุมเห็ดเทศ โดยใช้ส่วนของเปลือกมาทำการสกัดเพื่อหาสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งก่อนหน้านี้มีงานวิจัยที่ได้รายงานว่าในส่วนของใบพบสารต้านอนุมูลอิสระ และทำการทดสอบสารที่สกัดได้โดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และนำสารที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์และหาโครงสร้างต่อไป นอกจากนั้นเพื่อเป็นการขยายงานวิจัยในด้านอื่นจะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้ในทางเภสัชวิทยาในด้านการต้านมะเร็ง

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากเปลือกขุมเห็ดเทศ โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม
2. เพื่อนำสารสกัดที่แยกได้ไปศึกษาสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกขุมเห็ดเทศ
4. เพื่อศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากเปลือกขุมเห็ดเทศ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรธรรมชาติ ที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสมุนไพรที่นำมาศึกษาครั้งนี้คือ เปลือกของต้นขุมเห็ดเทศ โดยทำการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมี จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อดูว่าสารที่สกัดได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับใดเมื่อเทียบกับสารสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT) [1,2] แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบที่มีในสมุนไพร นอกจากนั้นจะทำการตรวจสอบถึงฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง



รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างของ BHT

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 ชื่อตัวอย่างของพืชที่สนใจที่ร้านเจ้ากรมเปือ ในที่นี้คือ เปลือกขุมเห็ดเทศนำมาตากให้แห้ง จากนั้นแกะเอาเฉพาะเปลือกแล้วนำไปบดให้ละเอียด

1.4.2 นำตัวอย่างพืชที่ได้ในข้อ 1 มาสกัดโดยวิธีการแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล เป็นเวลา 1 สัปดาห์โดยจะแช่ในเฮกเซนก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรองแยกส่วนที่เป็นกากและชั้นตัวทำละลาย แล้วจึงนำกากไปแช่ในตัวทำละลายตัวต่อไปที่มีขั้วสูงกว่า คือ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ตามลำดับ

1.4.3 นำชั้นตัวทำละลายที่ได้จากการสกัดแต่ละชั้นตัวทำละลายมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ เรียกว่า สารสกัดหยาบ (crude extract)

1.4.4 แบ่งสารสกัดหยาบ ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

1.4.5 แบ่งสารสกัดหยาบ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

1.4.6 ทำการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ด้วยเทคนิค TLC

1.4.7 ทำการแยกสารโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

1.4.8 วิเคราะห์ตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระในแต่ละส่วนย่อย

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบเทคนิคในการสกัดสารอินทรีย์จากพืชสมุนไพรในธรรมชาติ

1.5.2 ทราบถึงวิธีการหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสม

1.5.3 ทราบเทคนิคการแยกสารโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

1.5.4 ทราบวิธีตรวจสอบและวิเคราะห์เบื้องต้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้

1.5.5 ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกขุมเห็ดเทศ

1.5.6 ทราบถึงโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 พื้นฐานการพัฒนาจากสมุนไพร

การพัฒนาจากสมุนไพรจำเป็นต้องมีพื้นฐานความรู้ด้านพฤกษศาสตร์และเภสัชวิทยาเป็นอย่างดี สมุนไพรใช้เป็นยาโดยตรงและยังเป็นวัตถุดิบในการผลิตยาสำเร็จรูปได้อีกด้วย คำว่า สมุนไพร (crude drug) โดยทั่วไปเข้าใจว่าหมายถึงพืชเท่านั้น ความจริงมีความหมายถึง สิ่งที่ได้จากแร่ธาตุ จากสัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ อันหมายถึง ธาตุวัตถุ สัตว์วัตถุ และจุลินทรีย์วัตถุ แต่โดยส่วนใหญ่ที่กล่าวถึงจะเป็นพืชวัตถุ และมักจะเป็นพืชวัตถุที่ปรากฏบนพื้นดินเท่านั้น ในส่วนที่อยู่ในน้ำ หรือในทะเล จะมีการกล่าวถึงค่อนข้างน้อย มีรายงานทางการแพทย์ในการใช้ยาจากพืช พบว่าจากการสำรวจใบสั่งยาในสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1983 มียาที่ประกอบด้วยพืชสมุนไพรร้อยละ 25 ส่วนยาจากสัตว์มีเพียงร้อยละ 2.7 เท่านั้น

สมุนไพรมักไม่ถูกนำมาใช้เป็นยาโดยตรงเพราะไม่สะดวก แต่จะให้องค์ประกอบในสมุนไพรซึ่งแยกออกมาด้วยวิธีการต่าง ๆ สารสกัดที่ได้ไม่ว่าจะประกอบด้วยสารเพียงตัวเดียวหรือเป็นสารผสม ก็คือองค์ประกอบสำคัญของยานั้น ๆ และอาจนำสารสกัดไปบริโภคเป็นยาได้เลย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสมุนไพรสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภทดังนี้

2.1.1 สมุนไพรดิบ (Crude drug) หมายถึงสมุนไพรที่ผ่านกรรมวิธีผลิตเป็นสมุนไพรแห้ง และใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับผลิตภัณฑ์ยา อาหาร และเครื่องสำอาง

2.1.2 สารสกัดดิบ (Crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นสารบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง หรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่จะทำเป็นผลิตภัณฑ์

2.1.3 สารบริสุทธิ์ (Pure compound) หมายถึง สารสกัดบริสุทธิ์จากสมุนไพร

2.1.3 ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป (Finished product) หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่ผ่านกรรมวิธีผลิตหรือแปรรูป พร้อมที่จะบริโภคได้ทันที

2.2 ส่วนของพืชที่ใช้ทำยา

พืชที่ใช้เป็นยาอาจเก็บมาในลักษณะสดหรือแห้ง ถ้าองค์ประกอบไม่คงตัวเมื่อนำไปทำให้แห้ง พืชนั้นจะถูกใช้ในสภาพสด ๆ เช่นน้ำนมจากต้น *Chelidonium majus* ใช้เป็นยากกลางบ้านสำหรับกัดหูด หากทำให้แห้งจะขาดคุณสมบัตินี้ทันที ใบของต้น *Catha edulis* ต้องใช้สด ๆ เพราะมีสารกระตุ้นประสาททำให้ตื่น ซึ่งสารชนิดนี้จะไม่คงตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชที่มีองค์ประกอบคงตัวดี ควรเก็บรักษาในสภาพแห้งจนกว่าจะใช้ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเน่าเสีย ยับยั้งเชื้อราและปฏิกิริยาย่อยสลายเพราะถูกเอนไซม์ แต่ต้องคำนึงถึงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีดังต่อไปนี้

- ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเองขณะทำให้แห้งและขณะเก็บรักษา
- ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการเตรียมยาเป็นยาสำเร็จรูป
- ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นขณะเก็บยาสำเร็จรูปไว้เพื่อตรวจความคงตัวและรอจำหน่าย

ปฏิกิริยาต่าง ๆ ดังกล่าว มีผู้ทำการวิจัยน้อยมาก เนื่องจากปัจจุบันยาจากพืชไม่มีกฎระเบียบควบคุมที่รัดกุม การนำพืชในสภาพแห้งแล้วมาทำเป็นยา โดยหลักการแล้วจะไม่ใช้ทั้งต้นซึ่งหมายถึงรากและส่วนที่อยู่เหนือดิน แต่จะใช้ส่วนใดส่วนหนึ่งได้แก่

2.2.1 ราก (Root)

หมายถึงรากแก้วใหญ่ รากบางชนิดประกอบด้วยรากและลำต้นใต้ดินซึ่งอาจเป็นเหง้าที่ถูกเก็บเกี่ยวมาพร้อมกับราก หรือเป็นเหง้าที่ค้อย ๆ เจริญเป็นราก เช่น รากเจ็ญเขียน รากจะเป็นส่วนที่มีการเก็บกักสารที่สำคัญในปริมาณค่อนข้างสูง

2.2.2 เหง้า (Rhizome)

เหง้าเป็นส่วนของพืชที่เก็บไว้ได้นาน เป็นลำต้นใต้ดินขนาดใหญ่ บางครั้งจะเจริญออกด้านข้างด้วย ด้านที่เจริญลงใต้ดินจะกลายเป็นรากด้านตรงข้าม จะแตกหน่อทุกปีและหลังจากผลสุกจะหลุดร่วงไปเอง ร่องรอยของใบและตาแสดงว่าเป็นเหง้า เหง้าที่ใช้ทางยาได้แก่ เหง้าขิง เหง้าขมิ้น เป็นต้น

2.2.3 รากหัว (Tuber)

รากหัวหมายถึงส่วนสะสมอาหารที่เปลี่ยนแปลงมาจากรากฝอย ตัวอย่างเช่น aconite tuber

2.2.4 หัว

คือส่วนที่เปลี่ยนแปลงมาจากลำต้นใต้ดิน มีใบเกล็ด (scale leaf) ลักษณะเป็นใบอวบสำหรับสะสมอาหาร หัวสมุนไพรบางครั้งก็เป็นเพียงกาบใบชั้นในแห้ง ๆ ตัวอย่างเช่น scillae bulbus (sea onion)

2.2.5 ใบ (Leaf)

ใบหมายถึงส่วนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้: ฐานใบซึ่งมีหู (stipule) หรือใบหุ้ม (ochrea) ก้านใบ (petiole) แผ่นใบ (lamina) การเก็บเกี่ยวควรเก็บในช่วงที่มีการเจริญเติบโตมากที่สุด หรือในช่วงที่ดอกตูมเริ่มแบ่งบานหรือบานเต็มที่ พืชบางชนิดจะมีสารอยู่ที่ใบ บางชนิดมีมากในใบอ่อน บางชนิดมีมากในใบแก่

2.2.6 ดอก (Flower)

ดอก หมายถึง ดอกเดี่ยว หรือดอกช่อ ดอกสมบูรณ์ ประกอบด้วย กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรตัวผู้ ส่วนที่นำมาใช้อาจเป็นดอกตูม ซึ่งรวมทั้งกลีบเลี้ยงและใบอ่อน เช่นดอกลาเวนเดอร์

2.2.7 ผล (Fruit)

ผลหรือลูก คือส่วนที่หุ้มเมล็ดมีประโยชน์สำหรับทำพันธุ์ ผลบางชนิดไม่มีเมล็ดเช่น กล้วย สับปะรด ผลมีหลายแบบ ได้แก่ ผลเดี่ยว ผลรวม ผลที่มีเมล็ด และผลที่ไร้เมล็ด ผลโดยทั่วไปมักเป็นผลเดี่ยว แบ่งออกเป็นผลที่แก่แล้วแตกได้เอง และผลที่แก่แล้วไม่แตกออกเอง ผลชนิดนี้มักจะมีอยู่เพียง 1-2 เมล็ด ลูกสมุนไพรมักที่แตกออกได้เองเมื่อแก่ได้แก่ ฝักมะขามแขก ฝักวานิลลา ลูกฝิ่น ลูกกระวาน เป็นต้น ลูกสมุนไพรมักที่ไม่แตกออกเองได้แก่ พริก ทานตะวัน เกาลัด เป็นต้น

2.2.8 เมล็ด (Seed)

เมล็ดเจริญมาจากไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์ ประกอบด้วยตัวอ่อน อาหารเลี้ยงและเปลือกหุ้มเมล็ด เมล็ดหนึ่ง ๆ จะให้ต้นอ่อนหนึ่งต้น ในทางเภสัชวิทยาเมล็ดอาจหมายถึงผลแตก เช่นแคปซูล ตัวอย่างเช่นเมล็ดฝ้าย เมล็ดละหุ่ง บางครั้งเมล็ดอาจจะไม่รวมเปลือกที่หุ้มด้วย

2.2.9 เปลือกไม้ (Cortex, Bark)

เปลือกไม้หมายถึง เนื้อเยื่อรอบของพืชยืนต้นอาจมาจากส่วนของลำต้นหรือรากที่อยู่นอกวงแคมเบียมคือ เนื้อไม้ ตัวอย่างเช่น เปลือกชิงโค่นา

2.2.10 เนื้อไม้ (Wood)

เนื้อไม้หมายถึง เนื้อเยื่อภายในแคมเบียม จากส่วนรากหรือลำต้นของพืชแก่หรือไม้พุ่ม

2.2.11 พืชล้มลุกทั้งต้น (Herb)

พืชล้มลุกทั้งต้นหมายถึง ส่วนที่อยู่เหนือดอกทั้งหมด โดยหลักการแล้วจะเก็บเกี่ยวในฤดูกาลออกดอก จะประกอบด้วยใบและกิ่งก้านส่วนยอด

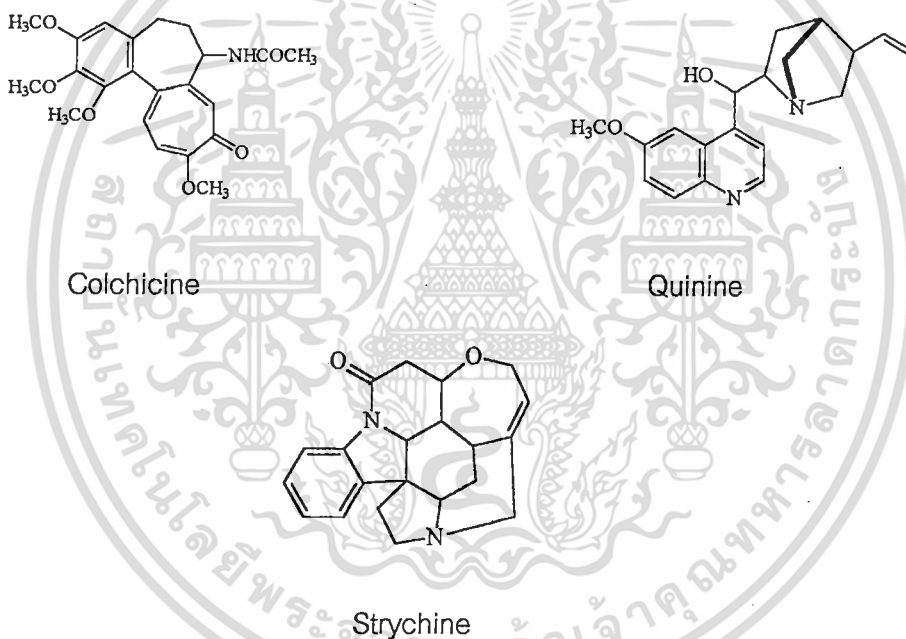
2.3 สารสำคัญที่พบในพืชสมุนไพรร [3]

เนื่องจากสรรพคุณของพืชสมุนไพรมีในแต่ละชนิด จะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารที่สำคัญในพืชสมุนไพรมีซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของพืชสมุนไพรมี ทั้งนี้ปริมาณสารจะมีมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สิ่งแวดล้อมที่เพาะปลูก ช่วงระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวสมุนไพรมี เป็นต้น สารประกอบทางเคมีที่พบในพืชสมุนไพรมี สามารถจำแนกได้ 2 ชนิดใหญ่ ๆ ดังนี้

2.3.1 สารปฐมภูมิ (Primary Metabolite) เป็นสารที่พบในพืชเกือบทุกชนิด เพราะเป็นสารที่มีบทบาทที่สำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) เช่น การสังเคราะห์แสง การสังเคราะห์โปรตีนและไขมัน ซึ่งสารจำพวกนี้ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เป็นต้น

2.3.2 สารทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) เป็นสารที่พืชใช้สังเคราะห์แตกต่างไปจากสารปฐมภูมิ โดยอาจเกิดจากกระบวนการทางชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ในพืชต่างชนิดกันจะพบสารที่แตกต่างกัน ซึ่งสารเคมีที่มีสรรพคุณทางยาจะเป็นสารในกลุ่มนี้ได้แก่

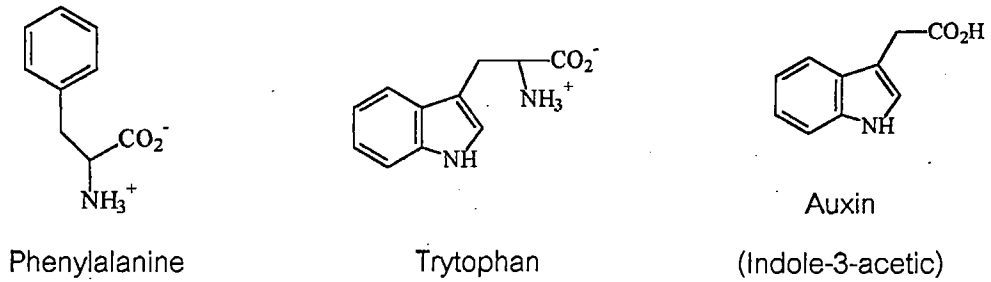
1. แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจนอยู่ในโครงสร้างโดยไนโตรเจนจะอยู่ในวงแอลคาลอยด์ได้มาจากกรดอะมิโน (amino acids) และเทอร์ปีน (terpene) แอลคาลอยด์มีสมบัติเป็นยา เช่น คาเฟอีน (caffeine) ควินีน (quinine) และนิโคติน (nicotine)



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของแอลคาลอยด์

2. อะโรมาติก (Aromatics) จะแบ่งออกได้สองชนิดดังนี้

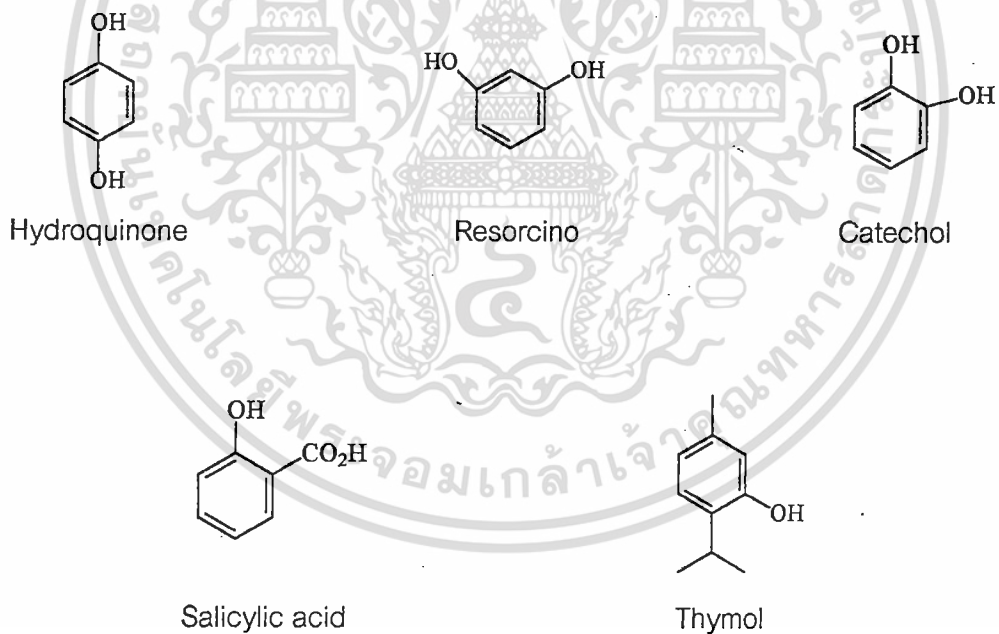
2.1 Non-Phenolic Aromatics เป็นสารประกอบอะโรมาติกที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้าง แต่จะมีหมู่ฟังก์ชันอื่น เช่น หมู่เอมีน และหมู่คาร์บอกซิลอยู่ในโครงสร้าง



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ Non-Phenolic Aromatics

2.2 Phenols เป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้าง ซึ่งเป็นสารส่วนใหญ่ที่พบในพืชสมุนไพร สามารถแบ่งออกได้อีกดังนี้

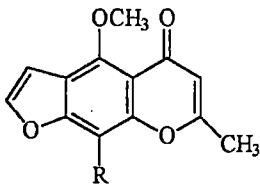
2.2.1 Simple Phenols เป็นสารมอนอเมอร์ของสารประกอบพอลิเมอร์ิก พอลิฟีนอล (polymeric polyphenols) และ กรดซึ่งสร้างจากเนื้อเยื่อของพืช ประกอบด้วย ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และ แทนนิน (tannins) โดยทั่วไปแล้วจะไม่ค่อยพบฟีนอลอิสระในพืช



รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้าง Simple Phenols

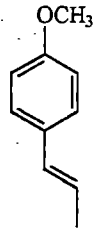
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 Phenol Ethers ส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปเมทิลอีเทอร์ (-OCH₃)

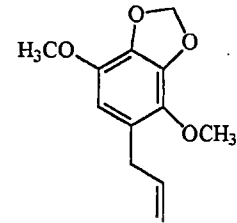


Khehin: R = OCH₃

Visnagin: R = H



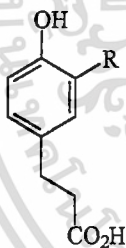
trans-Anethole



Apiole

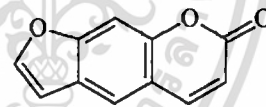
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ Phenol Ethers

2.2.3 Phenylpropanoids เป็นสารประกอบที่มีสายโซ่คาร์บอนที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอมต่ออยู่กับโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล เช่น ไฮดรอกซีคูมาริน (hydroxycoumarins) ฟีนิลโพรเพิน (phenylpropenes) ลิกแนน (lignans) และกรดคูมาริก (coumaric acids)



p-Coumaric (R=H)

Caffeic acid (R=OH)



Psoralen

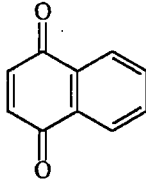
รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของ Phenylpropanoids

2.2.4 Tannins จะพบในพืชที่มีท่อ ประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกหลากหลายชนิด เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนได้เป็นพอลิเมอร์ร่วม (copolymer) ที่ไม่ละลายน้ำ แทนนินจะมีรสขม

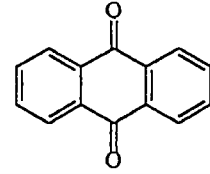
2.2.5 Quinones เป็นสารที่มีสีเข้ม สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ที่พบทั่วไปได้แก่ เบนโซควิโนน (benzoquinone) แนฟโทควิโนน (naphthoquinone) และแอนโทควิโนน (anthroquinone)



Benzoquinon



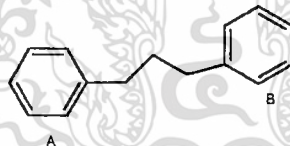
Naphthoquinon



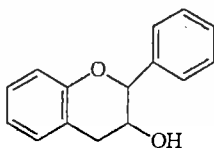
Anthroquinone

รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของ Quinones

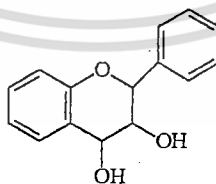
2.2.6 Flavonoids โครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน (benzene) 2 วง โดยจะมีสายโซ่คาร์บอน 3 อะตอมเชื่อมวงเบนซีนทั้งสอง เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ มีสีสด เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป เช่น catechines, leucoanthocyanidins, flavanones, flavanonols, flavones, anthocyanidins, flavonols, chalcones, aurones และ isoflavones โดยทั่วไป flavanones และ flavanonols จะพบอยู่ในรูปกลัยโคไซด์ ส่วน flavones และ flavonols จะพบในรูปฟีนอลิก



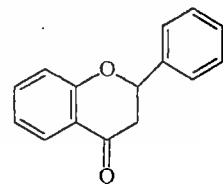
Flavonoid



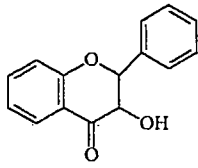
Catechins



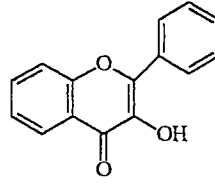
Leucoanthocyanidin



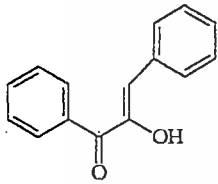
Flavanones



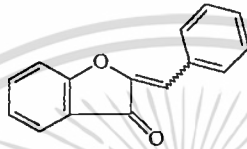
Flavanonols



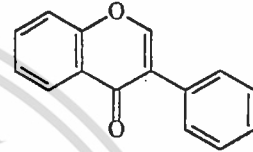
Flavonols



Chalcone



Aurones



Isoflavones

รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างของ Flavonoids

2.4 วิธีการสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สำคัญจากพืชสมุนไพร [3]

การนำพืชสมุนไพรมาทำเป็นยาในปัจจุบันจะพยายามสกัดสารสำคัญที่มีความสามารถในการต่อต้านหรือยับยั้งโรคที่น่าสนใจ โดยทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นหาโครงสร้างที่สำคัญนั้นและพยายามหาแนวทางในการสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ดังกล่าว และมีการพัฒนากับอนุพันธ์ของสารที่สกัดได้ว่ามีสมบัติทางด้านเภสัชวิทยาด้วยหรือไม่ โดยจะมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

2.4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ในการเตรียมตัวอย่างพืชเป็นวิธีการที่สำคัญ โดยจะต้องคำนึงถึงสิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญแต่ละชนิดในพืช ซึ่งได้แก่

- ต้องไม่มีโรคพืช

- ต้องไม่มีพืชชนิดอื่นผสมอยู่ เพราะหากมีพืชอื่นผสมอยู่จะทำให้การวินิจฉัยผิดพลาด

- การตรวจสอบเอกลักษณ์จะต้องถูกต้อง

- ความแตกต่างของสารสำคัญของพืช ในการเก็บเกี่ยวพืชแต่ละครั้ง ซึ่งเกิดจากสาเหตุ

หลายประการ เช่น ความแตกต่างในด้านของสายพันธุ์ สภาพแวดล้อม พื้นที่ปลูก อายุของพืช เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการ 11 ขาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-ผลของการเก็บรักษาและเตรียมพืช ควรมีความชื้นน้อยกว่า 5% เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์ที่จะไปย่อยสลายสารสำคัญในพืชแต่ก็ไม่ควรให้แห้งเกินไปเพราะอาจทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเสียไป

2.4.2 การเตรียมตัวอย่างของพืช มีวิธีดังต่อไปนี้

-การทำสมุนไพรให้แห้ง โดยทั่วไปแล้วการสกัดสารจากพืชจะให้ผลดี เมื่อทำการสกัดสารจากพืชสด โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์ เพื่อทำลายเอนไซม์เสียก่อนที่จะนำไปสกัด หรือเก็บพืชสดมาแช่แอลกอฮอล์ในระหว่างที่ไม่ได้ทำการสกัด แต่เนื่องจากวิธีการเหล่านี้ไม่สะดวกและไม่เหมาะกับกระบวนการทางอุตสาหกรรม จึงจำเป็นจะต้องทำให้เป็นพืชแห้งก่อน โดยทำที่อุณหภูมิที่ต่ำเพื่อป้องกันการสลายตัวของสารสำคัญในพืชก่อนทำการสกัด ซึ่งมีหลายวิธี เช่น

-Air drying เป็นการทำให้แห้งโดยอาศัยอากาศ อาจเป็นที่ร่มหรือผึ่งแดด

-Artificial heat เป็นการทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากแหล่งพลังงานอื่น เช่น ไฟฟ้า การอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิ โดยมีอากาศเข้าออก

-การแตกย่อยเนื้อเยื่อ (Disintegration of Tissue) เป็นขบวนการแตกย่อยเนื้อเยื่อของพืชให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งทำได้หลายวิธี

-การย่อยเชิงกล (Mechanical method) ได้แก่ การบดด้วยโถรง หรือเครื่องบดไฟฟ้า

-การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzyme disintegration) เป็นวิธีการย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอนไซม์สำหรับย่อย Pectin cellulose

-การย่อยโดยสารเคมี (Chemical disintegration) เช่น การใช้ Dimethyl formamide ทำให้เซลล์ Chlorella แตกออก

2.4.3 การสกัดสารที่สำคัญจากพืช

การสกัดสารที่สำคัญจากพืชสมุนไพร สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการสกัด สมบัติของสารในการทนทานต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลาย ซึ่งในแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

-Maceration เป็นขบวนการสกัดสารที่สำคัญจากพืช โดยวิธีการหมักพืชสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดโหลหรือโถ เป็นเวลา 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดจึงรินเอาสารออก แล้วพยายามบีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด แล้วนำสารที่สกัดได้ไปกรอง ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีตรงที่สารสกัดจะไม่โดนความร้อนที่จะทำให้สารสลายตัวก่อน แต่ก็มีข้อเสียคือ จะสิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก และเป็นอันตรายหากตัวทำละลายเป็นสารที่เป็นพิษ เช่น คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ เป็นต้น

-Percolation เป็นขบวนการสกัดสารแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolator โดยนำพืชสมุนไพรมาหั่นกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง เมื่อพองตัวเต็มที่แล้วค่อย ๆ บรรจุสมุนไพรที่ชั้นลงใน Percolator จากนั้นเติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับอยู่สูงกว่าสมุนไพรประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขออก แล้วค่อยเติมตัวทำละลายให้อยู่เหนือสมุนไพรตามที่กำหนด อย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนทำการสกัดสมบูรณ์แล้วบีบสารสกัดออกให้มากที่สุด แล้วนำไปกรอง

-Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดสารแบบต่อเนื่องอีกวิธีหนึ่ง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำมาทำการสกัดโดยให้ความร้อนเพื่อให้ตัวทำละลายในขวดก้นกลมระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวตกลงมา เมื่อถึงความสูงในระดับหนึ่งจะเกิดการกลั่นน้ำ สารสกัดในตัวทำละลายจะไหลกลับลงในขวดก้นกลมวนเวียนเรื่อยไปจนเกิดการสกัดอย่างสมบูรณ์ ข้อดีคือ ไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลายเพราะมีการหมุนเวียนใช้ แต่มีข้อเสียคือ มีการให้ความร้อน สารเคมีบางชนิดอาจเกิดการสลายตัวได้

-Liquid-Liquid Extraction เป็นการสกัดสารจากสารละลายที่เป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดการแบ่งแยกชั้นเป็นสองเฟส คือ

1. Extract lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยมีน้ำหนักที่เบากว่าตัวทำละลายที่ใช้สกัด

2. Refinate lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยมีน้ำหนักที่หนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ใน

การสกัด

2.5 การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

ในการสกัดสารจะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นขึ้นกับการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งควรมีคุณสมบัติดังนี้

-เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่เราต้องการได้ในปริมาณที่มาก

-ไม่เป็นพิษ

-ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

-ราคาถูก

หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกตัวทำละลาย มีข้อสังเกตดังนี้คือ

1. ความเป็นขั้วของตัวทำละลายและสารที่ต้องการสกัดควรมีขั้วที่ใกล้เคียงกัน

2. ต้องละลายสารที่ต้องการออกมาได้มากที่สุด และต้องไม่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาหรือออกมาน้อยที่สุด

3. การละลายเกี่ยวข้องกับแรงต่อไปนี้

2. ต้องละลายสารที่ต้องการออกมาได้มากที่สุด และต้องไม่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาหรือออกมาให้น้อยที่สุด

3. การละลายเกี่ยวข้องกับแรงต่อไปนี้

3.1 Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจาก transient charge induced ในโมเลกุล พวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะประกอบด้วยโมเลกุลซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้สารที่ไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

3.2 Dipole-dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายที่มีขั้วเกิดการเหนี่ยวนำในโมเลกุลเกิดเป็นขั้วบวกและขั้วลบ ทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกันแน่น พวกสารซึ่งไม่มีขั้วจะแทรกเข้าไปได้ยาก

3.3 H-bonding สารที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวทำละลายได้ดีก็จะละลายได้ดี โดยทั่วไปแล้วตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะสมกับสารที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมาะสมกับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว การผสมกันระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วอาจทำให้การละลายดีขึ้น เช่น กรดสามารถละลายได้ทั้งในเอทานอลและอะซีโตน

2.6 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารที่สกัดได้มักมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธีคือ

1. Free Evaporator คือการระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือ hot plate ซึ่งบางครั้งอาจเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดเพื่อให้ระเหยได้รวดเร็วขึ้น

2. Distillation in vacuum เป็นวิธีการระเหยให้แห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกมาก็ที่อุณหภูมิต่ำ ในสภาวะที่ลดความดันเกือบเป็นสุญญากาศ เช่น เครื่องระเหยสุญญากาศ

3. Ultra filtration เป็นการทำให้สารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้น โดยใช้เมมเบรน ซึ่งจะใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 5000

2.7 การแยกส่วนผสม

พืชสมุนไพรแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลากหลายชนิด ดังนั้นสารสกัดเบื้องต้นที่ได้จะเป็นสารผสมของสารเคมีหลายชนิด การที่จะทำให้สารสำคัญบริสุทธิ์ จึงต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์ต่าง ๆ ทำได้โดย

2.7.2 วิธีทางกายภาพ (Physical means) เป็นการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ที่แตกต่างกัน ได้แก่

-Distillation เป็นการกลั่นเพื่อแยกเอาสารที่ระเหยได้ออกจากสารที่ไม่ระเหยหรือแยกสารที่มีจุดเดือดที่แตกต่างกัน

-Steam Distillation เป็นการแยกน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ

-Sublimation เช่น การแยกคาเฟอีนจากแอลคาลอยด์อื่นที่ไม่ระเหิดจากใบชา

-Solvent separation เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยหลักการละลายในตัวทำละลายที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิด

-Solvent Precipitation เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยหลักการละลายและการตกตะกอนในตัวทำละลายที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิด โดยนำสารสกัดละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วเติมตัวทำละลายอีกชนิดที่ละลายได้น้อยกว่าลงไป เพื่อให้เกิดการตกตะกอน

2.8 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช [3]

การศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้สารซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษา การค้นพบพืชซึ่งมีคุณค่าดังกล่าวเป็นกระบวนการที่ยาวและใช้ทั้งเวลาและทุนทรัพย์ นักวิจัยจึงได้พยายามที่จะลดขั้นตอนในการศึกษาวิจัย ซึ่งอาจทำได้ 2 แนวทาง

2.8.1 การศึกษาโดยอาศัยการตรวจสอบทางเภสัชวิทยา ซึ่งเป็นกระบวนการศึกษาหาสารเคมีซึ่งออกฤทธิ์ในการรักษา โดยเริ่มต้นคัดเลือกพืชที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคที่ต้องการจากตำรายาพื้นบ้าน นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม นำสารที่สกัดได้มาตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เมื่อได้ผลตามต้องการ จึงนำไปแยกส่วน นำเฉพาะส่วนที่ให้ผลไปแยกต่อ และตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของส่วนที่แยกได้ ทำเช่นนี้จนกระทั่งแยกได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.8.2 การศึกษาโดยอาศัยการตรวจสอบสารเคมีวิธีนี้อาศัยข้อมูลเบื้องต้นที่ว่า มีสารเคมีกลุ่มใดบ้างที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควินโนน เป็นต้น นำพืชต่าง ๆ มาตรวจสอบหาสารเคมีกลุ่มดังกล่าวข้างต้น พืชใดที่มีสารเคมีกลุ่มที่ตรวจสอบมาก ก็จัดเป็นพืชที่ควรนำมาสกัดแยกต่อจนได้สารบริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา วิธีนี้จึงอาจไม่ได้สารออกฤทธิ์ ได้เพียงสารที่มีปริมาณมากในพืชเท่านั้น จึงอาจทำให้การวิจัยไม่ได้ผลตามความมุ่งหมาย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการวิจัยทั้ง 2 แนวทาง จะเห็นว่าแนวทางแรกจะมีโอกาสพบสารออกฤทธิ์มากกว่าแนวทางที่ 2 ปัจจุบันนิยมใช้แนวทางแรกในการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ในสมุนไพร

2.9 การทำให้สารบริสุทธิ์ [4,5]

ในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิด ดังนั้นสารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมี เพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์ จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์ต่าง ๆ ซึ่งการแยกอาจทำได้โดย

2.9.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้วบรรจุผงของตัวดูดซับ ซึ่งชุ่มด้วยตัวทำละลายชนิดหนึ่ง เอาสารผสมที่ต้องการจะแยก ซึ่งละลายอยู่ในตัวทำละลายชนิดเดียวกันมาหยดลงบนตัวดูดซับ แล้วจึงเติมตัวทำละลายตามลงมา ตัวทำละลายจะค่อย ๆ ชะสารที่ต้องการจะแยกให้เคลื่อนลงไปด้วยอัตราเร็วต่างกัน จนในที่สุดจะได้แถบสีของแต่ละสารแยกออกจากกัน แต่ถ้าสารเหล่านั้นไม่มีสี เราจึงจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นเพื่อหาว่าแต่ละแถบสีอยู่ตรงไหนของคอลัมน์ เช่น ตรวจด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ในกรณีที่รังสีนี้ทำให้สารนั้นเรืองแสงได้) หรือสเปกโตรเมตรีอินฟราเรดบางชนิดไปบนตัวดูดซับสำหรับตรวจหาสาร

การที่สารในสารผสมแยกออกจากกันได้เนื่องจากว่า สารแต่ละชนิดถูกดูดซับไว้โดยตัวดูดซับในอัตราที่ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดซับไว้มากกว่าย่อมเคลื่อนที่ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อยกว่า จากหลักการนี้ทำให้สามารถแยกสารที่มีขั้วต่างกันออกจากกันได้

ตัวดูดซับที่ใช้ส่วนมาก คือ อะลูมินาหรือซิลิกาเจล ซิลิกาเจลใช้ได้ดีกับสารเกือบทุกชนิด (โดยเฉพาะสารที่เป็นกรด-กลาง หรือเป็นเบสอ่อน ๆ) ส่วนอะลูมินาใช้ได้กับสารที่เป็นเบส ตัวดูดซับเป็นผงละเอียดมีพื้นที่ผิวมาก ทำให้มีปริมาณพื้นที่ผิวที่มีขั้วมากที่จะดูดหรือยึดตัวถูกละลายที่มีจำนวนน้อยไว้ด้วยแรงดึงดูดแบบไฟฟ้าสถิต

ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะทำให้อัตราเร็วในการแยกสารต่าง ๆ ออกจากตัวดูดซับหรืออำนาจการชะไม่เท่ากัน ตัวทำละลายสามัญที่ใช้เรียงตามลำดับสภาพมีขั้ว (polarity) จากน้อยไปหามาก คือ

1. hexane
2. cyclohexane
3. carbon tetrachloride
4. benzene
5. chloroform
6. ether
7. acetone
8. ethanol

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

9. methanol
10. water
11. organic acid

ถ้าต้องการตัวทำละลายที่มีอำนาจการชะพหุเหมาะ อาจต้องผสมตัวทำละลายสองชนิดหรือมากกว่าเข้าด้วยกัน

2.9.2 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี TLC

ใช้ตัวดูดซับที่เป็นของแข็งเป็นชั้นหรือเป็นฟิล์มบาง ๆ หนา 0.25-1 mm ติดอยู่บนแผ่นกระจก โดยมากมักจะใช้แผ่นกระจกไมโครสโคปส์โกลด์เพราะสะดวกรวดเร็ว จากนั้นนำสารละลายของสารผสมที่จะแยกจำนวนเล็กน้อยไปจุด (spot) บนตัวดูดซับที่ใกล้ปลายกระจกข้างหนึ่ง โดยใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) เมื่อตัวทำละลายระเหยไปแล้ว สารจะติดอยู่บนตัวดูดซับ นำแผ่นโกลด์นี้ไปใส่ในภาชนะที่มีตัวทำละลายชนิดหนึ่ง (อาจเป็นตัวทำละลายผสม) โดยให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสาร เมื่อปิดภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะซึมขึ้นมาข้างบนตามแนวตั้งผ่านจุดที่มีสาร สารต่าง ๆ จะเคลื่อนที่ตามตัวทำละลายขึ้นมาด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสาร ธรรมชาติของตัวทำละลายและตัวดูดซับ การที่จะทราบว่าสารที่ไม่มีสีเคลื่อนที่มาอยู่ที่ตำแหน่งใด ทำได้เช่นเดียวกับวิธีคอลัมน์

ตัวดูดซับที่ใช้ อาจจะเป็นซิลิกาเจลหรืออะลูมินา ในกรณีของซิลิกาเจลอำนาจในการดูดซับขึ้นกับปริมาณน้ำที่มี ถ้ามีน้ำมากจะทำให้ความสามารถในการดูดซับลดลง ในการเตรียมแผ่นโกลด์ของตัวดูดซับ เรามักจะกวนซิลิกาเจลหรืออะลูมินากับน้ำจนเป็น slurry แล้วให้กระจายตัวบนแผ่นโกลด์อย่างสม่ำเสมอ แล้วนำไปให้ความร้อน แต่ถ้าใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่ายไม่จำเป็นต้องใช้ความร้อน ตัวทำละลายที่ใช้คล้ายคลึงกับวิธีคอลัมน์ และส่วนมากมักจะใช้ตัวทำละลายผสม วิธีนี้ใช้แยกสารจำนวนน้อยออกจากกันและใช้ระบุสาร เพราะเหตุว่าถ้าใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ระบบตัวทำละลายเดียวกัน ที่อุณหภูมิและภาวะเดียวกัน สารหนึ่ง ๆ จะมีค่า rate of flow หรือ R_f คงที่ ซึ่งค่า R_f คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

2.10 ชุมเห็ดเทศ [6]



รูปที่ 2.8 ชุมเห็ดเทศ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cassia alata* Linn.

ชื่อวงศ์ : Leguminosae

ชื่ออังกฤษ : Acapulo, Candelabra bush, Candle bush, Ringworm bush

ชื่อท้องถิ่น : ชี้คาบ, ชุมเห็ดใหญ่, หมากกะลิงเทศ, ลับมีนหลวง

2.10.1 ลักษณะ

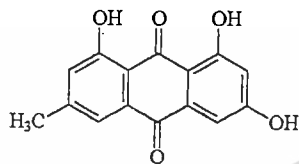
ชุมเห็ดเทศเป็นไม้พุ่มค่อนข้างสูง สูง 1-5 เมตร แตกแขนงมาก ใบเป็นใบประกอบ ก้านใบแข็ง ตั้งฉากกับกิ่ง ใบเรียงตัวเป็นคู่อยู่ในระนาบเดียวกัน ใบรูปไข่ขอบขนาน ปลายใบมน หรือมีรอยเว้าตอนปลาย ใบกว้าง 3-7 ซม. ยาว 5-15 ซม. ดอกเป็นช่อสีเหลืองฝักมีปีก 4 ปีก คล้ายถั่วพู ฝักอ่อนมีสีเขียว ฝักแก่มีสีดำ เมล็ดในรูปสามเหลี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

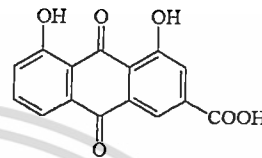
ใบกว้าง 3-7 ซม. ยาว 5-15 ซม. ดอกเป็นช่อสีเหลืองฝักมีปีก 4 ปีก คล้ายถั่วพู ฝักอ่อนมีสีเขียว ฝักแก่มีสีดำ เมล็ดในรูปสามเหลี่ยม

2.10.2 สารประกอบที่สำคัญ

แอนทราควิโนน กลัยโคไซด์ หลายชนิด ได้แก่ emodin, aloe-emodin และ rhein



emodin



rhein

รูปที่ 2.9 สูตรโครงสร้างของ emodin และ rhein

2.10.3 ลักษณะทางภูมิศาสตร์

ชุมเห็ดเทศปลูกง่ายในดินเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะดินร่วนซุย เป็นพืชที่ชุ่มชื้นมาก ไม่ชอบที่ร่ม

2.10.4 พฤษเคมี

ใบ ประกอบด้วย aloe-emodin anthraquinones, chrysophanol, deoxycoelutin 4,5-dihydroxyl-1-hydroxymethylanthron, 4,5-dihydroxy-2-hydroxymethylanthrone, emodin, rhein, isochrysophanol, kaempferol, physionmonoglucoside, sitosterol, 1,3,8-trihydroxy-2-methylanthraquinone, sennoside, flavonoids, terpenoids

2.10.5 เภสัชวิทยา

2.10.5.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal activity)

- สารสกัดด้วยน้ำจากใบชุมเห็ดเทศ สามารถฆ่าเชื้อรา Trichophyton mentagrophytes ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกลาก และสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% (25.0 mg/ml) จากทุกส่วนของชุมเห็ดเทศก็มีฤทธิ์เช่นเดียวกันและยังสามารถต้านเชื้อรา Microsporium canis, Candida albicans และ Aspergillus niger

- นอกจากนี้สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม อีเทอร์ แอลกอฮอล์ และน้ำจากใบชุมเห็ดเทศยังสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อ 19 ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฆ่าเชื้อราอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคกลากได้เช่นกัน ได้แก่ *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* และ *M. gypseum* แต่ไม่สามารถฆ่า *C. albicans*, *A. fumigatus* และ *Penicillium puberulum* (Imwidthaya) โดยเฉพาะสารสกัดในชั้นแอลกอฮอล์ สามารถฆ่าเชื้อ *T. rubrum* และ *E. floccosum* ได้ดี

2.10.5.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterial activity)

- สารสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ จากใบชุมเห็ดเทศ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae*

- สารสกัดด้วย 50% แอลกอฮอล์ จากทุกส่วนของชุมเห็ดเทศ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella typhosa* และ *E. coli* รวมทั้ง *Agrobacterium tumefaciens*

- สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *B. subtilis* แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *Sh. Dysenteriae* และ *S. typhi* ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้

- สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *K. pneumoniae* และ *Ps. aeruginosa* ได้ (Imwidthaya)

2.10.5.3 ฤทธิ์เป็นยาระบาย (laxative)

- เมื่อให้หนูกินสารสกัดน้ำร้อนจากใบชุมเห็ดเทศ ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัว หรือให้โดยการฉีดสารสกัดด้วยน้ำร้อนดังกล่าวขนาด 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว พบว่ามีฤทธิ์ระบายได้ดี

- ใบชุมเห็ดเทศมีสารสำคัญคือ anthraquinone glycoside มีฤทธิ์กระตุ้นให้ลำไส้ใหญ่เกิดการบีบตัวเพื่อขับถ่าย ได้แก่ physion-I-glycoside, chrysophanol, emodin, rhein, aloe-emodin เป็นต้น

2.11 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literature survey)

ในปี 1977 P. Vashney & Raj Pal ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเกี่ยวกับดอกไม้ในตระกูล Leguminosae ได้แก่ *Cassia siamea* Lamk., *Peltophorum ferrugineum* Benth และ *Caesalpinia pulcherrima* SW. โดยพบว่าดอกไม้ทั้ง 3 จะมีองค์ประกอบที่เหมือนกันได้แก่ β -sitosterol, lupeol และ ซูโคส (sucrose) แต่จะมี ฟลาโวนอยด์ (flavonoid), โมโน (mono-), ได (di-), และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ที่แตกต่างกัน [7]

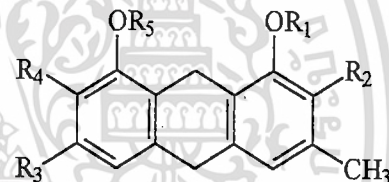
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี 1977 Manjusree Pal, D. K. Roy และ P. R. Pal จากการค้นพบแอนทราควิโนน (anthraquinone) ในเมล็ดของชุมเห็ดไทย (*cassia tora* Linn.) และพบเซนโนไซด์ (sennoside) จากใบ จึงได้ทำการสกัดสารอีโมดิน (emodin) จากใบที่แห้งของชุมเห็ดไทย [8]

ในปี 1996 Jae Sue Choi, Hee Jung Lee, Kun-Young Park, Jung-Ok Ha, และ Sam Sik Kang ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของชุมเห็ดไทย (*Cassia tora*) ได้แก่ แอนทราควิโนน อะไกลโคน (anthraquinone Aglycones) และ แนฟโทไพโรน ไกลโคไซด์ (Naphthopyrone Glycosides) เกี่ยวกับผลในการต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) ซึ่งเกิดจากแอลฟาทอกซินแบคทีเรีย (aflatoxin bacteria)

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านการกลายพันธุ์ชนิดแอนทราควิโนน 3 ชนิด โดยจากผลการวิจัยพบว่า แอนทราควิโนนที่มีหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy group) 3 หมู่ และมีหมู่เมททอกซี (methoxy group) 1 หมู่ จะให้ผลที่มีประสิทธิภาพที่สุด ซึ่งแสดงสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.10 จากผลการวิจัยนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า ตำแหน่งของ เมททอกซีและไฮดรอกซี จะมีผลต่อการต้านการกลายพันธุ์ [9]

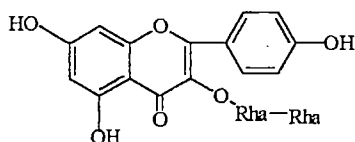
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	H	H	H	H	H
2	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃
3	CH ₃	OH	OH	OCH ₃	H



รูปที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของแอนทราควิโนนที่มีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซีและเมททอกซีที่แตกต่างกัน

ในปี 1998 P.R. Sakharkar และ A.T. Pati ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสมบัติจากการสกัดใบของชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และแบคทีเรีย ได้แก่ *S.aureus*, *S. aureus coagulase positive*, *B. subtilis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *E. coli*, *V. cholerae*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* และ *K. pneumoniae* โดยจะพบว่าสารสกัดที่ได้จากการใช้อะซีโตนและเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายในการสกัด จะได้ผลที่ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน [10]

ในปี 1998 K. V. Rao, A. G. Damu, B. Jayaprakasam, และ D. Gunasekar ได้ทำการค้นพบฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ตัวใหม่จากดอกไม้ของต้น *Cassia hirsuta* สารที่พบได้แก่ kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside และรูทีน (rutin) [11]



รูปที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของ kaempferol

ในปี 2000 ภาคภูมิ พาณิชยการนันท์ และ ทรงศรี แก้วสุวรรณ ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านออกซิเดชันจากชุมเห็ดเทศ โดยทำการสกัดสารจากใบ, ผล และดอก โดยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยจะพบว่าสารสกัดจากส่วนของใบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าสารสกัดจากส่วนดอกและผล โดยพบว่าสารที่ได้คือ kaempferol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า BHT ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ [2]

ในปี 2001 Hiroyoshi Moriyama, Toru Iizuka, และ Masahiro Nagai ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของใบชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) เมื่อทำการให้ความร้อน โดยเทียบกับตัวอ้างอิง โดยจะพบว่าจากการศึกษาพบว่าจะมีปริมาณของ kaempferol 3-gentiobioside ที่เพิ่มมากขึ้น [12]

ในปี 2001 จาก Mahidol University Annual Research Abstracts Vol.28 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบแอนทราควิโนน (anthraquinone) ที่พบได้ในใบของต้นชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) ซึ่งมีประโยชน์ในการนำมาทำเป็นยาระบาย และรักษาโรคทางผิวหนัง [13]

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 ขั้นตอนการวิจัย

1. ซื้อตัวอย่างของพืชที่สนใจที่ร้านเจ้ากรมเปือ ในที่นี้คือ เปลือกชุมเห็ดเทศนำมาตากให้แห้ง จากนั้นแกะเอาเฉพาะเปลือกแล้วนำไปบดให้ละเอียด
2. นำเปลือกชุมเห็ดเทศที่ได้ในข้อ 1 มาสกัดโดยวิธีการแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล เป็นเวลา 1 สัปดาห์โดยเริ่มแช่เฮกเซนก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์จากนั้นนำมากรองแยกส่วนที่เป็นกากและชั้นตัวทำละลาย แล้วจึงนำกากไปแช่ในตัวทำละลายตัวต่อไปที่มีขั้วสูงกว่า คือ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ตามลำดับ
3. นำชั้นตัวทำละลายที่ได้จากการสกัดแต่ละชั้นตัวทำละลาย มาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ จะเรียกส่วนนี้ว่า สารสกัดหยาบ (crude extract)
4. แบ่งสารสกัดหยาบ ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)
5. แบ่งสารสกัดหยาบ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง KB (Oral human epidermoid carcinoma) และ BC (Breast Cancer)
6. ทำการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ด้วยเทคนิค TLC
7. ทำการแยกสารโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
8. วิเคราะห์ตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพในแต่ละส่วนย่อย

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) ในแต่ละชั้นตัวทำละลาย

- นำเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศที่แห้งมาบดให้ละเอียดหนัก 2.30 กิโลกรัม แช่ในตัวทำละลาย เฮกเซนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ คนสม่ำเสมอทุกวัน
- ค่อย ๆ กรองเอาสารสกัดออก บีบสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด
- ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ

-ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบชั้นแฮกเซน

-น้ำหนักที่ได้จากการกรองมาฝั่งให้แห้งจากนั้นนำมาแช่ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม

เมื่อครบกำหนดนำมากรอง จากนั้นนำกากที่ได้มาแช่ต่อในตัวทำละลาย เมทานอล และปฏิบัติเหมือนเดิม จะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 3 ชั้นตัวทำละลาย

3.2.2 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

-ตัดแผ่น TLC ขนาด 2x5 เซนติเมตร ทำการจุดสารสกัดหยาบ ที่ละลายด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน

-เตรียม TLC tank โดยมีกระดาษกรองวางด้านใน tank และเตรียมกระจกไว้ปิด

-ทดสอบอัตราส่วนของสารละลายที่ค่าต่างๆ โดยเริ่มจากสารละลายในอัตราส่วน 5 : 95 แล้วจึงค่อยๆลดหรือเพิ่มสารละลายชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับการแยกสารในสารสกัดหยาบบนแผ่น TLC

-จุ่มแผ่น TLC ที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 ลงใน tank ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปถึงระดับที่กำหนดไว้

-ถ้าสารบนแผ่น TLC สามารถแยกเห็นเป็นจุดอย่างชัดเจนแสดงว่าอัตราส่วนที่ผสมใน TLC tank เป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม แต่ถ้ายังไม่พบต้องทำการเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของสารละลายเพื่อให้ได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

-นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 366 นาโนเมตร

-นำแผ่น TLC ที่ได้ไปย้อมด้วย developing solvent โดยวางแผ่น TLC ไว้บนกระจก นำสำลีชุบ developing solvent บ้ายให้ทั่วแผ่น จากนั้นนำไปอุ่นบนแผ่นให้ความร้อน จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของจุดที่เกิดขึ้น

-ใช้ระบบตัวทำละลายที่หาได้ไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC Screening for Radical Scavengers

เป็นการตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อดูว่า สารหรือองค์ประกอบใดจากสารสกัดอาจมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีวิธีทำง่าย ๆ โดย

-หาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารแต่ละชนิดจากสารสกัดของพืชด้วยเทคนิค

TLC

- เตรียมสารละลาย methanolic DPPH radical ให้มีความเข้มข้น 0.2 mM
- เติมสารละลาย methanolic DPPH radical 1 ml. ลงไปในสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 2.1 (ใช้สารละลายแต่ละความเข้มข้นเป็นปริมาตร 0.5 ml.)
- ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มีอุณหภูมิประมาณ 30 นาที
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 516-518 nm ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer
- สำหรับสารแต่ละความเข้มข้นให้ทำการทดลองซ้ำ 2.3-2.5 ซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย
- วัดค่า การดูดกลืนแสง ของสารละลาย DPPH ในตัวทำละลายที่ใช้ที่ 516-518 nm
- คำนวณ % radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} = \left[1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารละลายที่ผสมกับ DPPH แล้ว
 A_{control} = ค่า absorbance ที่วัดได้ของ DPPH และตัวทำละลายที่ใช้

3.2.5 การแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

- นำซิลิกาเจล เบอร์ 7729 มาผสมด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำที่สุดของระบบ
- ใส่ลึกลงให้อยู่ที่ตำแหน่งทางออกของคอลัมน์เพื่อป้องกันการรั่วไหลของซิลิกา
- เทซิลิกาที่ผสมด้วยตัวทำละลายในข้อ 4.1 ลงในคอลัมน์ แล้วเคาะด้วยจุกยางหรืออาจต่อบีมเพื่อให้อากาศดันตัวทำละลายให้ไหลได้ดีขึ้น ทำการปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออกมาเรื่อย ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลจัดเรียงตัวได้แน่นมากที่สุด
- เมื่อคอลัมน์แน่นแล้ว จึงเติมแมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium Sulfate) เพื่อคลุมผิวหน้าของซิลิกาเจลไว้
- นำสารสกัดหยาบที่ได้มาเติมซิลิกาเจล เบอร์ 7734 คนจนสารสกัดหยาบร่วนและแห้ง
- เติมสารสกัดหยาบที่ผสมด้วยซิลิกาเจลในข้อ 4.5 ลงในคอลัมน์
- เติมตัวทำละลายเพื่อชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้ทำการหาไว้
- เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมา เพื่อนำไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการสกัดตัวอย่างพืชด้วยวิธีแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

จากการทดลองได้นำเอาเปลือกชุมเห็ดเทศปริมาณ 2.30 กิโลกรัม บดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า จากนั้นนำไปแช่ด้วยตัวทำละลายในชั้นเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอลตามลำดับ แล้วทำการกรองสารสกัดและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ พบว่ามีน้ำหนักของสารสกัดหยาบ (Crude Extract) ดังตารางที่ 4.1

ตาราง 4.1 แสดงค่าน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)
เฮกเซน	20.00
คลอโรฟอร์ม	21.47
เมทานอล	57.67

4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด โดยวิธี การฟอกจางสีสารละลาย DPPH และวิธี DPPH radical scavenging assay

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดจากทั้ง 3 ชั้นตัวทำละลายมาทดสอบการฟอกจางสีสารละลาย DPPH พบว่าจะได้ผลดังรูปที่ 4.1.ก และ 4.1.ข. จะพบว่าจุดของสารที่เคลื่อนที่ จะสามารถฟอกจางสีของสารละลาย DPPH ได้ ซึ่งแสดงว่ามีสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ



รูปที่ 4.1.ก. แสดงผลการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

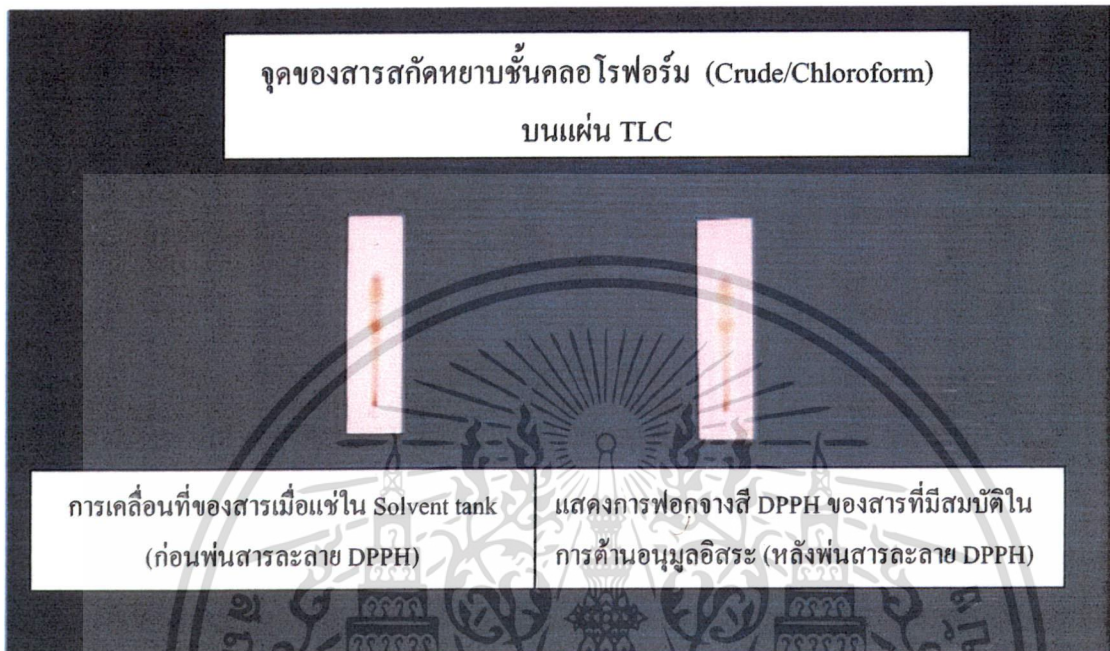


รูปที่ 4.1.ข. ภาพวาดแสดงผลการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

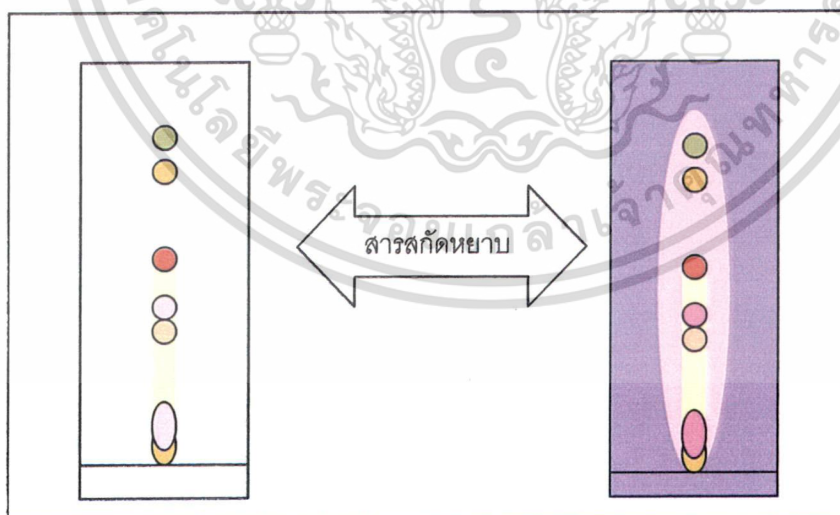
จากรูปที่ 4.1.ก. และ 4.1.ข. การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 4 จุด จากจุดของสารสกัดหยาบซึ่งมีสีเหลือง ต่อมาก็คือสีส้ม สีแดงอมส้ม สีเหลือง และสีเหลืองตามลำดับ และเมื่อพ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย DPPH จะพบว่าจุดของสารทั้ง 4 จุด สามารถพอกจางสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้ทั้งหมด โดยจะสังเกตเห็นเป็นสีเดิม แสดงว่ามีสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ



รูปที่ 4.2.ก. แสดงผลการการพอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม

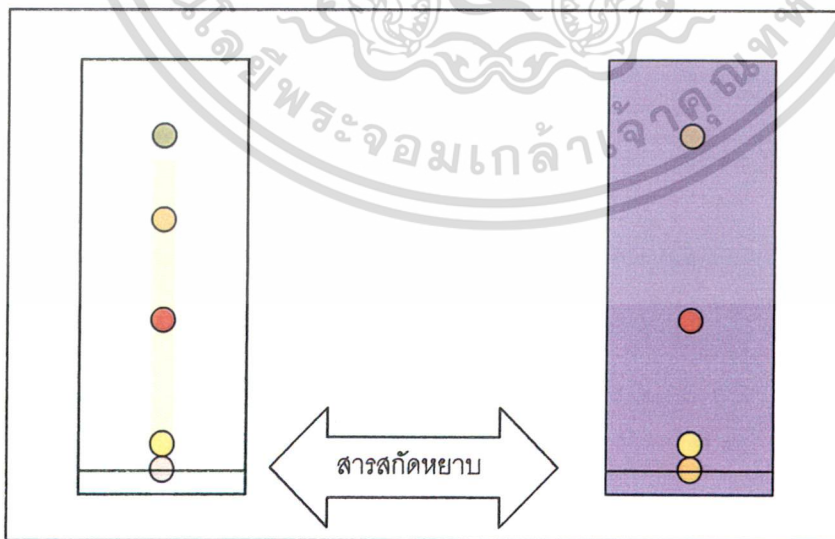


รูปที่ 4.2.ข. ภาพวาดแสดงผลการการพอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม

จากรูปที่ 4.2.ก และ 4.2.ข. การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 7 จุด จากจุดของสารสกัดหยาบซึ่งมีสีเหลือง ต่อมาก็คือสีชมพู สีเหลือง สีชมพู สีส้ม สีเหลือง และสีเขียว ตามลำดับ และเมื่อพ่นสารละลาย DPPH จะพบว่าจุดของสารทั้ง 7 จุด สามารถพอกจางสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้ทั้งหมด โดยจะสังเกตเห็นเป็นสีเดิม แสดงว่ามีสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ



รูปที่ 4.3.ก. แสดงผลการการพอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล



รูปที่ 4.3.ข. ภาพวาดแสดงผลการการพอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

จากรูปที่ 4.3.ก และ 4.3.ข การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 4 จุด จากจุดของสารสกัดหยาบซึ่งมีสีเหลือง ต่อมาก็คือสีเหลือง สีส้ม สีเหลือง และสีเขียวตามลำดับ และเมื่อพ่นสารละลาย DPPH จะพบว่าจุดของสารสีเหลือง (จุดที่3) ไม่พอกจางสีสารละลาย DPPH ทำให้มองเห็นเป็นสีม่วงของสารละลาย DPPH ซึ่งเป็นลักษณะของสารที่ไม่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากทั้ง 3 ชั้นตัวทำละลาย มาทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ประสิทธิภาพของสารในการต้านอนุมูลอิสระ ED_{50} แสดงผลดังตารางที่ 4.2

ตาราง 4.2 แสดงค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	Antioxidant activity, ED_{50} (g/ml)
เฮกเซน	45.78
คลอโรฟอร์ม	113.07
เมทานอล	99.91

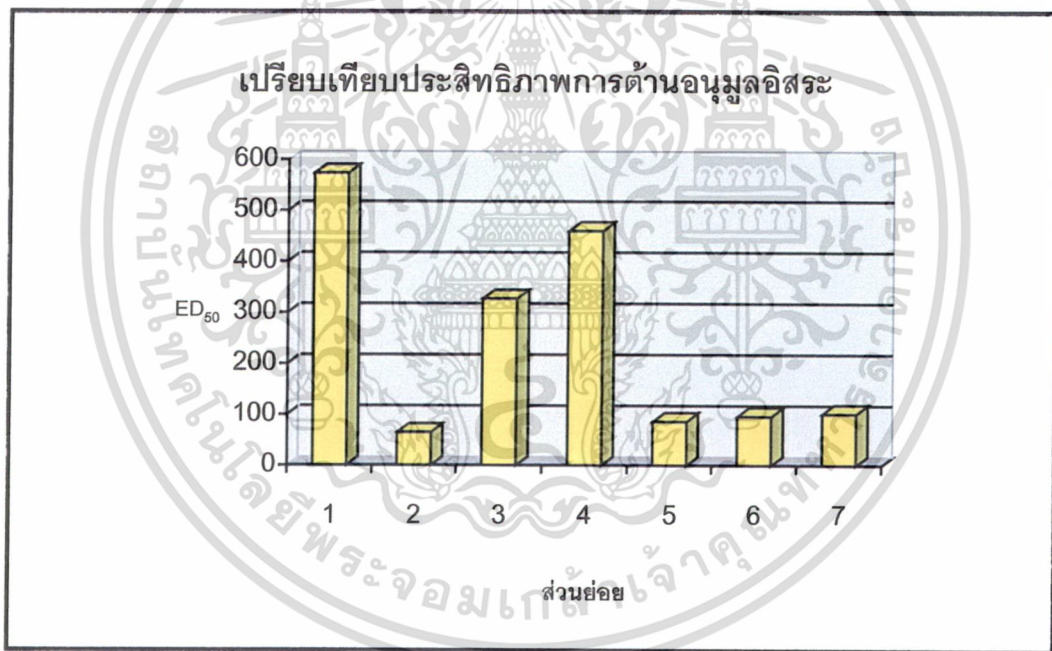
4.3 ผลการแยกสารสกัดหยาบจากชั้นคลอโรฟอร์มโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด

4.3.1 ผลการแยกสารสกัดจากสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม (Crude Chloroform Extract)

เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบการแยกด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน-เอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 60:40 สามารถแยกสารสกัดได้ทั้งหมด 7 ส่วนย่อย จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 7 ส่วนย่อย ไปทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ดังตารางที่ 4.3.1

ตาราง 4.3.1 ผลการแยกสารสกัดหยาบจากชั้นคลอโรฟอร์มและค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (กรัม)	สีและลักษณะ	Antioxidant activity, ED ₅₀ (g/ml)
1	0.0742	เป็นผลึกสีเหลืองส้ม	572.97
2	3.0068	เป็นผลึกสีส้ม	64.96
3	1.0159	เป็นผลึกสีส้ม	327.02
4	4.5385	เป็นของเหลวหนืดสีเขียวปนน้ำตาล	459.44
5	5.0365	เป็นของเหลวหนืดสีเขียวปนดำ	86.14
6	2.0414	เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	96.37
7	1.3788	เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	101.47



กราฟ 4.3.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 7 ส่วนย่อย

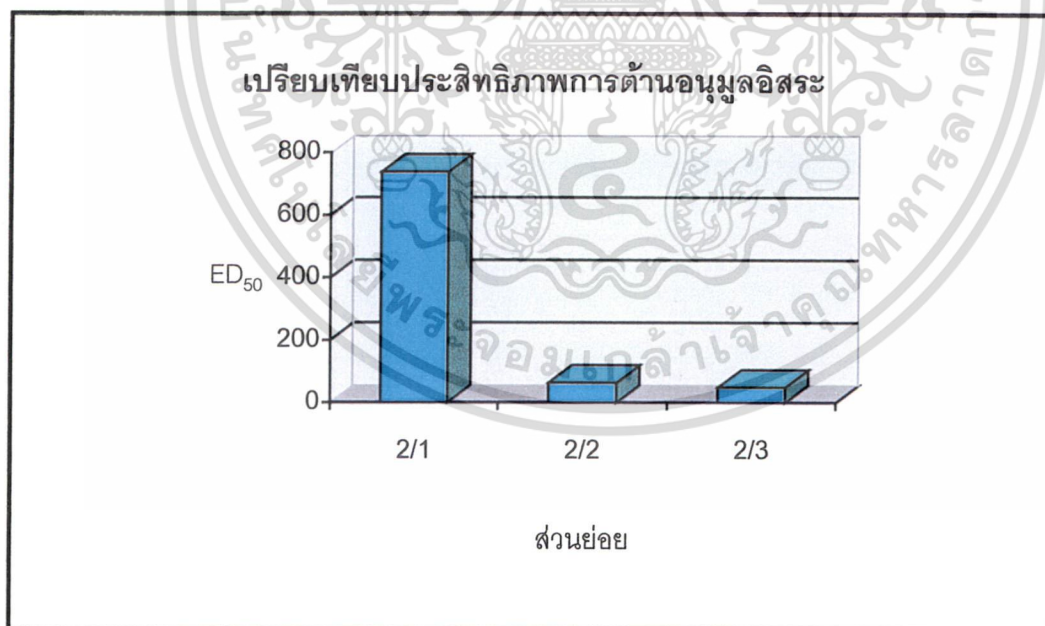
จากผลการทดลองพบว่า ส่วนย่อย 2 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด แต่ผลจากการทดสอบการแยกสารด้วยเทคนิค TLC ให้ผลว่าสารที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์ดังนั้นจึงต้องนำสารสกัด ส่วนย่อยที่ 2 มาทำการแยกต่อไป

4.3.2 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2

เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบการแยกด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน- เอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 95 : 5 สามารถแยกสารสกัดได้ทั้งหมด 3 ส่วนย่อย จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 3 ส่วนย่อย ไปทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ดังตารางที่ 4.3.2

ตาราง 4.3.2 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2 และค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนย่อย	น้ำหนัก(กรัม)	สีและลักษณะ	Antioxidant activity ED ₅₀ (g/ml)
2/1*	1.4245	เป็นผลึกสีขาว	737.92
2/2**	1.3744	เป็นผลึกสีส้ม	63.87
2/3***	0.5402	เป็นผลึกสีส้ม	48.89
BHT	-	ของแข็งสีขาว	14.22



กราฟ 4.3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 3 ส่วนย่อย

จากผลการทดลองพบว่า ส่วนย่อย 2/2 และ ส่วนย่อย 2/3 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกันและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่า ส่วนย่อย 2/1 แต่พบว่าผลจากการทดสอบการแยกสารด้วยเทคนิคTLC ให้ผลว่าสารทั้ง 2 ส่วนย่อย ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์ดังนั้นจึงต้องนำสารสกัด ส่วนย่อย 2/2 และ ส่วนย่อย 2/3 มาทำการแยกต่อไป

- * ส่วนย่อย 2/1 หมายถึง ส่วนย่อย 1 ที่ได้จากการแยกสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.2
- ** ส่วนย่อย 2/2 หมายถึง ส่วนย่อย 2 ที่ได้จากการแยกสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.2
- *** ส่วนย่อย 2/3 หมายถึง ส่วนย่อย 3 ที่ได้จากการแยกสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.2

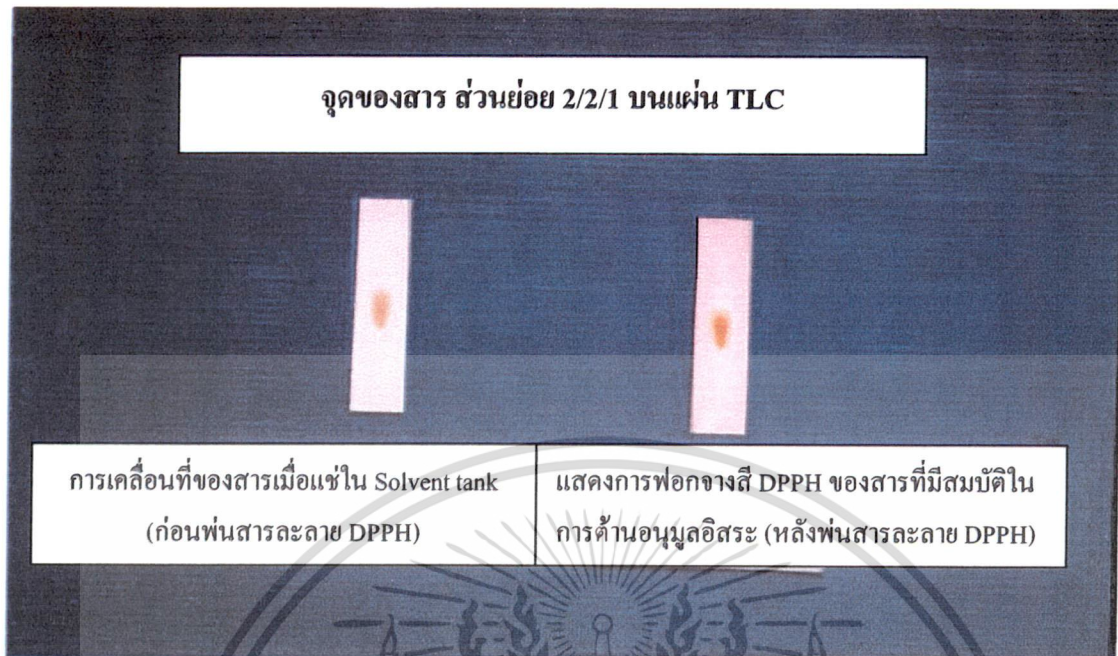
4.3.3 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/2

เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบการแยกด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายแยกเช่น- ไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 30:70 สามารถแยกสารสกัดได้ทั้งหมด 3 ส่วนย่อย และพบว่าสารสกัดในส่วนย่อย 2/2/1 มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปตรวจสอบโครงสร้างได้ และนำมาทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยการนำมาพอกจางสีสารละลาย DPPH จากรูปที่ 4.4.ก และ รูปที่4.4.ข จะพบว่าสารที่แยกได้สามารถพอกจางสีสารละลาย DPPH ได้ซึ่งแสดงว่ามีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

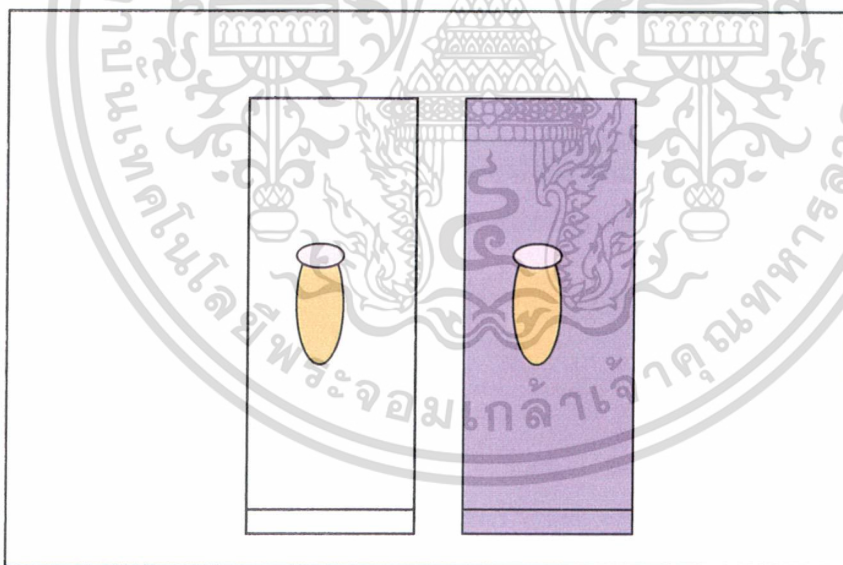
ตาราง 4.3.3 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/2

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (กรัม)	สีและลักษณะ
2/2/1*	0.0508	ผลึกสีส้ม
2/2/2**	0.0689	ผลึกสีส้ม
2/2/3***	0.2843	ผลึกสีส้ม

- * ส่วนย่อย 2/2/1 หมายถึง ส่วนย่อย 1 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.3
- ** ส่วนย่อย 2/2/2 หมายถึง ส่วนย่อย 2 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.3
- *** ส่วนย่อย 2/2/3 หมายถึง ส่วนย่อย 3 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.3

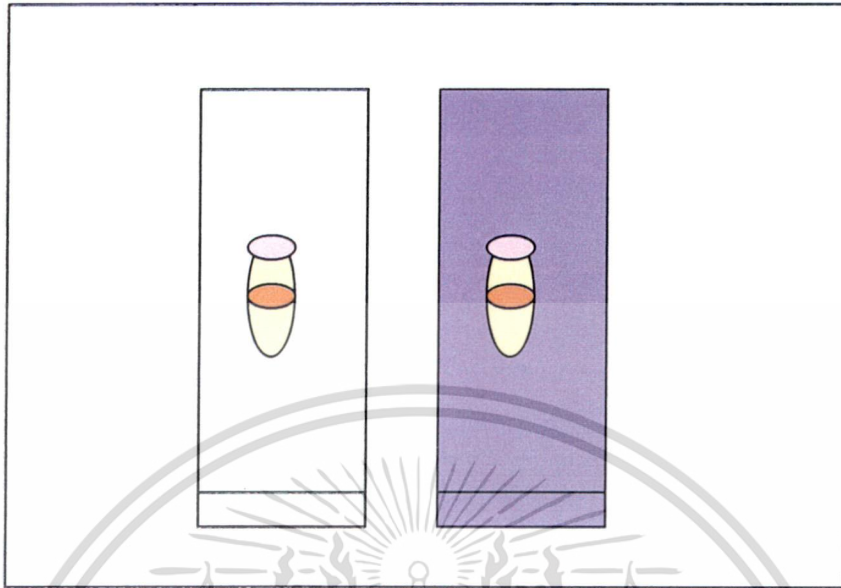


รูปที่ 4.4.ก. แสดงผลการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/2/1



รูปที่ 4.4.ข. ภาพวาดแสดงผลการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/2/1

จากรูปที่ 4.4.ก. และ 4.4.ข. การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 2 จุดจากเส้น
 ที่ทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC มีจุดของสารสีเหลืองและสีชมพูตามลำดับ จะพบว่าสารสีเหลืองสามารถ



รูปที่ 4.5.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/3/2

* ส่วนย่อย 2/3/1 หมายถึง ส่วนย่อย 1 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 3 ในตารางที่ 4.3.4

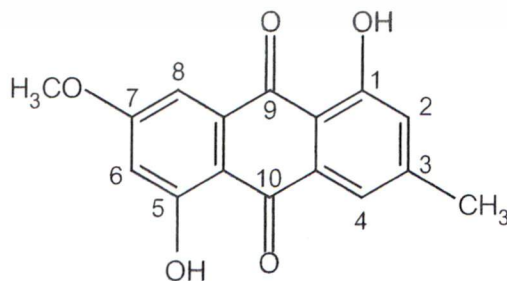
** ส่วนย่อย 2/3/2 หมายถึง ส่วนย่อย 2 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 3 ในตารางที่ 4.3.4

*** ส่วนย่อย 2/3/3 หมายถึง ส่วนย่อย 3 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 3 ในตารางที่ 4.3.4

จากรูปที่ 4.5.ก. และ 4.5.ข การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 2 จุด จากเส้นที่ทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC มีจุดของสารสีส้มและสีชมพูตามลำดับ จะพบว่าสารทั้งสองสามารถฟอกจางสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้บ้างเล็กน้อย โดยยังสามารถมองเห็นสีแดงของสารได้บ้าง ซึ่งแสดงว่าสารที่แยกได้มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

4.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2

4.4.1 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1



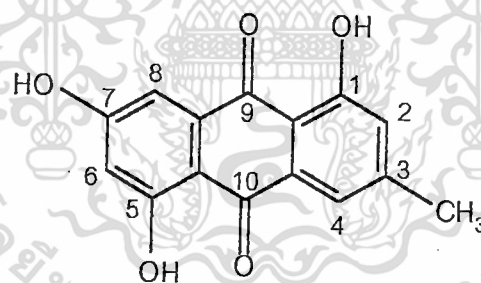
รูปที่ 4.6.1 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1

จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$ จะพบว่าผลการวิเคราะห์คาดว่าโครงสร้างของสารที่สกัดได้จะมีโครงสร้างดังรูปที่ 4.6.1

ตารางที่ 4.4.1 แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 2/2/1 ด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$

ค่า chemical shift (ppm) ของสาร 2/2/1	
H-2	7.10
H-4	7.65
H-6	6.70
H-8	7.40
CH_3 -3	2.50
OCH_3 -3	3.95

4.4.2 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/3/2



รูปที่ 4.6.2 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/3/2

จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$ จะพบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดที่แยกได้จากลำต้นของต้นชุมเห็ดเทศ [14] จึงคาดว่าโครงสร้างของสารที่สกัดได้จะมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4.6.2

ตารางที่ 4.4.2 แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 2/3/2 ด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$

	ค่า chemical shift (ppm) ของสาร 2/3/2	ค่า chemical shift (ppm) ของสารอ้างอิง[14]
H-2	7.17	7.07
H-4	8.30	7.60
H-6	6.59	6.63
H-8	7.45	7.30
CH ₃ -3	2.43	2.43

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

4.5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB (Oral human epidermoid carcinoma) และ BC (Breast cancer) ของสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม พบว่าสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง KB ในระดับที่อ่อนแต่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง BC ในระดับปานกลาง

ตารางที่ 4.4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง KB (Oral human epidermoid carcinoma) และ BC (Breast cancer)

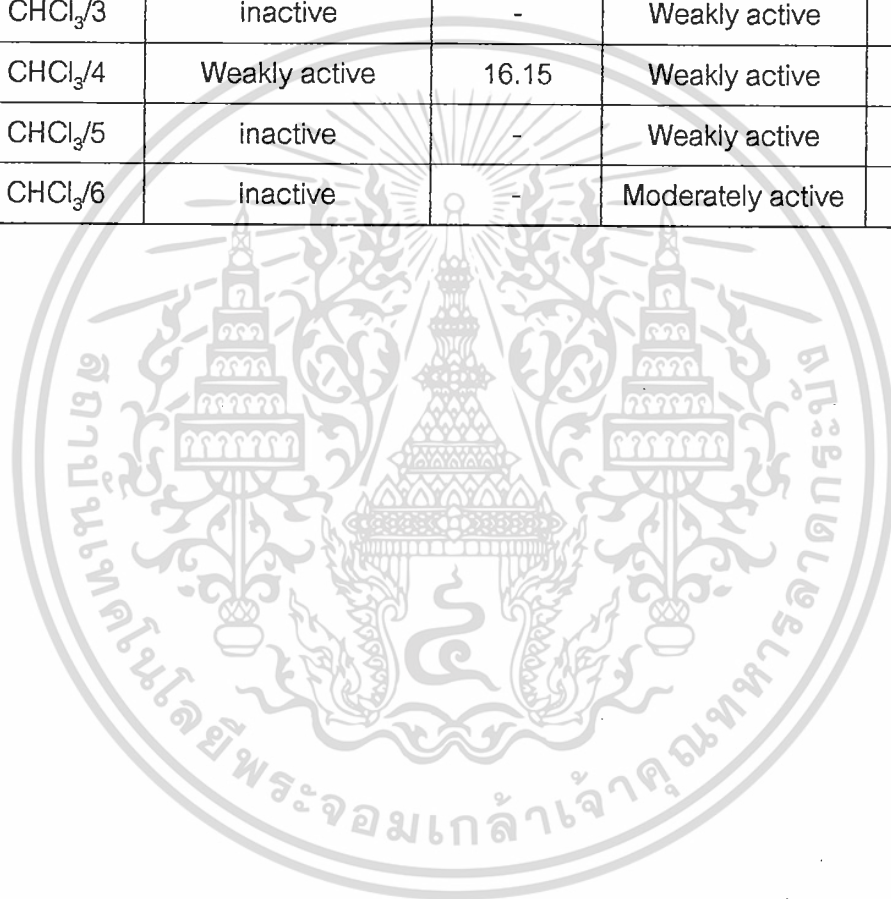
Sample Code	KB		BC	
	Cytotoxicity	ED ₅₀	Cytotoxicity	ED ₅₀
Ca (B)/ hexane	inactive	-	inactive	-
Ca (B)/chloroform	Weakly active	-	Moderately active	-
Ca (B)/ methanol	inactive	-	inactive	-

4.5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB (Oral human epidermoid carcinoma) และ BC (Breast cancer) ของส่วนย่อยในชั้นสารสกัดคลอโรฟอร์ม

จากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง KB และ BC จึงได้ทำการแยกสารในชั้นสารสกัดคลอโรฟอร์มโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งในแต่ละส่วนย่อย

ตารางที่ 4.4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง KB (Oral human epidermoid carcinoma) และ BC (Breast cancer) ของส่วนย่อยในชั้นสารสกัดคลอโรฟอร์ม

Sample Code	KB		BC	
	Cytotoxicity	ED ₅₀	Cytotoxicity	ED ₅₀
Ca (B) CHCl ₃ /1	inactive	-	inactive	-
Ca (B) CHCl ₃ /2	inactive	-	Weakly active	17.14
Ca (B) CHCl ₃ /3	inactive	-	Weakly active	16.91
Ca (B) CHCl ₃ /4	Weakly active	16.15	Weakly active	13.69
Ca (B) CHCl ₃ /5	inactive	-	Weakly active	13.01
Ca (B) CHCl ₃ /6	inactive	-	Moderately active	8.09



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

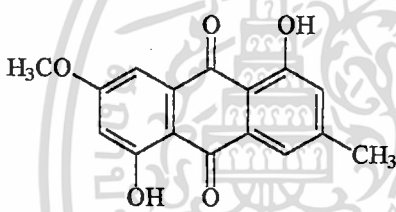
5.1 สรุปผลการวิจัย

สามารถสกัดสารจากเปลือกขุมเห็ดเทศด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) 20.00 21.45 และ 57.67 กรัม ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ของเปลือกขุมเห็ดเทศมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สารสกัดชั้นคลอโรฟอร์มจะแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB (Oral human epidermoid carcinoma) ในระดับที่อ่อน แต่จะแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็ง BC (Breast cancer) ในระดับปานกลาง และเมื่อนำสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์มมาแยกโดยอาศัยคุณสมบัติความมีขั้วของสาร โดยใช้ Silica gel column chromatography ได้สาร 7 ส่วนย่อย เมื่อนำแต่ละส่วนย่อยไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่า สารในส่วนย่อยที่ 6 มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง BC (Breast cancer) ในระดับปานกลาง แต่เนื่องจากสารในส่วนย่อยนี้ทำการแยกออกมาจากสารสกัดหยาบได้ปริมาณน้อย จึงไม่เพียงพอต่อการนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ และผลการทดลองฤทธิ์ในการต้านมะเร็งแสดงฤทธิ์ในระดับปานกลางเท่านั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการวิจัยต่อโดยเน้นถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล พบว่า สารสกัดชั้นเฮกเซนจะให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด รองลงมาคือ เมทานอลและคลอโรฟอร์ม แต่เนื่องจากสารสกัดชั้นเฮกเซนมีน้อยมากจึงไม่ได้ทำการแยกสารส่วนย่อยในขั้นนี้ ส่วนชั้นเมทานอลนั้นได้เกิดปัญหาในขั้นตอนการแยกคือ สารถูกชะด้วยตัวทำละลายออกมาน้อยมาก ซึ่งคาดว่าสารที่อยู่ในชั้นนี้มีความเข้มข้นสูงมาก จึงติดขัดกับซิลิกาเจลมาก เพราะฉะนั้นสารสกัดทั้งสองชั้นนี้จึงมิได้ทำการแยกสารส่วนย่อยออกมา จึงทำการทดลองต่อไปเฉพาะสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

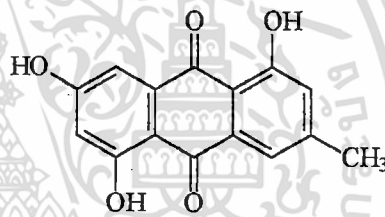
เมื่อนำสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมาแยกโดยอาศัยคุณสมบัติความมีขั้วของสาร โดยใช้ Silica gel column chromatography สามารถแยกสารได้ 7 ส่วนย่อย จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 7 ส่วนย่อย โดยวิธี DPPH radical scavenging assay และคำนวณหาค่า ED_{50} พบว่าสารสกัดในส่วนย่อย 2 มีค่า ED_{50} ต่ำที่สุด แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด จึงนำมาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อไปเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ ผลการแยกสารสกัดในส่วนย่อยที่ 2 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารสกัดได้ 3 ส่วนย่อย นำสารสกัดทั้ง 3 ส่วนย่อย มาทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดในส่วนย่อย 2/2 และ ส่วนย่อย 2/3 มีค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity ED_{50}) ใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระดีกว่า สารสกัดในส่วนย่อย 2/1 และพบว่าสารสกัดในส่วน

ย่อย 2/2 และ ส่วนย่อย 2/3 ยังไม่บริสุทธิ์ จึงนำไปทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งผลการแยกสารส่วนย่อยและการทดสอบประสิทธิภาพสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ผลการแยกสารสกัดใน ส่วนย่อย 2/2 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารสกัดได้อีก 3 ส่วนย่อย และพบว่าสารในส่วนย่อย 2/2/1 มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้าง และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีสารละลาย DPPH พบว่า ส่วนย่อย 2/2/1 สามารถฟอกจางสีได้
2. ผลการแยกสารสกัดใน ส่วนย่อย 2/3 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารสกัดได้อีก 3 ส่วนย่อย และพบว่าสารในส่วนย่อย 2/3/2 มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้าง และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีสารละลาย DPPH พบว่า ส่วนย่อย 2/3/2 สามารถฟอกจางสีได้
3. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเครื่อง $^1\text{H-NMR}$ spectrometer ใน ส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2 จะได้สารที่คาดว่าจะมีโครงสร้างดังนี้



สารที่ได้จาก ส่วนย่อย 2/2/1



สารที่ได้จาก ส่วนย่อย 2/3/2

รูปที่ 5.1 โครงสร้างของสารที่ได้จากส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2

จากการวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าเปลือกขุมเห็ดเทศมีสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งจะช่วยป้องกันการทำลายของเซลล์ร่างกายจากอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการพัฒนายาจากเปลือกขุมเห็ดเทศโดยอาศัยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ ต่อไป

5.2 ข้อเสนอนแนะ

เนื่องจากสารที่สกัดได้มีความเสถียรต่ำ เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีพบว่าสารมีการสลายตัว ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการทำทีนเลย์เยอร์โครมาโตกราฟีเทียบกับสารสกัดก่อนทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งอาจเกิดการสลายตัวได้ง่ายเมื่อได้รับแสง ดังนั้นในขั้นตอนการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีควรป้องกันไม่ให้คอลัมน์สัมผัสกับแสงและควรใช้เวลาในการแยกสารให้น้อยที่สุด

บรรณานุกรม

1. สันติ ทิพยางค์ และ วรวรรณ พันธุ์นาวัน. Bioactive Compounds Symposium and Biological Screening test Workshop. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. ภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์ และ ทรงศรี แก้วสุวรรณ. แนวทางการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
3. Bandoniene, D. and Murkovic, M. 2002. On-Line HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Radical Scavenging Phenols Extracted from Apples (*Malus domestica* L). *J. Agric. Food Chem.* 50: 2482-2487.
4. วันดี กฤษณพันธ์. การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
5. Kaufman, P. B. *Natural Product from Plants*. Boca Raton : CRC Press.
6. <http://herbal.pharmacy.psu.ac.th/data/herbal/cassia.htm>
7. Varshney, P. and Pal, R. 1977. Vhemical studies of the Flowers of *Cassia siamea* Lamk., *Peltophorum ferrugineum* Benth and *Caesalpinia pulcherrima* Sw. *The Indian Journal of Pharmacy*. Jan.-Feb.: 15-16.
8. Manjusree, P.; Roy, D. K. and Pal, P. R. 1977. Emodin from the leaves of *Cassia tora* Linn. *The Indian Journal of Pharmacy*. Sep.-Oct.: 15-16.
9. Choi, J. S.; Lee, H. J.; Park, K.; Ha, J. and Kang, S. S. 1996. *In vitro* Antimutagenic Effect of Anthraquinone Aglycones and Naphthopyrone Glycosides from *Cassia tora*. *Planta Med.* 63: 11-14.
10. Sakharkar, P. R. and Pati, A. T. 1998. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Sep.-Oct.: 311-312.
11. Rao, K. V.; Damu, B.; Jayaprakasam, B. and Gunasekar, D. 1999. Flavonol Glycosides from *Cassia hirsute*. *J. Nat. Prod.* 62: 305-306.
12. Moriyama, H.; Iizuka, T. and Nagai, M. 2001. A Stabilized Flavonoid Glycoside in Heat-Treated *Cassia alata* Leaves and Its Structural Elucidation. *Yakugaku Zasshi*. 121: 817-820.
13. www.mahidol.ac.th/abstracts/annual2000/0185.htm

14. Hemlata และ Suraj B. Kalidhar. 1993. Alatinone, an anthraquinone from *Cassia alata*.
Phytochemistry. 32: 1616-1617.



ภาคผนวก

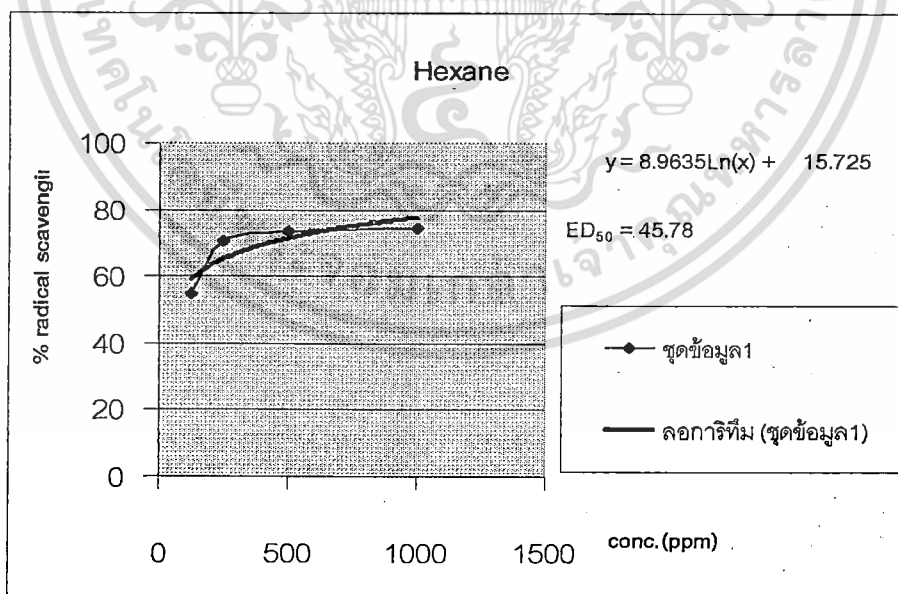
ภาคผนวกที่ 1

1.) วิธีการพล็อตกราฟเพื่อหาค่า ED₅₀

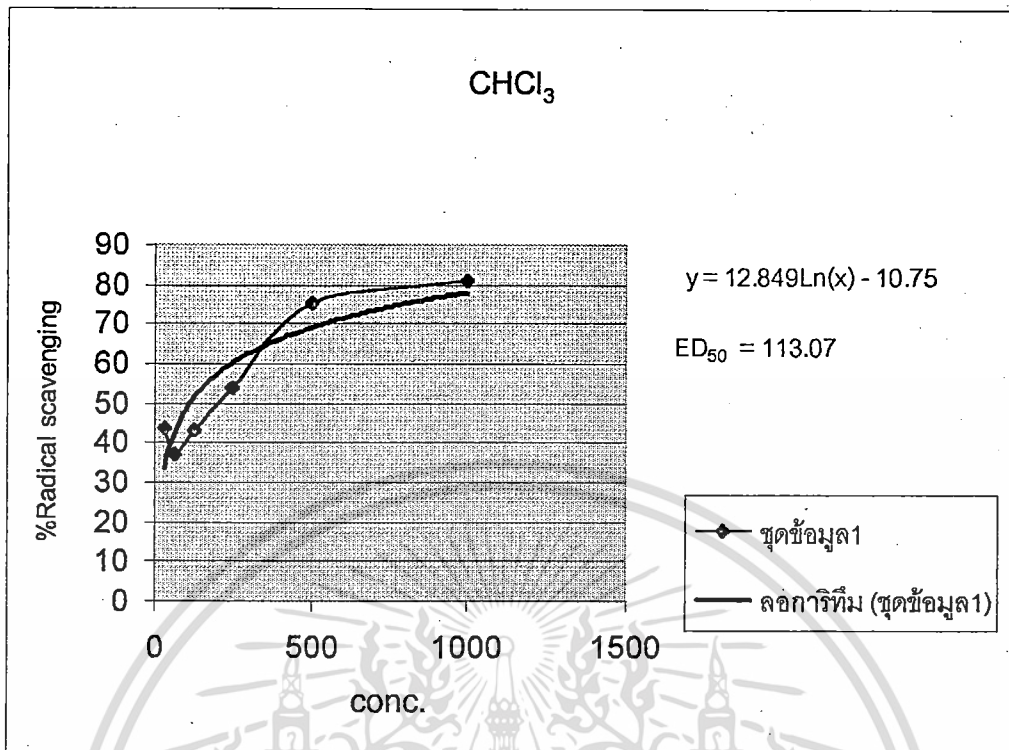
1. เปิดโปรแกรม excel
2. นำค่าของความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เติมใน column
3. เมื่อเติมครบให้ลากเป็นกรอบดำกับตัวเลขทั้งหมด แล้วคลิกที่รูปภาพแท่งทางด้านขวามือบน
4. จะปรากฏ Chart Wizard – Step 1 of 4 ให้คลิกที่ XY (Scatter) ดูรอบทางขวาเลือกกราฟรูปที่ 2 คลิก next จะปรากฏ Chart Wizard Step 2 of 4 ให้คลิก next
5. จะเข้าสู่ Chart Wizard – Step 3 of 4 พิมพ์ chart title พิมพ์ค่าแกน [X], [Y] จากนั้นคลิก next
6. จะเข้าสู่ Chart Wizard – Step 4 of 4 พิมพ์ finish จะได้รูปกราฟ
7. คลิกที่จุดบนเส้นกราฟ จะปรากฏจุดสี่เหลี่ยมให้คลิกขวาที่จุดสี่เหลี่ยม แล้วคลิกที่ Add Trend line
8. คลิกที่ Logarithmic คลิกเครื่องหมายถูกที่ Display equation on chart คลิก OK
9. จะได้กราฟ พร้อมสมการ ซึ่งสามารถใช้ในการคำนวณหาค่า ED₅₀

ภาคผนวกที่ 2

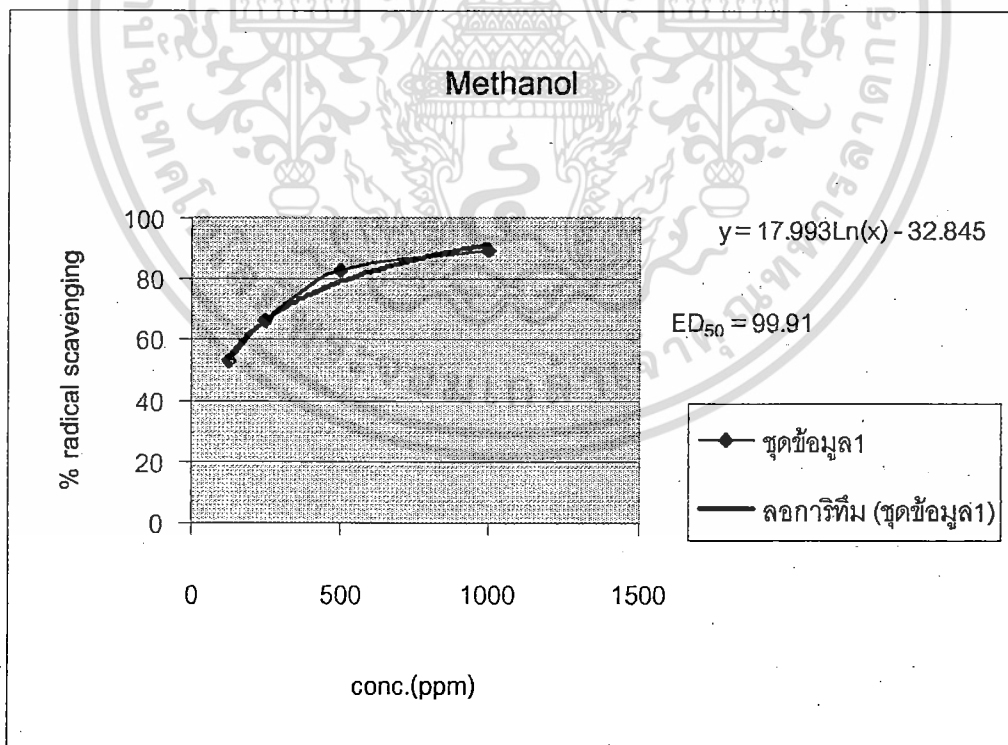
2.) กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายชั้นต่างๆ



กราฟ 2-1 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน



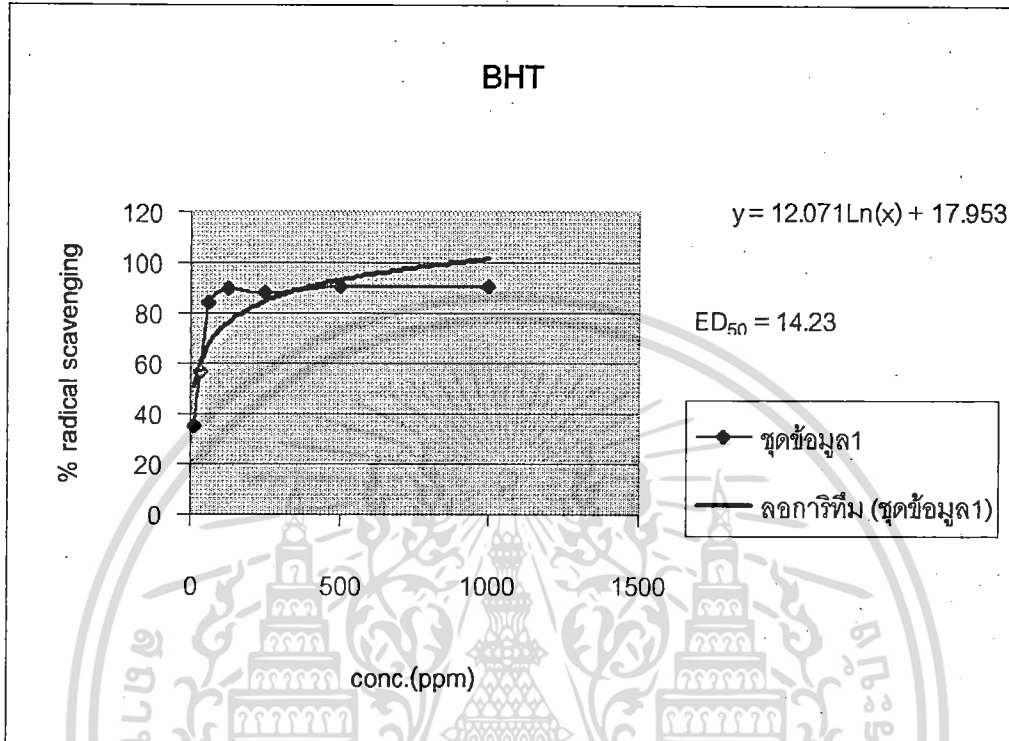
กราฟ 2-2 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม



กราฟ 2-3 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเมทานอล

ภาคผนวกที่ 3

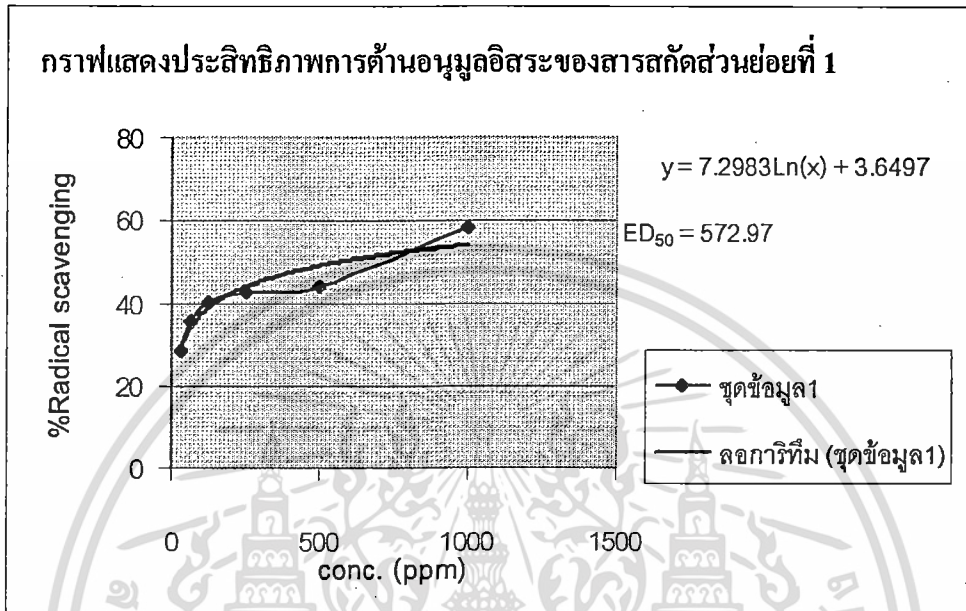
3.) กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของ BHT



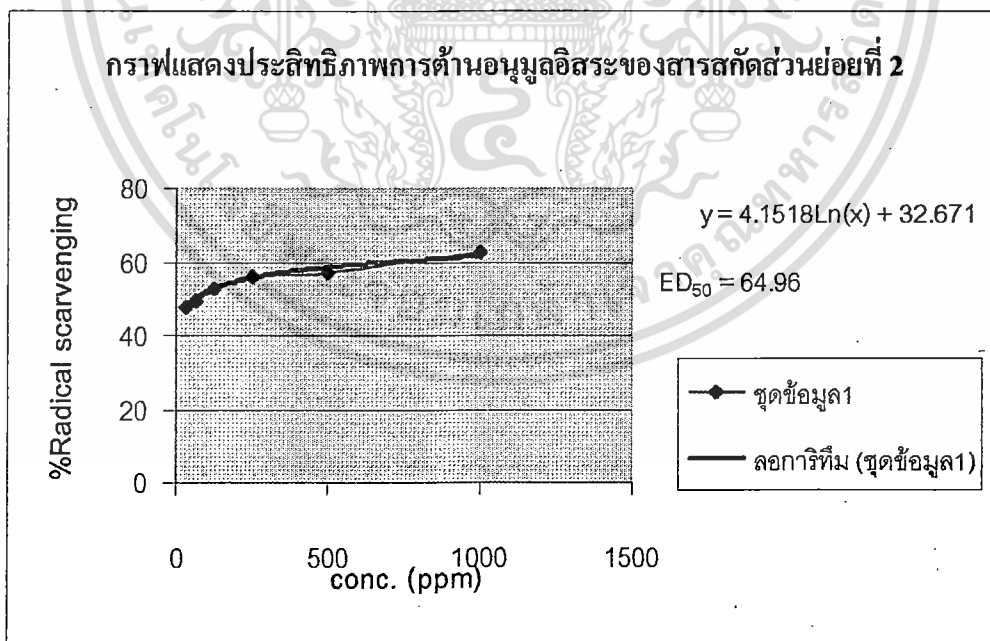
กราฟ 3 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของ BHT

ภาคผนวกที่ 4

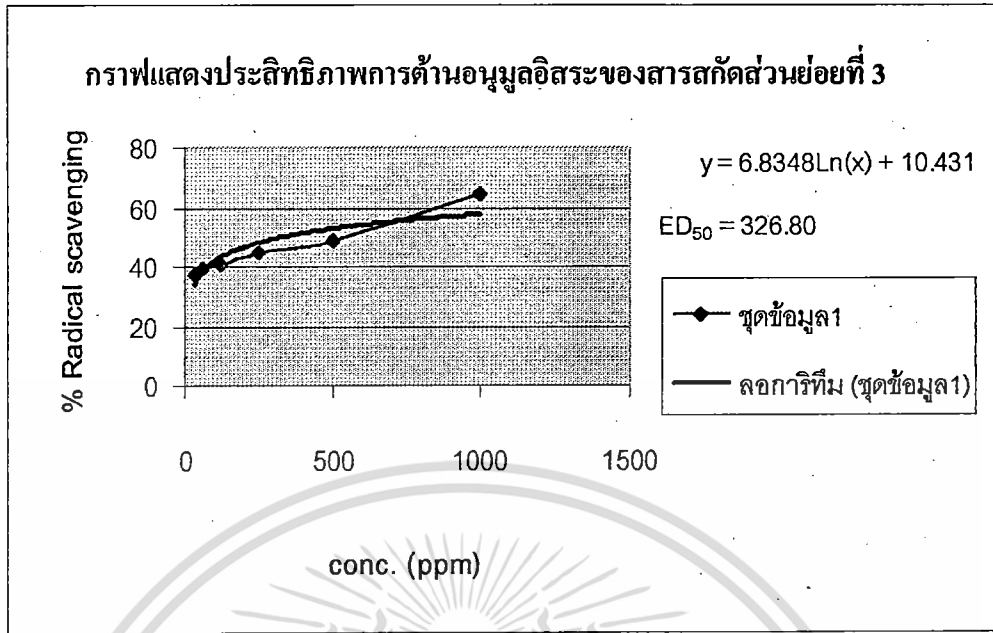
4.) กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 7 ส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบใน
ชั้นตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม



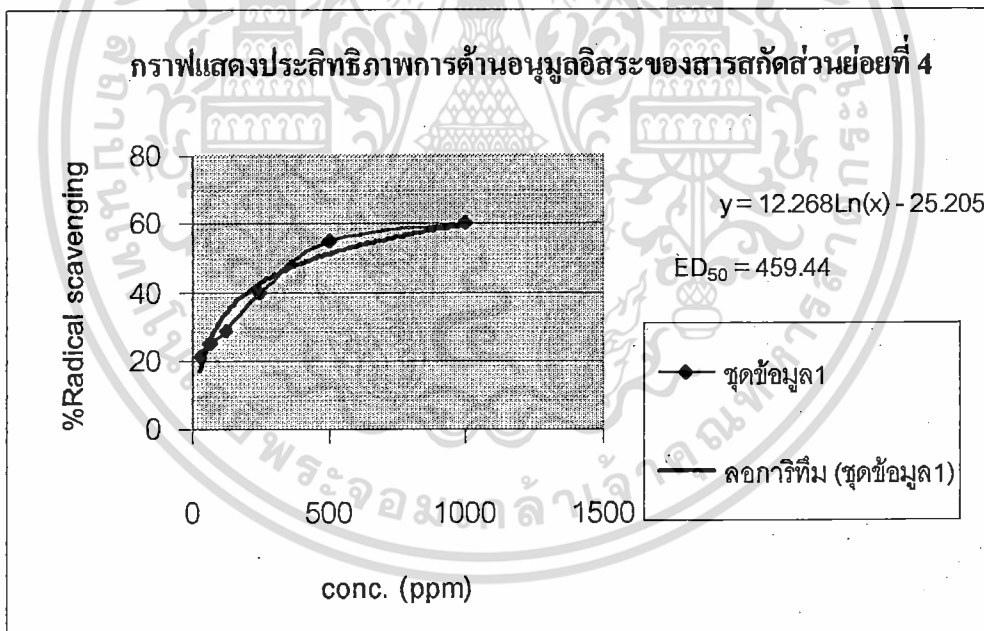
กราฟ 4-1 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 1



กราฟ 4-2 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2

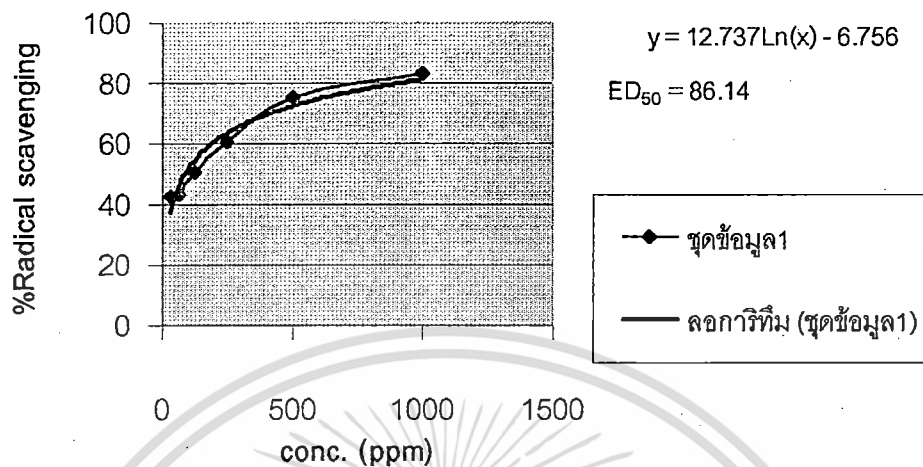


กราฟ 4-3 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 3



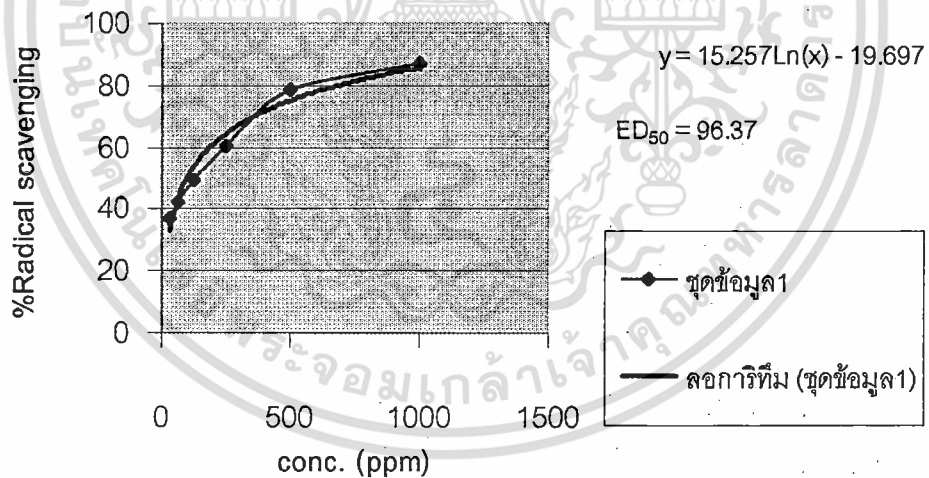
กราฟ 4-4 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 4

กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 5

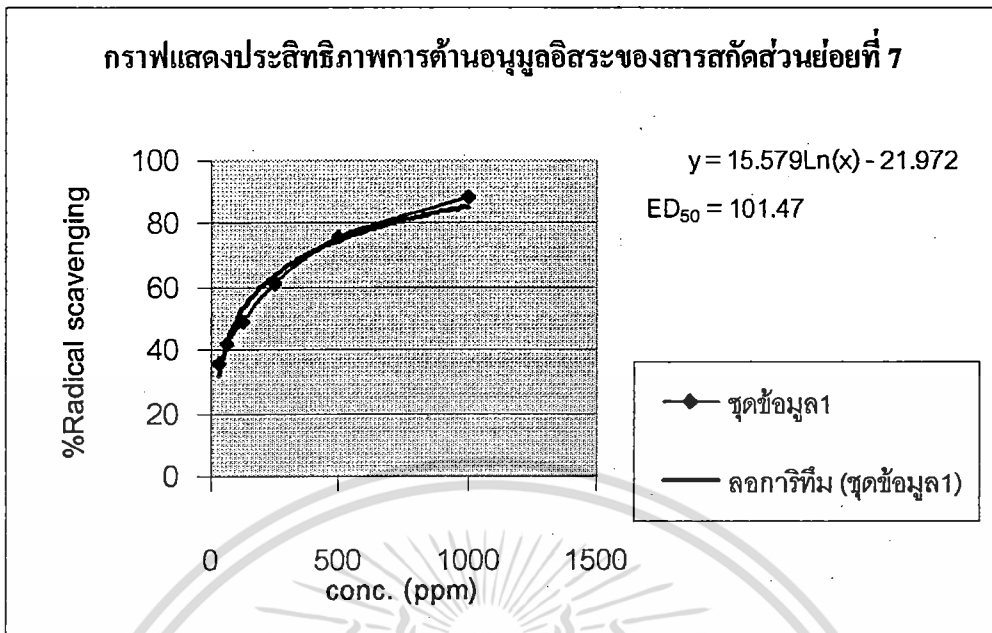


กราฟ 4-5 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 5

กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 6



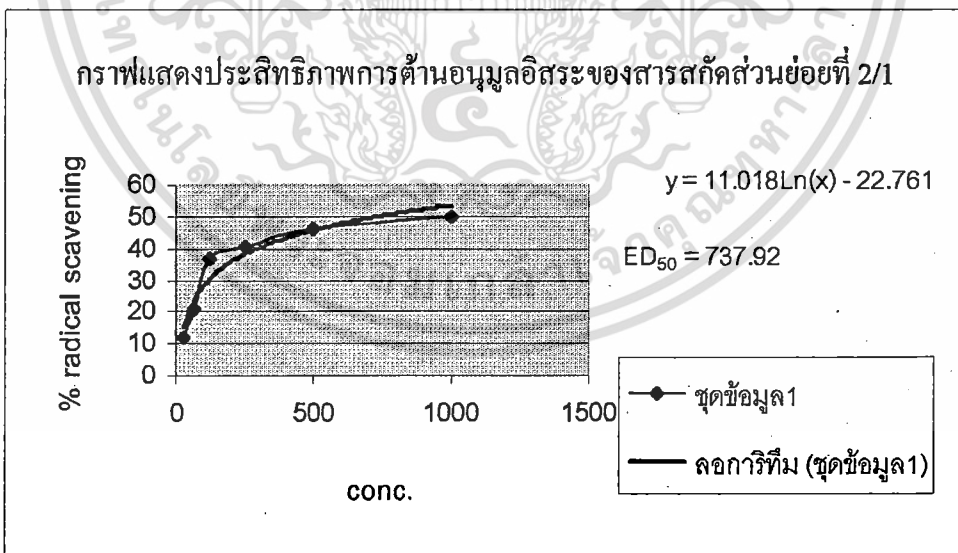
กราฟ 4-6 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 6



กราฟ 4-7 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 7

ภาคผนวกที่ 5

5.) กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนย่อยที่ 2



กราฟ 5-1 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/1