สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรธรรมชาติ

T033495

นายกฤษณ์ เรืองธรรม

นายปัญญาพล ขจรขรรคเพชร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2541

มพ.
ก ง๔๑ ก
2541

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 33495
วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study in the Chemical Constituents of the Natural Products

Mr.Krit Ruangtum

Mr.Panyapol Khajornkhanphet

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Degree of Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติ	
โดย	นาย กฤษณ์ เรืองธรรม	38054203
	นาย ปัญญาพล ขจรขรรคเพชร	38054230
ภาควิชา	เคมี	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์	
	ดร. พัชนี เจริญยิ่ง	

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(ผศ. นงนุช เภตรานุวัฒน์)
หัวหน้าภาควิชาเคมี
คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(รศ. ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ)
ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์)
กรรมการ

(อาจารย์ ปัทมา ลีพัหาวงศ์)
กรรมการ

(ดร. พัชนี เจริญยิ่ง)
กรรมการ

(ดร. ตะวัน สุขน้อย)
กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติ	
นักศึกษา	นาย กฤษณ์ เรืองธรรม	38054203
	นาย ปัญญาพล ขจรขรรคเพชร	38054230
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์	
	ดร. พัชนี เจริญยิ่ง	
ภาควิชา	เคมี	
ปีการศึกษา	2541	

บทคัดย่อ

ต้นชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) Leguminosae เป็นไม้ล้มลุกที่มีต้นกำเนิดที่ประเทศบราซิลมีการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีต่างๆ จากส่วนต่างของต้น เพื่อใช้ในทางการแพทย์ ได้มีการนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ เช่น โรคผิวหนังและเนื้องอกต่างๆ โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาส่วนเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศ(*Cassia alata*) Leguminosae เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคโดยเน้นการศึกษาโรคมาเลเรียและมะเร็ง การวิจัยนี้อาศัยเทคนิคพื้นฐานทางเคมีอินทรีย์ เช่น วิธีทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟีและคอลัมน์โครมาโตรกราฟีถูกนำมาใช้ในการสกัดแยกสารจากต้นชุมเห็ดเทศและนำสารบริสุทธิที่แยกได้ไปศึกษาหาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี

จากการวิจัยพบว่าสารที่สกัดจากเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศในชั้นคลอโรฟอร์มและเมทานอลมีฤทธิ์ต้านมาเลเรีย โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการหาส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญของเปลือกซึ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study in The Chemical Constituents of The Natural Products
Name	Mr. Krit Ruangtum 38054230
	Mr. Panyapol Khajornkhanphet 38054230
Special Project Advisor	Asst.Prof.Dr. Threerawat Mongkolausawarat
	Dr. Patchanee Charoenying
Department	Chemistry
Academic	1998

Abstract

In the part *Cassia alata* Leguminosae , one of the 189 Brazilian cassia species was found its pharmacological action. It has been reported to have many medicinal properties such as skin disease, antibacterial activity, antifungal activity and antitumor activity. In our research, we concentrated on the bark of *Cassia alata* Leguminosae. The seperation of the important compounds was carried out using simple technique in organic chemistry including columnchromatography and thin layer chromatography.

We found that the crude extract in chloroform and methanol layers showed antimalarial activity. Futhermore, the structure of pure compounds were studied structural by spectroscopy.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงการพิเศษนี้ สำเร็จและลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากการได้รับการดูแลเอาใจใส่ ช่วยเหลือ แนะนำ การอำนวยความสะดวกและสิ่งที่เป็นประโยชน์ ของคณาจารย์และผู้เกี่ยวข้องแก่ผู้จัดทำ ตลอดจนการตรวจทานและแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ สำหรับคำแนะนำและการให้ความช่วยเหลือทางด้านการทดลอง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ สำหรับคำแนะนำ ความเอาใจใส่ด้านการทดลองและการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. พัชนี เจริญยิ่ง คอยเอาใจใส่ในโครงงานพิเศษนี้เป็นอย่างมาก ให้ความช่วยเหลือ ทั้งด้านการทดลอง ตลอดจน เอกสารที่จำเป็นสำหรับโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ ดร. ตะวัน สุขน้อย และอาจารย์ ปัทมา ลีฟหวงศ์ คณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษที่ทำให้โครงงานพิเศษนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณรัชดา จันทร์เพ็ญ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านการทดสอบทางด้านเภสัชวินิจฉัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ประเสริฐ พัฒนาประทีป ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำ FTIR

ขอขอบพระคุณ คุณกนกพร สุพช์ เจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือและแนะนำในการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ขอบคุณเพื่อนๆสำหรับความรู้สึกดีที่มีให้ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ

นอกจากนี้บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือที่มีได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

นาย กฤษณ์ เรืองธรรม

นาย ปัญญาพล ขจรขรรคเพชร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ซ
อักษรย่อ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการพื้นฐานการพัฒนายาจากสมุนไพร	
2.1 ส่วนของพืชที่ใช้ทำยา	2
2.2 ยาเตรียมจากสมุนไพร	5
2.3 องค์ประกอบของสมุนไพร	7
2.4 เหตุที่ต้องสกัดเอาองค์ประกอบสำคัญออกจากสมุนไพร	9
2.5 การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร	9
2.6 การเลือกใช้ตัวทำละลาย	12
2.7 การทำสารสกัดให้เข้มข้น	12
2.8 การแยกส่วนผสม	13
2.9 การตรวจสอบเอกลักษณ์	14
2.10 ชุมเห็ดเทศ(*Cassia alata Leguminosae*)	16
2.11 การทบทวนเอกสารอ้างอิง	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ 18

3.2 ขั้นตอนการวิจัย 20

3.3 วิธีการทดลอง 21

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการวิจารณ์

4.1 ศึกษาหา Solvent System ที่เหมาะสม
ในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆเพื่อนำไปใช้ใน
การแยกสารด้วยวิธี Column Chromatrography 24

4.2 ผลการทดสอบทางเภสัชวิทยา 26

4.3 ผลการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆด้วยวิธี column chromatography 26

4.4 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังชั่นและโครงสร้างของสารด้วย
เทคนิค IR และ NMR 29

บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินงานวิจัยแนะข้อเสนอแนะ

5.1สรุปผลการดำเนินงานวิจัย 48

5.2 ข้อเสนอแนะ 49

เอกสารอ้างอิง 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่2.1	ตัวอย่าง IR spectrum สำหรับสารธรรมชาติ	16
ตารางที่4.1	Solvent system ที่เหมาะสมของ Crude extract ในชั้นต่างๆ	24
ตารางที่4.2	ผลการเรืองแสงต่อ UV	24
ตารางที่4.3	ผลการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียของเปลือกต้นชุมเห็ดเทศ	26
ตารางที่4.4	แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการ แยกcrude extract ชั้น hexane ด้วย column chromatography	27
ตารางที่4.5	แสดง solvent system ที่ใช้ในชั้น hexane	27
ตารางที่4.6	แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จาก Crude extract ในชั้น hexane	28
ตารางที่4.7	แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการแยก Crude extract ในชั้น chloroformด้วย column chromatography	28
ตารางที่4.8	แสดง solvent system ที่ใช้ในการเก็บสารในแต่ละหลอดของการแยก Crude extract ในชั้น chloroform	28
ตารางที่4.9	แสดง solvent system ที่ใช้ในชั้น chloroform	29
ตารางที่4.10	แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จาก Crude extract ในชั้น chloroform	29
ตารางที่4.11	แสดงรหัสของสารที่แยกออกจาก Crude extract ในชั้นต่างๆด้วย column chromatography	30
ตารางที่4.12	แสดงค่า νmax ที่น่าสนใจจาก IR spectrumและหมู่ฟังชั่นนัลที่คาดว่าจะเป็นของ Ca(B)/1/hexane	30
ตารางที่4.13	แสดงค่า νmax ที่น่าสนใจจาก IR spectrumและหมู่ฟังชั่นนัลที่คาดว่าจะเป็นของ Ca(B)/3/chloroform	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ตารางที่4.14 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrumและหมู่ฟังชั่นนัล
. ที่คาดว่าจะเป็นของ Ca(B)/3/chloroform 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 แสดงรูปแบบการเตรียมยาและสารสกัดจากสมุนไพรสดและแห้ง	5
ภาพที่ 2.2 Percolator	9
ภาพที่ 2.3 Soxhlet apparatusของ extract ในชั้นต่างๆ	10
ภาพที่ 2.4 Rotary evaporator	13
ภาพที่ 4.1 รูปแสดงผลการแยกcrude ด้วย TLC โดยผ่านการย้อมสีด้วย developing solvent	25
ภาพที่ 4.2 IR spectrum ของ Ca(B)/1/hex	32
ภาพที่ 4.3 ^{1}H NMR ของ Ca(B)/1/hex	33
ภาพที่ 4.4 ^{13}C NMR ของ Ca(B)/1/hex	34
ภาพที่ 4.5 DEPT ^{13}C NMR ของ Ca(B)/1/hex	35
ภาพที่ 4.6 IR spectrum ของ Ca(B)/2/chloroform	38
ภาพที่ 4.7 ^{1}H NMR ของ Ca(B)/2/chloroform	39
ภาพที่ 4.8 ^{13}C NMR ของ Ca(B)/2/chloroform	40
ภาพที่ 4.9 DEPT ^{13}C NMR ของ Ca(B)/2/chloroform	41
ภาพที่ 4.10 IR spectrum ของ Ca(B)/3/chloroform	44
ภาพที่ 4.11 ^{1}H NMR ของ Ca(B)/3/chloroform	45
ภาพที่ 4.12 ^{13}C NMR ของ Ca(B)/3/chloroform	46
ภาพที่ 4.13 DEPT ^{13}C NMRของ Ca(B)/3/chloroform	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อ

B	Bark
Ca	Cassia alata Leguminosae
$CDCl_3$	Deuterochloroform
$CHCl_3$	Chloroform
DMSO	Dimethyl sulfoxide
H	Hexane
IR	Infrared
MeOH	Methanol
NMR	Nuclear magnetic resonance
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Tetramethysilane
UV	Ultra violet

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญที่มาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสร้างประโยชน์มากมาย โดยอย่างยิ่งสมุนไพรต่าง ๆ มาใช้นั้น โดยเราทำการวิจัยพวกสมุนไพรต่าง ๆ ซึ่งพบว่า ต้นชุมเห็ดเทศนั้นเป็นสมุนไพรไทยประเภทหนึ่ง ซึ่งมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้ ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงศึกษาส่วนที่เป็นส่วนที่เป็นเปลือกนอก โดยนำเทคนิคทางด้านเคมีอินทรีย์มาประยุกต์ใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงานวิจัย

1) ศึกษาวิธีการแยกสารประกอบจากต้นชุมเห็ดเทศ
2) ศึกษาการหาโครงสร้างของสารส่วนประกอบเคมีของต้นชุมเห็ดเทศ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการหาส่วนประกอบทางเคมีในสมุนไพรธรรมชาติที่มีผลในการรักษาโรค โดยสมุนไพรที่ทำการศึกษาคือ เปลือกของต้นชุมเห็ดเทศ โดยข้อมูลที่ได้จะนำไปศึกษาและเปรียบเทียบกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคนั้นทางเภสัชวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ว่าสารที่แยกจากต้นชุมเห็ดเทศ ผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ ถ้าผลการตรวจสอบทางเภสัชวินิจฉัยได้เช่นเดียวกับสารที่สกัดได้จากสมุนไพรประเภทอื่นที่พิสูจน์แล้วว่ารักษาโรคได้ จะนำไปสู่การศึกษารายละเอียดต่อไป

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงวิธีการเตรียมและการเก็บรักษา สมุนไพรธรรมชาติที่จะใช้ในการวิจัย
2) ทราบถึงวิธีการสกัด เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร
3) ทราบถึงวิธีการหาระบบของสารละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบสารสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพรธรรมชาติ
4) ทราบถึงวิธีการแยกสารสำคัญและการเก็บรักษา เพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญ
5) ทราบถึงวิธีการวิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญในสมุนไพรธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2
ทฤษฎีและหลักการ
พื้นฐานการพัฒนายาจากสมุนไพร

การพัฒนายาจากสมุนไพรจำเป็นต้องมีพื้นฐานความรู้ด้านพฤกษศาสตร์ และเภสัชวินิจฉัยอย่างดี สมุนไพรใช้เป็นยาได้โดยตรง และยังเป็นวัตถุดิบในการผลิตยาสำเร็จรูปได้อีกด้วย คำว่าสมุนไพร (crude drug) โดยทั่วไปหมายถึง ยาจากพืช หรือสัตว์ ที่ผ่านมาขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและอยู่ในสภาพแห้งแล้ว ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะยาจากพืชที่ใช้ทางแพทย์ จากการสำรวจใบสั่งยาในสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1983 พบว่า มียาที่ประกอบด้วยพืชสมุนไพรร้อยละ 25 ส่วนยาจากสัตว์มีเพียงร้อยละ 2.7 เท่านั้น

สมุนไพรมักไม่ถูกนำมาใช้เป็นยาโดยตรง เพราะไม่สะดวก แต่จะใช้องค์ประกอบในสมุนไพรซึ่งแยกออกมาด้วยวิธีการต่าง ๆ สารสกัดที่ได้ ไม่ว่าจะประกอบด้วยสารเพียงตัวเดียว หรือเป็นสารผสม ก็คือองค์ประกอบสำคัญของยานั้น ๆ อาจนำสารสกัดไปบริโภคเป็นยาได้เลย เช่น baldrian tincture หรือนำไปประกอบเป็นยาสำเร็จรูปที่กินง่ายขึ้นก็ได้ เช่น baldrian tablets

2.1 ส่วนของพืชที่ใช้ทำยา

พืชที่ใช้เป็นยา อาจเก็บมาในลักษณะสดหรือแห้ง ถ้าองค์ประกอบไม่คงตัวเมื่อนำไปทำให้แห้ง พืชนั้นจะถูกใช้ในสภาพสด ๆ เช่น น้ำนมจากต้น *Chelidonium majus* ใช้เป็นยากลางบ้านสำหรับกัดหูด หากทำให้แห้ง จะขาดคุณสมบัติทันที ใบของต้น *Catha edulcis* ต้องใช้สดๆ เพราะมีสารกระตุ้นประสาททำให้ตื่น สารนี้ไม่คงตัว

พืชที่มีองค์ประกอบคงตัวดี ควรเก็บรักษาในสภาพแห้งจนกว่าจะใช้ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเน่าเสีย ยับยั้งเชื้อราและปฏิกิริยาย่อยสลายเพราะถูกเอ็นไซม์ แต่ต้องคำนึงถึงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีดังต่อไปนี้

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเองขณะทำให้แห้งและขณะเก็บรักษา

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการเตรียมเป็นยาสำเร็จรูป

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นขณะเก็บยาสำเร็จรูปไว้เพื่อตรวจความคงตัว และรอจำหน่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาต่าง ๆ ดังกล่าว มีผู้ทำการวิจัยน้อยมาก เนื่องจากปัจจุบันยาจากพืชยังไม่มีกฎระเบียบการควบคุมที่รัดกุม

การนำพืชในสภาพแห้งแล้วมาทำเป็นยา โดยหลักการแล้ว จะไม่ใช้ทั้งต้น (รากและส่วนที่อยู่เหนือดิน) แต่จะใช้ส่วนใดส่วนหนึ่ง ได้แก่

2.1.1 **ราก** (Root)

หมายถึง**รากแก้วใหญ่** รากบางชนิดประกอบด้วยรากและลำต้นใต้ดินซึ่งอาจเป็นเหง้าที่ถูกเก็บเกี่ยวมาพร้อมกับราก หรือเป็นเหง้าที่ค่อย ๆ เจริญเป็นราก เช่น รากเจ็นเชี่ยน

2.1.2 **เหง้า** (Rhizome)

เหง้าเป็นส่วนของพืชที่เก็บไว้ได้นาน เป็นลำต้นใต้ดินขนาดใหญ่ บางครั้งจะเจริญออกด้ายข้างด้วย ด้านที่เจริญลงใต้ดินจะกลายเป็นราก ด้านตรงข้าม จะแตกหน่อทุกปี และหลังจากผลสุกจะหลุดร่วงไป ร่องรอยของใบและตาแสดงว่าเป็นเหง้า เหง้าที่ใช้ทางยา ได้แก่ เหง้าขิง เหง้าขมิ้น ฯลฯ

2.1.3 **รากหัว** (Tuber)

หัวหมายถึง ส่วนที่ใช้สะสมอาหาร รากหัวคือส่วนสะสมอาหารที่เปลี่ยนแปลงมาจากรากฝอย ตัวอย่างเช่น aconite tuber

2.1.4 **หัว**

หัวคือส่วนที่เปลี่ยนแปลงมาจากลำต้นใต้ดิน มีใบเกล็ด (scale leaf) ลักษณะเป็นใบอวบสำหรับสะสมอาหาร หัวสมุนไพรบางครั้งก็เป็นเพียงกาบใบชั้นในแห้ง ๆ ตัวอย่างได้แก่ scillae bulbus (sea onion)

2.1.5 **ใบ** (leaf)

ใบหมายถึงส่วนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ฐานใบซึ่งมี **หูใบ** (stipule) หรือ**ใบหุ้ม** (ochrea)

ก้านใบ (peticle)

แผ่นใบ (lamina)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างเช่นใบมะขามแขกใบ *Atropa belladonna*

2.1.6 **ดอก** (flower)

ดอกหมายถึง ดอกเดี่ยว หรือดอกช่อ ดอกสมบูรณ์ ประกอบด้วย กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรตัวผู้ เกสรตัวเมีย ส่วนที่นำมาใช้ อาจเป็นดอกตูม ซึ่งรวมทั้งกลีบเลี้ยงและใบอ่อน เช่นดอกลาแวนเดอร์

2.1.7 **ผล** (fruit)

ผลหรือลูก คือส่วนที่หุ้มเมล็ดมีประโยชน์สำหรับทำพันธุ์ ผลบางชนิดไม่มีเมล็ดเช่น กล้วย สับปะรด ผลมีหลายแบบ ได้แก่ ผลเดี่ยว ผลรวม ผลที่มีเมล็ด และผลที่ไร้เมล็ด ผลโดยทั่วไปมักเป็นผลเดี่ยว เจริญมาจากรังไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์ ผนังรังไข่เจริญเป็นเปลือกผล ซึ่งแบ่งออกเป็นชั้นนอก ชั้นกลาง และชั้นใน ผลเดี่ยวแบ่งออกเป็นผลที่แก่แล้วแตกได้เอง และผลที่แก่แล้วไม่แตกออกเอง ผลชนิดนี้มักจะมีอยู่เพียง 1-2 เมล็ด

ลูกสมุนไพรที่แตกออกได้เองเมื่อแก่ ได้แก่ ฝักมะขามแขก ฝักวานิลลา ลูกฝิ่น ลูกกระวาน เป็นต้น ลูกสมุนไพรที่ไม่แตกออกเอง ได้แก่ พริก ทานตะวัน เกาลัด ฯลฯ

2.1.8 **เมล็ด** (seed)

เมล็ดเจริญมาจากไข่ที่รับการผสมพันธุ์ ประกอบด้วยตัวอ่อน อาหารเลี้ยงและเปลือกหุ้มเมล็ด เมล็ดหนึ่ง ๆ จะให้ต้นอ่อนหนึ่งต้น ในทางเภสัช ฯ เมล็ดอาจหมายถึงผลแตก เช่นแคปซูล ตัวอย่างเช่นเมล็ดฝ้าย เมล็ดละหุ่ง หรือหมายถึงผลแบบ legume เช่น calaber seed บางครั้งเมล็ดอาจจะไม่รวมเปลือกที่หุ้มด้วย เช่น cola seed ที่ขายกันในท้องตลาดจะไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ด

2.1.9 **เปลือกไม้** (cortex, bark)

เปลือกไม้หมายถึง เนื้อเยื่อรอบนอกของพืชยืนต้นอาจมาจากส่วนของลำต้นหรือรากที่อยู่นอกวงแคมเบี้ยม เนื้อเยื่อที่อยู่ภายในวงแคมเบี้ยม คือ เนื้อไม้ ตัวอย่างเช่น เปลือกซิงโคน่า

2.1.10 **เนื้อไม้** (wood)

เนื้อไม้หมายถึง เนื้อเยื่อภายในแคมเบี้ยม จากส่วนรากหรือลำต้นของพืชแก่หรือไม้พุ่ม ตัวอย่างเนื้อไม้ที่ใช้ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Guaicum sanctum L.

Guaicum officinale L.

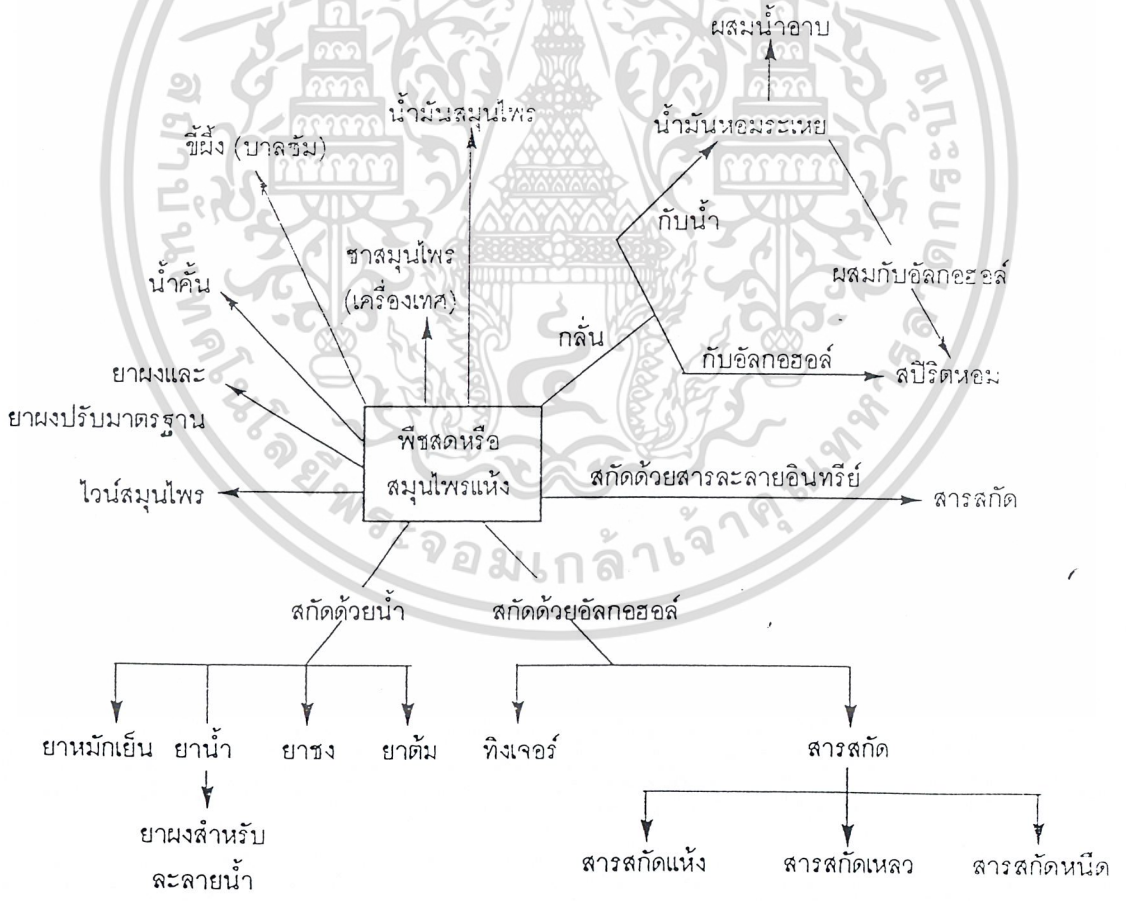
Santalum album (sandalwood)

2.1.11 พืช(ล้มลุก) ทั้งต้น(herb)

พืช(ล้มลุก)ทั้งต้น หมายถึงส่วนที่อยู่เหนือดอนทั้งหมด โดยหลักการแล้ว จะเก็บเกี่ยวในฤดูกาลออกดอก ตัวอย่างเช่น *Astermisia absinthiam* L. ประกอบด้วยใบและกิ่งก้านส่วนยอด

2.2 ยาเตรียมจากพืชสมุนไพร

ยาเตรียมจากสมุนไพร อาจทำจากพืชสดหรือสมุนไพรที่เก็บรักษาในสภาพแห้ง โดยอาจเตรียมเป็นรูปแบบต่าง ๆ (รูปที่ 2.1) ด้วยการสกัด คั้น ดอง หรือกลั่น ฯลฯ



รูปที่ 2.1 แสดงรูปแบบการเตรียมยาและสารสกัดจากพืชสดและสมุนไพรแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 **ยาเตรียมจากพืชสด**

พืชสดอาจเตรียมเป็นน้ำคั้น หรือยาดองเหล้า (homeopathic tincture)

น้ำคั้น อาจเตรียมโดยนำพืชสด ๆ มาหมักกับน้ำบีบคั้นเอาแต่น้ำไว้ นำไปต้มฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิสูงชั่วระยะสั้น ๆ น้ำคั้นก็จะเก็บไว้ได้นาน น้ำคั้นมักจะทำมาจากพืชที่องค์ประกอบมีฤทธิ์ไม่แรง

ยาดองเหล้า ยาดองเหล้าที่ทำจากพืชสด อาจเตรียมโดยหั่นพืชสดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และหมักกับแอลกอฮอล์ 90 % ใช้จำนวนเท่ากันโดยน้ำหนัก หมักดองไว้ระยะหนึ่งแล้วจึงบีบคั้นเอาแต่น้ำไว้ พืชสดที่นำเข้าจากต่างประเทศ บางชนิดหายาก อาจใช้พืชแห้งแทน

2.2.2 **ยาเตรียมจากสมุนไพรแห้ง**

ยาเตรียมจากสมุนไพรแห้ง อาจแบ่งออกเป็นสามหมวดได้แก่ หมวดยาน้ำ หมวดยาดอง และหมวดยาผงสำหรับละลายน้ำ

ยาน้ำ คือยาที่เตรียมจากสมุนไพรโดยใช้น้ำเป็นตัวสกัด การเตรียมยาน้ำสมุนไพรดังกล่าวนี้นิยมเตรียมด้วยวิธี ต้ม ชง หรือ หมัก

ยาต้ม มักจะทำจากสมุนไพรที่องค์ประกอบทนความร้อนได้ดีโดยไม่สลายตัว ส่วนที่นำมาต้มได้แก่ เนื้อไม้ เปลือกไม้ เมล็ดและ ผล

ยาชง มักทำจาสมุนไพรที่ทนความร้อนสูงจากการต้มไม่ได้ ตัวอย่างเช่นสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบ เป็นต้น โปรดสังเกตว่าจะไม่นิยมเตรียมยาชงโดยใช้น้ำเย็น เพราะเสี่ยงต่อการมีเชื้อขึ้น แต่จะใช้น้ำร้อนและชงอย่างรวดเร็ว

ยาหมัก มักจะทำจากสมุนไพรทีองค์ประกอบมีลักษณะเป็นเมือก หากนำไปชงจะทำให้เครื่องชงอุดตัน น้ำยาระบายออกไม่ได้ กรองก็ไม่ได้ด้วย

ยาดอง คือยาที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ สิ่งสกัดที่ได้อาจอยู่ในรูปเหลว นิ่ม หรือผงแห้ง เตรียมโดยวิธี หมัก ชง หรือ กลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาผงสำหรับละลายน้ำ

ยาสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำ หรือด้วยแอลกอฮอล์ ถ้าไม่ใช้ในรูปเหลว อาจนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี พ่นแล้วอบแห้ง แช่แข็งและระเหิดแห้ง หรืออบให้แห้งภายใต้สูญญากาศ ผงยาที่ได้จะละลายน้ำหมด โดยไม่มีกาก ใช้ง่ายและสะดวกในการพกติดตัว

2.3 องค์ประกอบของพืชสมุนไพร

สมุนไพรแต่ละชนิดประกอบด้วยสารกลุ่มต่าง ๆ จำนวนมา เมล็ดโกโก้ เป็นต้น เมื่อผึ่งลมให้แห้ง จะพบว่ามีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

ไลปิด	54.0 %
คาเฟอีน	0.2 %
ทีโอโบรมีน	1.2 %
โปลีไฮดร็อกซีฟีนอล	6.0 %
กรดอะมิโนและโปรตีน	11.5 %
น้ำตาล	1.0 %
แป้ง	6.0 %
เพนโตเซน	1.5 %
เซลลูโลส	9.0 %
กรดอินทรีย์	1.5 %
สารอื่น ๆ	0.5 %
สารแร่	2.6 %

ในกลุ่มสารหนึ่ง ๆ อาจมีสารที่มีคุณสมบัติต่างกันได้ เช่น กรดอินทรีย์ในเมล็ดโกโก้ มีทั้งกรดที่ระเหยได้ เช่นกรดน้ำส้ม และกรดที่ไม่ระเหย เช่นกรดมะนาว

การสกัดองค์ประกอบออกจากพืชโดยใช้น้ำสกัดยาในทางปฏิบัติไม่อาจสกัดออกมาได้หมดทุกตัว สารที่สกัดได้ทั้งหมด(total extractives) ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

องค์ประกอบสำคัญ

องค์ประกอบร่วมที่มีประโยชน์

องค์ประกอบร่วมที่ไร้ประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กาก (marc) ที่เหลือจากสกัด ประกอบด้วยเซลลูโลส โฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพคติน นอกจากนี้ยังมีเส้นใยหยาบ และโพลีเมอร์ขนาดใหญ่

องค์ประกอบสำคัญของพืชแต่ละชนิดมี **คุณลักษณะทางเคมีที่ใช้จำแนกพืช** (chemotaxonomic character) การตรวจสอบเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ ของสมุนไพรจะตรวจสอบเฉพาะสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญเท่านั้น

วิธีการแยกสารสำคัญให้บริสุทธิ์ ได้แก่วิธีทางเคมีที่ใช้กันทั่วไป เช่น การตกผลึก การสกัด กระบวนการแบ่งภาค และโครมาโตกราฟฟี่ เป็นต้น สารใดที่ยังไม่รู้คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ จะถูกนำมาตรวจสอบทางเภสัชวิทยาก็ไม่อาจจะเทียบเป็นนผลการรักษาในคนได้เสมอไป การพัฒนาเอาสารสำคัญจะพืชออกมาใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องพึ่งความก้าวหน้าทางด้านเคมีและเภสัชวิทยา โดยการตรวจสอบความเป็นพิษในเบื้องต้น ซึ่งกระทำได้ค่อนข้างง่ายในสัตว์ทดลองและมักจะพบว่าสารที่แสดงพิษคือสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ จากความจริงที่ว่าการแสดงฤทธิ์ได้มากมาย เช่นอัลคาลอยด์ โดยไม่ต้องอาศัยผลการทดลองในสัตว์เลย ใช้แต่วิธีทางพฤกษเคมี ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบเอนทราควิโนน ในสมุนไพรที่ใช้เป็นยาระบายหรือ การตรวจสอบสารคาร์ลิโนไลด์ ในสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ต่อหัวใจ ยังมีสารแสดงฤทธิ์เฉพาะอีกมายที่เรายังไม่รู้จัก ทั้งนี้เพราะ

1) ยังขาดการตรวจสอบทางเภสัชวิทยาที่เหมาะสมต่อการแยกสาร
2) สารแสดงฤทธิ์เฉพาะขาดความคงตัว และถูกทำลายระหว่างการสกัด
3) สมุนไพรที่ทดสอบ ไม่แสดงคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา แต่มีสรรพคุณเป็นที่กล่าวขานกัน

2.4 เหตุที่ต้องสกัดเอาองค์ประกอบสำคัญออกจากพืชสมุนไพร เนื่องจาก

1) องค์ประกอบสำคัญในสมุนไพร มีปริมาณไม่สม่ำเสมอ การนำมาใช้โดยตรงไม่สามารถกำหนดขนาดได้แม่นยำ
2) ในสมุนไพรนอกจากจะมีสารออกฤทธิ์แล้วยังมีสารที่ไม่แสดงฤทธิ์ปะปนอยู่ด้วยจำนวนมาก ทำให้ต้องใช้ยาขนาดสูง
3) องค์ประกอบสำคัญไม่ถูกดูดซึมผ่านลำไส้ได้สมบูรณ์ อาจถูกทำลายหมดไปก่อน จึงต้องสกัดแยกเอาออกมาพัฒนาเป็นยาที่ใช้ทางระบบอื่น เช่น ทา หรือ ฉีด
4) การแยกสารสำคัญออกมาในรูปบริสุทธิ์ เป็นสิ่งจำเป็นต่อการศึกษาสูตรโครงสร้าง การสังเคราะห์ยา เพื่อให้ได้สารที่มีคุณภาพ ราคาต่ำ เช่น คอร์ติโซน ยาชาเฉพาะที่ เป็นต้น
5) การศึกษาสารแสดงฤทธิ์เฉพาะอย่างจริงจัง มักจะนำไปสู่การค้นพบยาใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

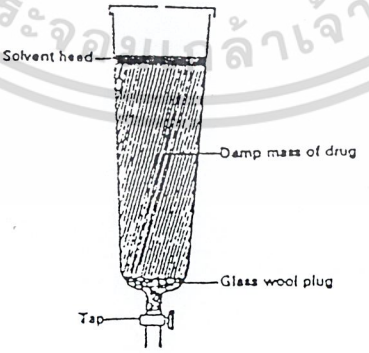
2.5 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่

2.5.1 Maceration เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่นขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc) ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่นำไปกรอง การสกัดถ้าจะสกัดให้หมดจด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายครั้ง ๆ วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.5.2 Percolation เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อย ๆบรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 0.5 ซม. ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

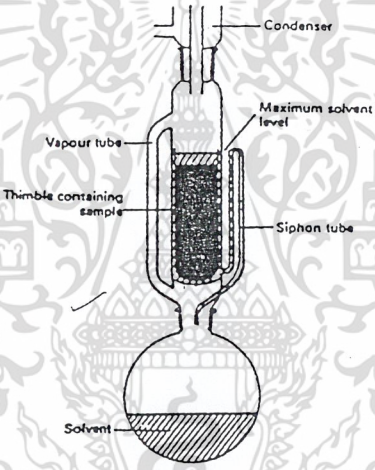
เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารในขั้นอุตสาหกรรม ใช้ percolator ต่อกันหลายตัว เรียกว่า Countercurrent –operated percolator battery และมีการดัดแปลงวิธีการสกัดให้มีการเคลื่อนที่ของสารที่จะสกัด และตัวทำละลายเข้าหากัน เรียกว่า Counter current extraction



รูปที่ 2.2 Percolator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 **การสกัดด้วย** Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไป และกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปใน flask ด้วยวิธีการกาลักน้ำ flask นี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ใน flask ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว



รูปที่ 2.3 Soxhlet apparatus

2.5.4 Liquid – liquid Extraction เป็นสารสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายชนิดแรกแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

2.5.4.1 Extractant lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

2.5.4.2 Raffinate lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5 **การสกัดสารน้ำมันหอมระเหย** (Extraction of volatile oil)

1.Resorption เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีดูดซับ โดยมากใช้สกัดกลีบดอก ซึ่งอาจทำได้โดย

-Resorption เป็นวิธีการดูดซับ โดยเรียงกลีบดอกลงไปบนแผ่นแก้ว เมื่อน้ำมันหอมระเหยถูกดูดซับแล้วให้รีบเปลี่ยนกลีบดอก แล้วจึงนำขี้ผึ้งไปสกัดน้ำมันหอมระเหยอีกครั้งหนึ่ง

-นำกลีบดอกไปต้มกับไขมันที่อุณหภูมิต่ำ ๆ แล้วกรองเอากลีบดอกออก นำไขมันไปสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

-ผ่านอากาศซึ่งอุ่นเข้าไปพร้อมกับละอองของไขมันเหนือกลีบดอกเพื่อดูดซับน้ำมันหอมระเหยไว้

2.Solvent Extraction เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหย โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น สกัดน้ำมันกานพลูโดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์

3.Mechanical Expression เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีบีบ เช่น นำเปลือกผลส้มไปบีบจะได้ water-in-oil emulsion ซึ่งแยกน้ำมันหอมระเหยออก โดยวิธี centrifugation

4.Steam Distillation เป็นการกลั่นโดยใช้ไอน้ำ โดยผ่านไอน้ำไปบนสมุนไพร ซึ่งบรรจุไว้ใน flask พร้อมกับน้ำ ไอน้ำจะพาเอาน้ำมันหอมระเหยไปยัง condenser แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลว เมื่อทิ้งไว้น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำ

5.Water distillation เป็นวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรโดยต้มกับน้ำ เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหยระเหยขึ้นไปถึง condenser จะกลั่นตัว แล้วจึงนำของเหลวที่ได้ไปแยกน้ำมันหอมระเหยจากชั้นน้ำ เครื่องมือที่ใช้คือ Clevineaur's apparatus ซึ่งมีชนิดสำหรับน้ำมันหอมระเหยซึ่งหนักกว่าน้ำ และสำหรับน้ำมันหอมระเหยที่เบากว่าน้ำ

2.5.6. Extraction by Thermomicrodistillation เป็นการสกัดสารโดยใช้เครื่องมือ Thermomicro Analysis and Separation Ovens (TAS oven) เป็นการสกัดสารขนาดน้อยมาก นำสารใส่ลงใน cartridge ซึ่งข้างหนึ่ง seal อีกข้างหนึ่งเป็น cappillaries เมื่อใส่เข้าใน oven ความร้อนจะทำให้สารระเหย หรือระเหิดออกมาทาง capillaries รองรับสารที่ระเหยหรือระเหิดออกมาด้วยแผ่น TLC แล้วนำไปตรวจสอบอีกทีหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การเลือกใช้ตัวทำละลาย

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติ

1. เป็นตัวทำละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ
2. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
3. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
4. ไม่เป็นพิษ
5. ราคาพอสมควร

2.7 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

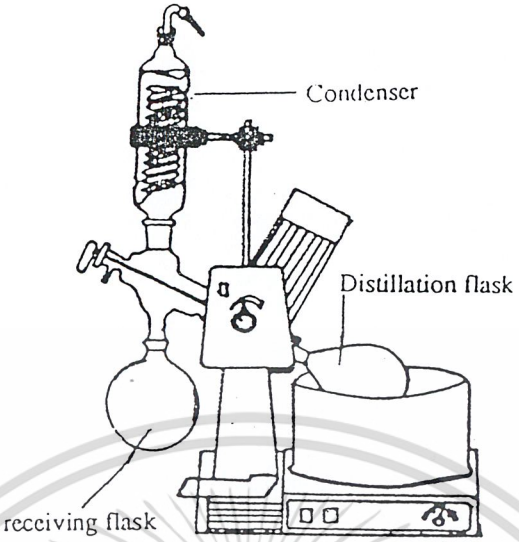
เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรสูงและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธีคือ

2.7.1. Free Evaporation คือการระเหยให้แห้ง โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือ hot plate บางครั้งอาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วย เพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

2.7.2 Distillation in vacuo เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสูญญากาศโดยใช้ vaccum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotaty evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ distillation flask , condenser และ receiving flask Distillation flask จะหมุนอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ เครื่องมือที่ดีจะต้องมีระบบการทำสูญญากาศที่ดี ระยะระหว่าง distillation flask และ condenser สั้น และมีระบบทำความเย็นของ condenser ที่ดี

2.7.3 **การแช่เข็ง** (Freezing) ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำใช้ lyophilzer หรือ freeze dryer แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งเราแยกจาก concentrated extract โดย centrifuge

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 Ratory Evaporator

2.7.4 Ultrafiltration เป็นการสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้ membrane ใช้กับสารที่ molecular weight สูงกว่า 5,000

2.8 การแยกส่วนผสม(Separation)

Thin - layer Chromatography (TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้ Stationary phase ซึ่งเป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว alumimium หรือ poylethylene เมื่อนำหยดสารผสมลงบน stationary phase แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ tank ซึ่งบรรจุ moblie phase ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบน stationary phase ซึ่งเรียกว่า Development ขณะที่เกิด development สารก็แยกออกจากกัน กลวิธีในการแยกจะมีทั้ง adsorption และ artition แต่จะมีกลวิธีใดมากกว่า ขึ้นกับว่าแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นนั้นถูกนำไป activate หรือไม่ การ activate แผ่น TLC โดยอบที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จะทำให้น้ำระเหยออกไปจาก particle ของ adsorbent กลวิธีจึงเป็น adsorption มากกว่า partition แต่ถ้าไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำ plate ไป activate น้ำที่จับอยู่ที่ partition จะทำหน้าที่เป็น liquid stationary phase จะมี partition mechanism เกิดมากกว่าเดิม น้ำที่เคลือบอยู่นี้มาจากความชื้นในอากาศนั่นเอง

TLC มีข้อดีกว่า paper chromatography (PC) หลายอย่างคือ

1. ใช้เวลาในการ develop น้อยกว่า
2. ไม่มี fiber ทำให้ band diffusion หรือ zone broading น้อยลง ทำให้การแยกสาร (separation) ดีขึ้น
3. ใช้กับน้ำยาที่มีฤทธิ์ กัดรุนแรงได้
4. ใช้ตัวอย่างน้อยกว่า จึงมีความไวในการตรวจสอบมากกว่า PC

การประยุกต์ใช้ TLC ในการศึกษาสารเคมีจากสมุนไพร

1) ใช้วิเคราะห์หาสารเบื้องต้นว่ามีกี่ชนิด และบางครั้งอาจบอกได้ว่าเป็นสาร ประเภทใด
2) ใช้เป็นวิธีวิเคราห์เบื้องต้นเพื่อหา Solvent System สำหรับ column chromatography
3) ใช้ตรวจสอบ fraction ที่ได้มาจาก Column chromatography เพื่อรวม fraction ที่เหมือนกัน
4) แยกสารบางชนิดที่มีปริมาณน้อย
5) ใช้แยกสารปริมาณซึ่งแยกโดยวิธี Column chromatography ไม่ได้ผล
6) ใช้หาสารปริมาณสารในการผสม

2.9 การตรวจสอบเอกลักษณ์

Spectroscopy เป็นวิธีหาสูตรโครงสร้างโดยอาศัยการวัดและวิเคราะห์รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า electromagnetic radiation) ซึ่งถูกสารดูดกลืน หรือเปล่ง ออกมาจากสาร โดยอาศัยเครื่องมือต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ให้กำเนิดรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า แยกวัดรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าออกเป็นช่วงความยาวคลื่นต่าง ๆกัน วัดการดูดกลืนรังสีโดยสสารในช่วงเหล่านี้ และบันทึกข้อมูลออกมาเป็นสเปคตรัม ซึ่งสารจากธรรมชาติแต่ละชนิดจะมีสเปคตรัม ซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัว การตรวจสอลเอกลักษณ์ของสารซึ่งมีผู้ศึกษาสูตรโครงสร้างแล้วอาจทำได้โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่รู้โครงสร้างแล้ว (authentic sample) หรือเปรียบเทียบจากสเปคตรัม ที่รายงานไว้ในเอกสารต่างๆ สำหรับสารใหม่ต้องอาศัยสเปคตรัม มาประกอบกันจึงสามารถบอกสูตรโครงสร้างได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.1 Infrared Spectroscopy

เป็นการวัดพลังงานที่เกิดจากการสั่นของโมเลกุล bond หรือ หมู่ฟังก์ชั่นนัล ที่วัดมีความถี่ 4,000 – 677 cm^{-1} หรือช่วงคลื่น 2.5 – 15 nm เราใช้ ตำแหน่งของสเปคตรัม และความเข้มข้นของ peak ว่ามาก น้อยหรือปานกลางเทียบกับสเปคตรัม ของสารที่รู้สูตรโครงสร้าง จาก IR spectrum จะช่วยบอก หมู่ฟังก์ชั่นนัล และประเภทของสารได้ บริเวณเหนือ 1,200 cm^{-1} เป็น band หรือ peak ที่เกิดจากการสั่นของ individual bonds หรือ หมู่ฟังก์ชั่นนัล เช่น อะโรมาติก พบที่ 3,050 (W-M), 2,100, 1,700 (W), 1,600 , 1,580, 1,500(W-M) ส่วนบริเวณที่ต่ำกว่า 1,200 cm^{-1} เป็น fingerprint region เกิดจากการสั่นของทั้งโมเลกุลเป็นสเปคตรัมที่ซับซ้อน

สารที่จะนำไปหา IR spectrum จะต้องเป็นสารที่บริสุทธิ์ อาจใช้สารละลาย 0.1- 5 % โดยมากใช้คลอโรฟอร์ม หรือใช้ของแข็งผสมกับ KBr แล้วอัดเป็นแผ่นใส หรือใช้ Nujal ทำเป็น suspension หรือ mull

2.9.2 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

เป็นสเปคตรัมที่ได้จากการวัด magnetic moment ของ H-atom เนื่องจา H-atom ที่ติดอยู่กับหมู่ฟังก์ชั่นนัล แต่ละอันจะมีค่า magnetic moment แตกต่างกัน เช่น CH_2, - CH_3 , -CHO, - NH_2 เป็นต้น จากสเปคตรัม ของ NMR เราจะได้ค่าของจำนวน H และชนิดของ carbon skeleton ที่ H จับอยู่ ตำแหน่งของสเปคตรัม ใช้ค่า δ (delta) หรือ T (tau)

$$T = 10\delta$$

ตัวทำละลายที่ใช้ละลายตัวอย่าง ได้แก่ CCl_4, deuterium chloroform ($CDCl_3$) , deuteruim oxide (D_2O), deuterium acetone (CD_3COCD_3) ส่วนสารที่มีขั้วใช้ trimethylsilyl ethers เป็นตัวทำละลาย

พวกสารที่เป็น saturated compound จะมีค่า δ น้อย ส่วนพวกที่มี unsaturation, O, N, S จะมีค่า δ สูง

Chemical shifts(δ) จะมีค่า = Δ_θ X 10% radio frequency, Δ_θ = difference in absorption frequency ของตัวอย่าง และ reference compound คือ TMS มีหน่วยเป็น Hertz หน่วยของ chemical shift ส่วนมากใช้ p.p.m

สเปคตรัม ของ NMR อาจจะซับซ้อนเนื่องจาก interaction กับอะตอม ข้างเคียง แทนที่จะได้ peak เดี่ยวอาจจะได้ 2 หรือ 3 หรือมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Class of compound	Approximate postitions of characteristic bands* 1200cm^{-1}
Alkanes	2940(S), 2860(M), 1455(S), 1380(M)
Alkanes	3050(W-M), 2850(W), 1650(W-M), 1410(W)
Aromatics	3050(W-M), 2100-1700(W), 1600, 1580, 1500(W-M)
Acetylenes	3310(M), 2225(W), 2150(W-M), 1300(W)
Alcohydes and Phenols	3610(W-M), 3600-2400(broad), 1410(M)
Aldehydes and Ketones	2750(W), 2680(W), 1820-1650(S), 1420(W-M)
Eaters and Lactones	1820-1680(S)
Carboxylic acids	3520(W), 3400-2500(broad, M), 1760(S), 1710(S)
Amines	3500(M), 3400(M), 3400-3100(variable) 1610(M)
Cyanides	2225(W-S)
Isocyanates	2270(VS)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของ IR สำหรับสารจากธรรมชาติ

2.10 ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*)Leguminosae

ชื่อท้องถิ่น : ชุมเห็ดใหญ่ ,ขี้คาก, ลับมืนหลวง, หมากกะลิงเทศ, ส้มเห็ด, จุมเห็ด และ ตะลีพอ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่มสูงประมาณ 1-5 เมตร มีแขนงมาก ใบเป็นใบประกอบมีใบย่อย 4-20 คู่ ก้านใบแข็งตั้งฉากกับกิ่ง ใบเรียงตัวเป็นคู่และเรียงตัวอยู่ในระนาบเดียวกัน รูปร่างของใบเป็นรูปไข่ขอบขนาน ปลายใบมน หรือมีรอยเว้าตอนปลายใบกว้าง 3-7 ซม. ยาว 5-15 ซม.ดอกออกเป็นช่อสีเหลืองใหญ่ ผลเป็นฝักแบนมีปีก 4 ปีก คล้ายถั่วพู ฝักอ่อนมีสีเขียว ฝักแก่สีดำและมีเมล็ดสีดำ ชุมเห็ดเทศปลูกโดยใช้เมล็ด ปลูกง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.11 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literature survey)

ในปี ค.ศ. 1990 ผู้ที่ทำการค้นคว้าคือ Dipti Guptac and co-workers โดยใช้ส่วนเมล็ดของ Cassia alata ซึ่งมีสารจำพวก flavonoids, anthraquinonesc , polysaccharides และ flavonoid glycosides

ในปี ค.ศ. 1992 ผู้ที่ทำการค้นคว้าคือ Hemlata and co-workers โดยศึกษาจากต้น Cassia alata Leguminosae พบสารจำพวก anthraquinone alatinone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33495

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1สารเคมี

1. Absolute Ethanol
2. Acetic Acid
3. Anisaldehyde
4. Butanol
5. Conc. Sulfuric Acid
6. Ethyl Acetate
7. Hexane
8. Magnesium Sulfate
9. Methanol
10. Silica Gel เบอร์ 7729 ของ MERCK
11. Silica Gel เบอร์ 7734 ของ MERCK
12. น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. TLC Tank
2. TLC Plate (Silica Gel on Aluminium)
3. คอลัมน์
4. Rotary Evaporator
5. Aspirator
6. Heater
7. ชุดปั๊ม
8. ขวดรูปชมพู่
9. ขวดก้นกลม
10. หลอดทดลอง
11. กระบอกตวง
12. ปิเปต
13. บีกเกอร์
14. Vial
15. หลอดทดลอง
16. แท่งแก้วคน
17. ช้อนตักสาร
18. กระดาษกรอง
19. กรวย
20. Aluminium Foil
21. แผ่นกระจก
22. Stand and Clamp
23. UV Spectrometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

1.เก็บตัวอย่างของพืชที่สนใจวิเคราะห์ ในที่นี้คือ เปลือกของต้นชุมเห็ดเทศนำมาตากแดดให้และแห้งบดจนละเอียด

2.นำส่วนทั้งสองนี้มาสกัดโดยวิธีการแช่ลงในตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ hexane, methanol และ chloroform เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3. กรองแยกส่วนที่เป็นกากและชั้นตัวทำละลาย จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator จะเรียกส่วนนี้ว่า crude extract

4.แบ่ง crude extract ส่งทดสอบฤทธิ์ทางยา คือ ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง และมาลาเรีย

5. การหา solvent system ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC)

6. การแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column Chromatography

7. การวิเคราะห์หาโครงสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียม Crude Extract ในแต่ละชั้นตัวทำละลายต่างๆ

1.นำเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศแห้งมาบดละเอียดหนัก 619.06 กรัมแช่ในชั้น hexane เป็นเวลา 1 สัปดาห์คนอย่างสม่ำเสมอทุกวัน วันละ 15 นาที

2. ค่อยๆรินกรองเอาสารสกัดออก บีบสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด

3. ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator วิธีนี้จะเป็นการระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำและลดความดันจนลงเกือบเป็นสูญญากาศ

4.ชั่งน้ำหนักของ crude extract ชั้น hexane โดยให้รหัสเป็น Ca(B)/Crude/Hexane ตามชนิดของตัวทำละลายได้น้ำหนัก 15.9526 กรัม

5.นำกากที่ได้จากการกรองในข้อ 2 มาผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ใน chloroform ซึ่งมีน้ำหนัก 600.89 กรัมและทำเหมือนในข้อ 1-4 จากนั้นนำกากที่ได้มาแช่ต่อใน methanol ซึ่งมีน้ำหนัก 595.21 กรัมจากนั้นก็ปฏิบัติเหมือนเดิม

6.กากที่แช่ใน Chloroform ใช้รหัสแทนว่า Ca(B)/Crude/chloroform ซึ่งมีน้ำหนัก 6.6254 กรัมและกากที่แช่ใน methanol ใช้รหัสแทนว่า Ca(B)/Crude/methanol ซึ่งมีน้ำหนัก 58.2721 กรัม

3.3.2 การหา Solvent System ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี Column Chromatograohy

1. ตัดแผ่น TLC Plate ขนาด 2x8 เซนติเมตร ทำการ spot crude ที่ละลายแล้ว ลงบนแผ่น TLC 2 จุด โดยแต่ละจุดมีความเข้มต่างกัน
2. เตรียม TLC tank โดยมีกระดาษกรองวางด้านใน tank และเตรียมกระจกไว้ปิด
3. ทดสอบอัตราส่วนของสารละลายที่ค่าต่างๆ โดยเริ่มจากสารละลายในอัตราส่วน 10:90 แล้วจึงลดหรือเพิ่มสารละลายชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับการแยกสารใน crude extract บนแผ่น TLC
4. จุ่มแผ่น TLCที่เตรียมได้ลง tank ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปถึงระดับ Solvent front ที่กำหนดไว้
5. ในกรณีที่สารเป็นทางยาวจะใช้ butanol หรือ acetic acid 2-3 หยด ผสมในสารละลายเพื่อช่วยในการแยกสารจากกันดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ผลการทดลองที่เกิดขึ้นว่าสารที่แยกได้เป็นอย่างไร ถ้าสารสามารถแยกเห็นเป็นจุดอย่างชัดเจนแสดงว่าอัตราส่วนที่ผสมใน TLC tank เป็น solvent system ที่เหมาะสม แต่ถ้ายังไม่พบต้องทำการเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของสารละลายเพื่อให้ได้ solvent System ที่เหมาะสม
7. นำแผ่น TLC ไปทดลองการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
8. นำแผ่น TLC ที่ได้ไปย้อมด้วย developing solvent โดยวางแผ่น TLC ไว้บนกระจก นำสำลีชุบ developing solvent ป้ายให้ทั่วแผ่น จากนั้นนำไปอุ่นบน hot plate ที่อุณหภูมิประมาณ 50 C จะสังเกตุเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของจุดที่เกิดขึ้น
9. ให้ Solvent System ที่หาได้ไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี Column Chromatography

3.3.3 **การแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆโดยวิธี Column Chromatography**

1. เตรียม Column โดยใช้ stand และ clamp จับ column ให้ตั้งฉากกับพื้น
2. ทำการ pack Column โดยใช้ Silica Gel เบอร์ 7734 หรือ Silica Gel เบอร์ 7729
3. silica gel จำนวน 60 กรัม ลงขวดรูปชมพู แล้วใช้สารละลายที่มีขั้วต่ำสุดใน Solvent System ผสมกับ silica gel ให้เข้ากัน
4. ใช้สำลีอุด Column โดยหยดสารละลายให้ชุ่มสำลี
5. เท Silica Gel ที่ผสมสารละลายแล้วลง Column แล้วปรับผิวหน้าของ silica gel ให้เรียบ โดยเคาะข้างๆ Column เบาๆ โดยไม่ให้มีรอยแตกหรือฟองอากาศอยู่
6. ป้องกันผิวของ silica gel ให้เรียบ โดยการใส่ Anhydrous $MgSO_4$ ลงColumn
7. เตรียม crude extract ในขวดก้นกลม ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายเล็กน้อยแล้วผสม silica gel เบอร์ 7734 คนให้เข้ากัน แล้วระเหยสารละลายออกไป จากนั้นใส่ crude extract ที่ผสมกับ silica gel ลง column โดยไม่ต้องทำการกลั้วขวดก้นกลม
8. ล้างข้าง column ให้สะอาด โดยให้เหลือสารละลายอยู่เหนือ crude extract ให้น้อยที่สุด
9. ใช้ solvent ที่มีขั้วน้อยที่สุด ประมาณ 100 มิลลิเมตร เป็นตัว eluent ก่อนแล้วค่อยๆเพิ่มขั้วของสารละลายอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง เพื่อให้สารที่ต้องการออกจาก column แล้วเก็บสารละลายที่ออกจาก column ด้วยหลอดประมาณครึ่งหลอดพร้อมจดหมายเลข ทำการตรวจสอบสารในแต่ละหลอดที่ออกจาก column ด้วย Thin layer chromatography (TLC) โดยเทียบกับ crude extract ถ้าสารที่ต้องการยังไม่ออกมา อาจต้องทำการเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้วของสารละลายที่เป็นตัว eluent และทำการตรวจสอบทุกหลอดด้วย UV และ developing solvent

10. เมื่อพบว่ามีสารที่ต้องการแยกออกมาแล้ว ทำการจดบันทึกว่าเริ่มแยกออกจากหลอดจากหลอดที่เท่าใดและจำนวนเท่าใด

11. รวมสารที่มีอยู่ในหลอดลงขวดก้นกลม แล้วทำการระเหยตัวทำละลายออก

เมื่อได้สารบริสุทธิ์ที่อยู่ในขวดก้นกลมชั่งน้ำหนักสารที่ได้ออกมา และเก็บในตู้เย็นเพื่อทำการตรวจสอบและวิเคราะห์โครงสร้างสาร

3.3.4 การระเหยตัวทำละลาย

1 ใส่สารที่ต้องการระเหยตัวทำละลายลงในขวดก้นกลมประมาณครึ่งขวด

2. นำไปติดตั้งกับเครื่องRotary Evaporator โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 30 – 40 C

3. เมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปแล้วในขวดก้นกลมจะเหลือแต่สารที่ต้องการ

3.3.5 การวิเคราะห์โครงสร้างสารที่แยกได้

วิเคราะโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี IR Spectroscopy เพื่อหาหมู่ฟังก์ชัน และใช้ NMR เพื่อหาโครงสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการวิจารณ์

4.1) ศึกษาหา Solvent System ที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี Column Chromatrography

4.1.1 การหา Solvent system ที่เหมาะสมของ Crude extract ในชั้นต่าง ๆ

พบว่า Solvent system ที่เหมาะสมคือ Solvent system ที่แยกสารเห็นเป็นจุดๆอย่างชัดเจน

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า Solvent system ที่เหมาะสมของ Crude extract ในชั้นต่างๆ

Crude extract	Solvent system
ชั้น hexane	hexane 80 % dichloromethane 8 % ethyacetate 12 % butanol 3 หยด
ชั้น chloroform	choloroform 95 % ethyacetate 5 %
ชั้น methanol	Dichoromethane 96 % methanol 4 % butanol 3 หยด

4.1.2 ผลของการเรืองแสงต่อ UV

เมื่อนำ crude extract มาทำการ develop ด้วย TLC แล้ว นำมาทดสอบผลการเรืองแสง UV ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer ได้ผลดังนี้

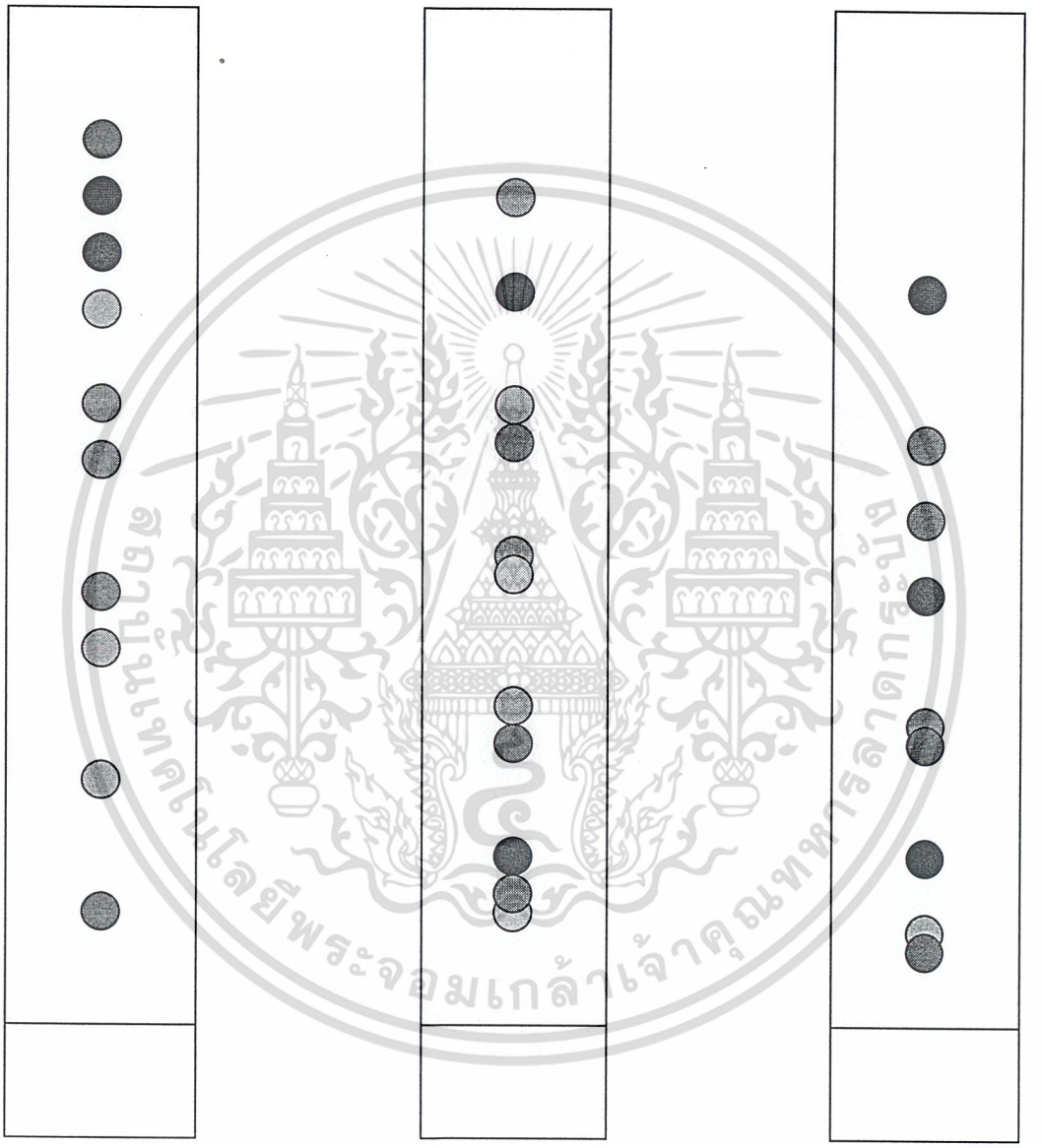
ตารางที่ 4.2 แสดงผลการเรืองแสง UV ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer

Crude extract	ผลการเรืองแสงต่อแสง UV
ชั้น hexane	พบจุดเรืองแสง 4 จุด
ชั้น chloroform	พบจุดเรืองแสง 1 จุด
ชั้น methanol	พบจุดเรืองแสง 1 จุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 **ผลการแยก** crude extract **โดย** TLC Solvent system **ที่เหมาะสม**

นำแผ่น TLC ที่ได้ย้อมด้วย Developing solvent และอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จะสังเกตเห็นการแยกของ crude extract ได้อย่างชัดเจนดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 รูปแสดงผลการแยกของ crude extract ในชั้นต่างๆ ด้วย TLC โดยผ่านการย้อมสีด้วย devolping solvent จากรูป หมายเลข 1 คือ crude extract ชั้น methanol หมายเลข 2 คือ crude extract ชั้น chloroform และหมายเลข 3 คือ crude extract ชั้น hexane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบทางเภสัชวิทยา

crude extract จากการศึกษาได้มีการนำเอาชุมเห็ดเทศมาใช้ในการรักษาโรคดังนั้นการวิจัยจึงสนใจศึกษาเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศที่มีผลต้านมาลาเรียโดยทดสอบ crude extract ที่สกัดในชั้น methanol chloroform และ hexane ตรวจสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย ผลแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรียของเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศ

Sample	Dissolved in	Activity(EC_{50})(μg/mg)
Ca(B)/Crude/Hex	DMSO	Inactive
Ca(B)/Crude/CHCl3	DMSO	Inactive
Ca(B)/Crude/MeOH	DMSO	15.2

จากผลที่ได้พบว่าเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศที่สกัดในชั้น methanol มีฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย เราจึงมุ่งเน้นที่จะทำการแยก crude extract โดยวิธี column chromatograpy เพื่อแยกสารที่ต้องการให้มีความบริสุทธิ์และนำสารที่แยกได้ในแต่ละชนิดนำไปทดสอบ

4.3 ผลการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่าง ๆ โดยวิธี column chromatography

ผลการทดลองในส่วนที่กล่าวถึงการแยกสารใน crude extract ของชั้นต่างๆที่ได้มีการหา solvent system อย่างเหมาะสมในการแยก crude extract โดยอาศัยเทคนิค column chromatography พบว่า solvent system ที่ใช้ในแต่ละชั้นของสารละลายจะไม่เหมือนกันและจำนวนสารที่ต้องการแยกก็ไม่เท่ากัน

4.3.1 crude extract ในชั้น Hexane

จากการตรวจสอบด้วย TLC ในชั้นนี้พบสารที่น่าสนใจแล้วทำการแยกโดยการ pack column ด้วย siliga เบอร์ 7721 แยกด้วย solvent system ที่เหมาะสมโดยเก็บใส่หลอดทดลองและตรวจสอบสารที่ต้องการแยกออกจาก column โดยค่อยๆเพิ่มขั้วให้กับ solvent system ที่ละน้อยโดยมีค่าความเป็นขั้วน้อยกว่าค่า solvent system ที่เหมาะสม เพราะจะทำให้สารที่ออกมามีความชัดเจนไม่เร็วจนเกินไปและสารที่มีความบริสุทธิ์สูงโดยสารละลายที่เหมาะสมแสดงดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น Hexane ด้วยcolumn chromatography

รายละเอียดในการแยก	ลักษณะ
Silica gel ที่ใช้ pack column	เบอร์ 7729
Solvent system ที่เหมาะสม	hexane 80 % dichloromethane 8 % ethyacetate 12 % butanol 3 หยด

เริ่มต้นเก็บสารละลายที่ไหลผ่าน column ออกมาใส่หลอดทดลองและทุกหลอดต้องเริ่มตรวจด้วย TLC และบันทึก solvent stem ที่ใช้ในการแยกแต่ละหลอดเพื่อตรวจว่าสารที่ออกจาก crude extract มี solvent system ที่เหมาะสมที่สุดโดยบันทึกเลขที่และจำนวนของหลอดดัง ตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดง solvent system ที่ใช้ในชั้น hexane

Solvent system	hexane 98 % dichloromethane 2 %
ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ	หลอดที่ 5-12

เมื่อได้สารแล้วจาก column ทำการรวม fraction แล้วทำการแยกต่อโดยให้มีความบริสุทธิ์มากที่สุดโดยใส่ขวดก้นกลมและนำไประเหยตัวทำละลายออก

จากนั้นนำมาแยกด้วย column chromatography อีกครั้งโดยใช้ solvent system ที่เหมาะสมในการแยกความยาวของ column ที่ใช้จะมีขนาดสั้นกว่า column ที่ใช้ในการแยก crude และทำการ pack column ด้วย siliga gel เบอร์ 7729 โดยอาศัยปั๊มช่วยให้สารไหลผ่านออกจาก column ได้เร็วขึ้นและแยกสารใส่หลอดทดลองในแต่ละหลอด นำมาตรวจสอบเทคนิค TLC เช่นเดียวกันกับการแยก crude extract

สรุปได้ว่า การแยกสารจาก crude extract ในชั้น hexane ด้วย column chromatography ได้ดังตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จาก crude extract ในชั้น hexane

รายละเอียดที่ใช้ในการแยก	ลักษณะ
Solvent system ที่สารเริ่มออกจากคอลัมน์	hexane 80 % dichloromethane 10 % ethyacetate 10 %
ลักษณะสารที่พบ	ของแข็งสีขาว
ค่า Rf	0.62
การเปลี่ยนแปลงสีของสาร	ม่วง ➡ ม่วงเข้ม ➡ น้ำเงิน
จุดหลอมเหลว	210 °C

4.3.2 crude extract ในชั้น chloroform

จากผลการตรวจสอบ TLC ในชั้น chloroform โดยใช้ siliga gel เบอร์ 7729 อาศัยปั๊มช่วยในการให้สารละลายไหลออกจาก column เร็วขึ้นเก็บสารละลายที่ออกจาก column ใส่หลอดทดลองบันทึก solvent system ที่เหมาะสม โดยตรวจจาก TLC โดยรายละเอียดในการแยกแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่4.7 แสดง แสดงรายละเอียดที่ใช้ในการแยก crude extract ชั้น Chloroform ด้วย column chromatography

รายละเอียดในการแยก	ลักษณะ
Silica gel ที่ใช้ pack คอลัมน์	เบอร์ 7729
Solvent system ที่เหมาะสม	choloroform 95 % ethyacetate 5 %

ตารางที่ 4.8 แสดง solvent system ที่ใช้ในการเก็บสารในแต่ละหลอดของการแยก crude extract ในชั้น chloroform

Solvent systemที่สารเริ่มออกจากคอลัมน์	ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ
Chloroform 100 %	หลอดที่ 44-54
Chloroform 96 % Ethyl acetate 4 %	หลอดที่ 160-169

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเก็บสารในหลอดทดลองแล้วนำมาตรวจสอบด้วย TLC แล้วนำสารแต่ละหลอดมารวม fractionแล้วทำการระเหยแล้วนำไปทำ column chromatography ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดง solvent system ที่ใช้ในชั้น Chloroform

Solvent systemที่สารเริ่มออกจากคอลัมน์	ช่วงหลอดที่ทำการเก็บ
Chloroform 100 %	หลอดที่ 57-61
Chloroform 96 % Ethyl acetate 4 %	หลอดที่ 60-70

สรุปได้ว่า การแยกสารจาก crude extract ในชั้น chloroform ด้วย column chromatography ได้ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่4.10 แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จาก crude extract ในชั้น $CHCl_3$

สารตัวที่	Solvent systemที่สารเริ่มออกจากคอลัมน์	ลักษณะสารที่พบ	การเปลี่ยนแปลงสีของสาร	ค่า Rf
1	Chloroform 100 %	ของแข็งสีเหลือง	สีเหลือง	0.37
2	Chloroform 96 % Ethyl acetate 4 %	ของเข็งสีส้ม	สีส้ม	0.30

4.4 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นนัลและโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค IR และ NMR

นำสารที่แยกได้ด้วย Column chromatography ในชั้น Hexane 1 ตัว และในชั้น Chloroform 2 ตัว โดยกำหนดเป็นรหัสตามผลการแยกได้ดังตารางที่4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงรหัสของสารที่แยกออกจาก Crude extract ในชั้นต่างๆ ด้วย Column chromatrography

Crude exyract	ลำดับสารที่แยกออกจาก colume	รหัส
ชั้น hexane	สารตัวที่ 1	Ca(B)/1/Hex
ชั้น chloroform	สารตัวที่ 2	Ca(B)/2/$CHCl_3$
ชั้น chloroform	สารตัวที่ 3	Ca(B)/3/$CHCl_3$

4.4.1 Ca(B)/1/Hex

-ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR

เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ได้อินฟาเรดสเปคตรัมออกมาดังรูปที่ 4.2 นำมาเทียบกับค่า ν_{max} เพื่อคาดคะเนหาหมู่ฟังก์ชันนัลของสาร

IR(near) : ν_{max} = 2917.24 ,1737.54 , 1463.50 , 1377.82 , 1177.62 cm-1

จากค่า ν_{max} การคาดคะเนหาหมู่ฟังก์ชันนัลที่ค่าต่างๆได้ดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชั่นนัลที่คาดว่าจะเป็น

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชั่นนัลที่คาดว่าจะเป็น
2917.24	C-H streching
1737.54	C=O
1463.50, 1377.87	CH_2, CH_3
1177.60	C-O(ester)

-ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

Ca(B)/1/Hex เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H NMR ได้สเปคตรัมดังรูปที่ 4.3 เมื่อใช้ CD_3Cl_3เป็นตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัญญาณค่า ^{1}H Chemical shift ที่น่าสนใจโดยผลอ่านจากขวาไปซ้ายมีดังนี้

δ (0.97 ppm) เป็นของ CH_2-CH-$(CH_3)_2$

δ (1.92 ppm) เป็นของ C=C

δ (1.50-2.22 ppm) เป็นของ(q) $C\underline{H}_3$-CH_2-C=O

δ (4.05 ppm) เป็นของ (t)CH_2–$C\underline{H}_2$-O

เมื่อนำไปหาค่า ^{13}C Chemical shift โดยใช้ CD_3Cl เป็นตัวทำละลาย จะทราบจำนวนคาร์บอนในสารและลักษณะและในสาร ดังรูป 4.4

จาก ^{13}C NMR spectrum ค่า ^{13}C Chemical shift ที่น่าสนใจได้แก่

δ ที่ 20-60,32, 65 ppm

δ (20-60 ppm)เป็นของ–CH_2-CH_3

δ (32 ppm) เป็นของ CH_3-CH_2-C=O

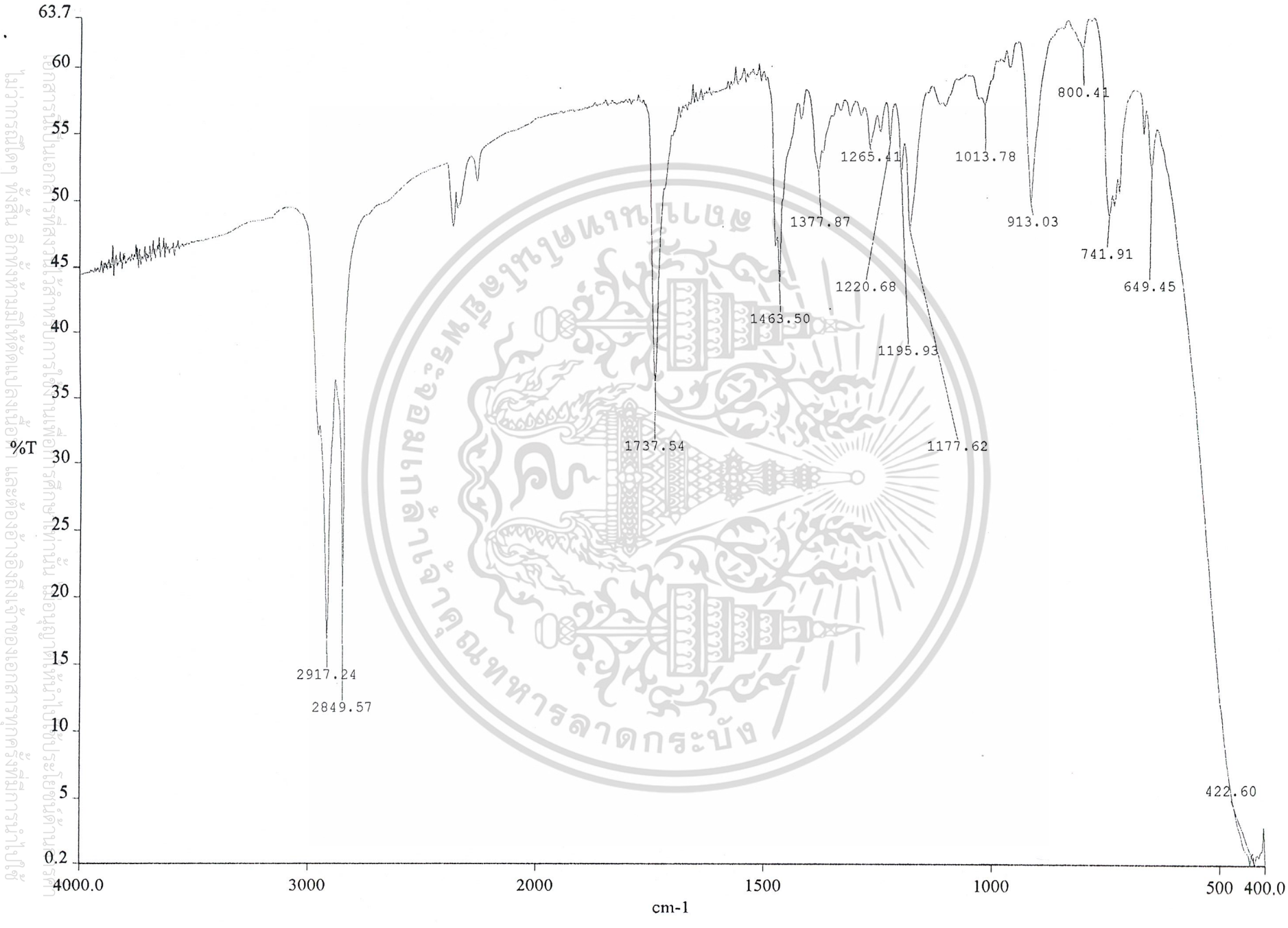
δ (65 ppm) เป็นของ –CH_2-O-

δ (140ppm) เป็น Quarternary carbon

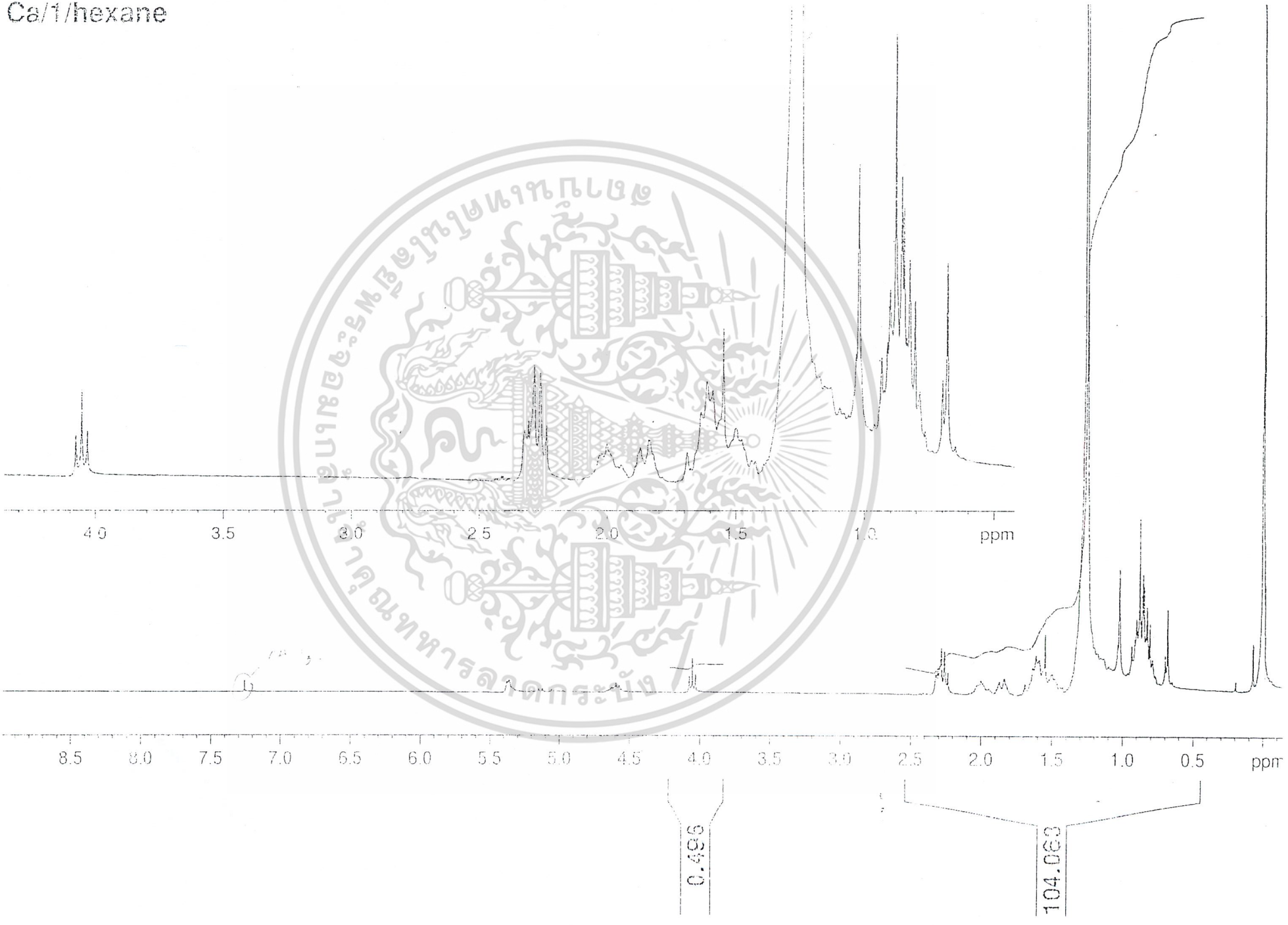
δ (173ppm) เป็นQuarternary ของ C=O

จาก สเปคตรัมทั้งหมดคาดคะเนโครงสร้างสารคร่าวได้ว่า Ca(B)/1/Hex น่าจะมี คาร์บอนประมาณ 29-30 ตัว มีหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญคือ หมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

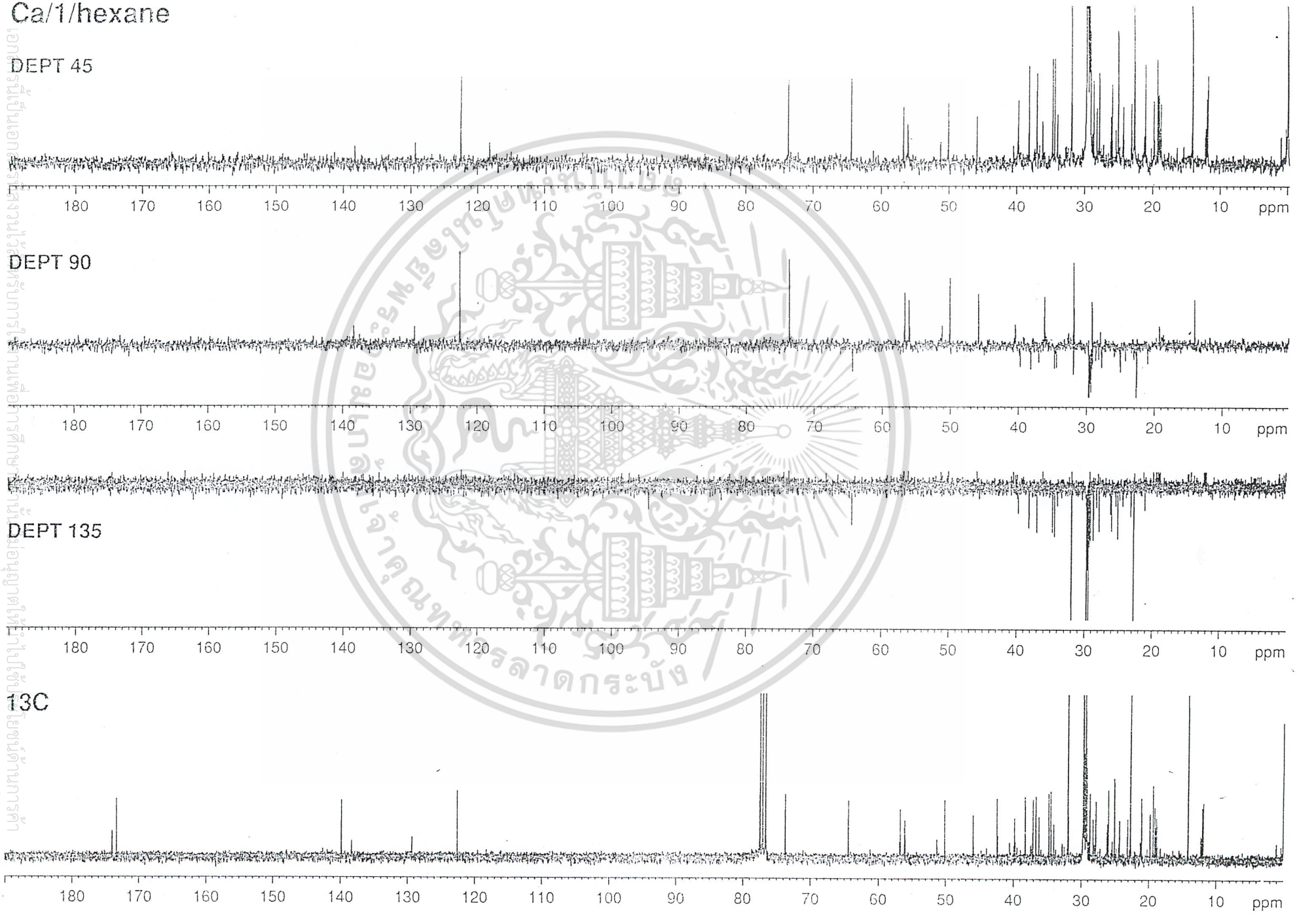


ภาพที่ 4.2 IR spectrum ของ Ca(B)/1/hex


Ca/1/hexane
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
ppm
0.496
104.063

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.4 ^{13}C NMR ของ Ca(B)/1/hex



ภาพที่ 4.5 DEPT ^{13}C NMR ของ Ca(B)/1/hex

4.4.2 Ca(B)/2/$CHCl_3$

-ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR

เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ได้อินฟาเรดสเปคตรัมออกมาดังรูปที่ 4.6 มาเทียบกับค่า ν_{max} เพื่อคาดคะเนหาหมู่ฟังชันนัลของสาร

IR(near) : ν_{max} = 3419.85 ,2935.17 , 1597.82 , 1463.59 , 1061.83 cm-1

จากค่า ν_{max} การคาดคะเนหาหมู่ฟังชันนัลที่ค่าต่างๆได้ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.13 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังชั่นนัลที่คาดว่าจะเป็น

ν_{max} (cm^{-1})	หมู่ฟังชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
3419.85	OH
2935.17	C-H stretching
1597.82	C=C
1463.59 , 1381.70	-CH2 , -CH3
1061.83	C-O

-ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

Ca(B)/2/CHCl3 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR ได้สเปคตรัมดังรูปที่ 4.11 เมื่อใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย สัญญาณค่า ^{1}H Chemical shift ที่น่าสนใจโดยผลอ่านจากขวาไปซ้ายมีดังนี้

δ (0.68-0.87 ppm) เป็นของ $-CH_2$,CH_3-ซึ่งทำการ overlabกัน

δ (2.23 ppm) เป็นของ $-CH_3$-CO

δ (3.95-5.30 ppm) เป็นของ C=C

δ (5.40 ppm) เป็นของ OH

δ (3.50 ppm) เป็นของ CH_3-OH

เมื่อนำไปหาค่า ^{13}C Chemical shift โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลาย จะทราบจำนวนคาร์บอนในสารและลักษณะและในสาร ดังรูป 4.8

จาก ^{13}C NMR spectrum ค่า ^{13}C Chemical shift ที่น่าสนใจได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

δ ที่ 20-50,72,122,141 ppm

δ (20-50ppm) เป็นของ $-CH_3$, $-CH_2$,-CH

δ (72 ppm) เป็นของ $O-CH(CH_3)_2$

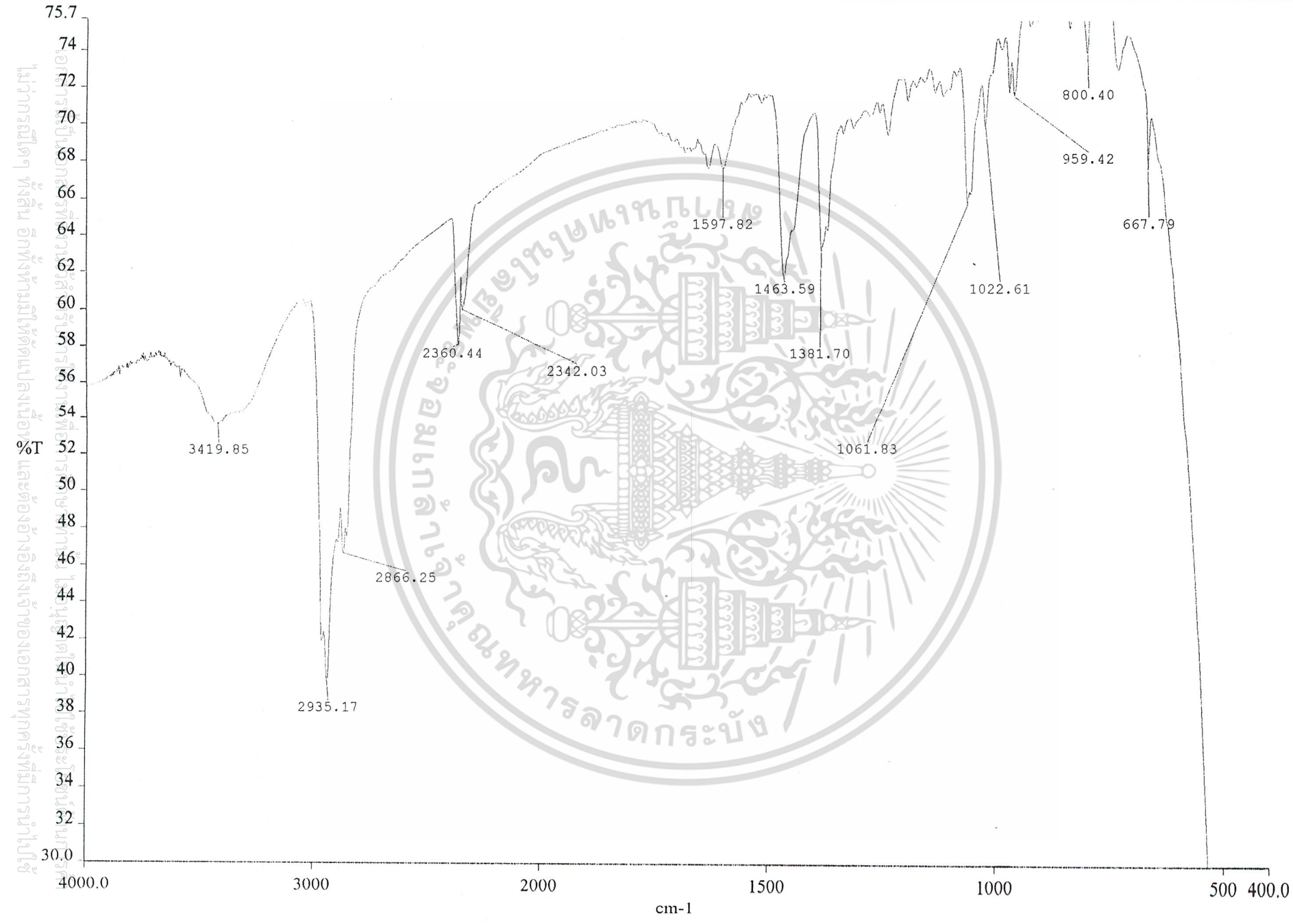
δ (122 ppm) เป็นของ –C=C-

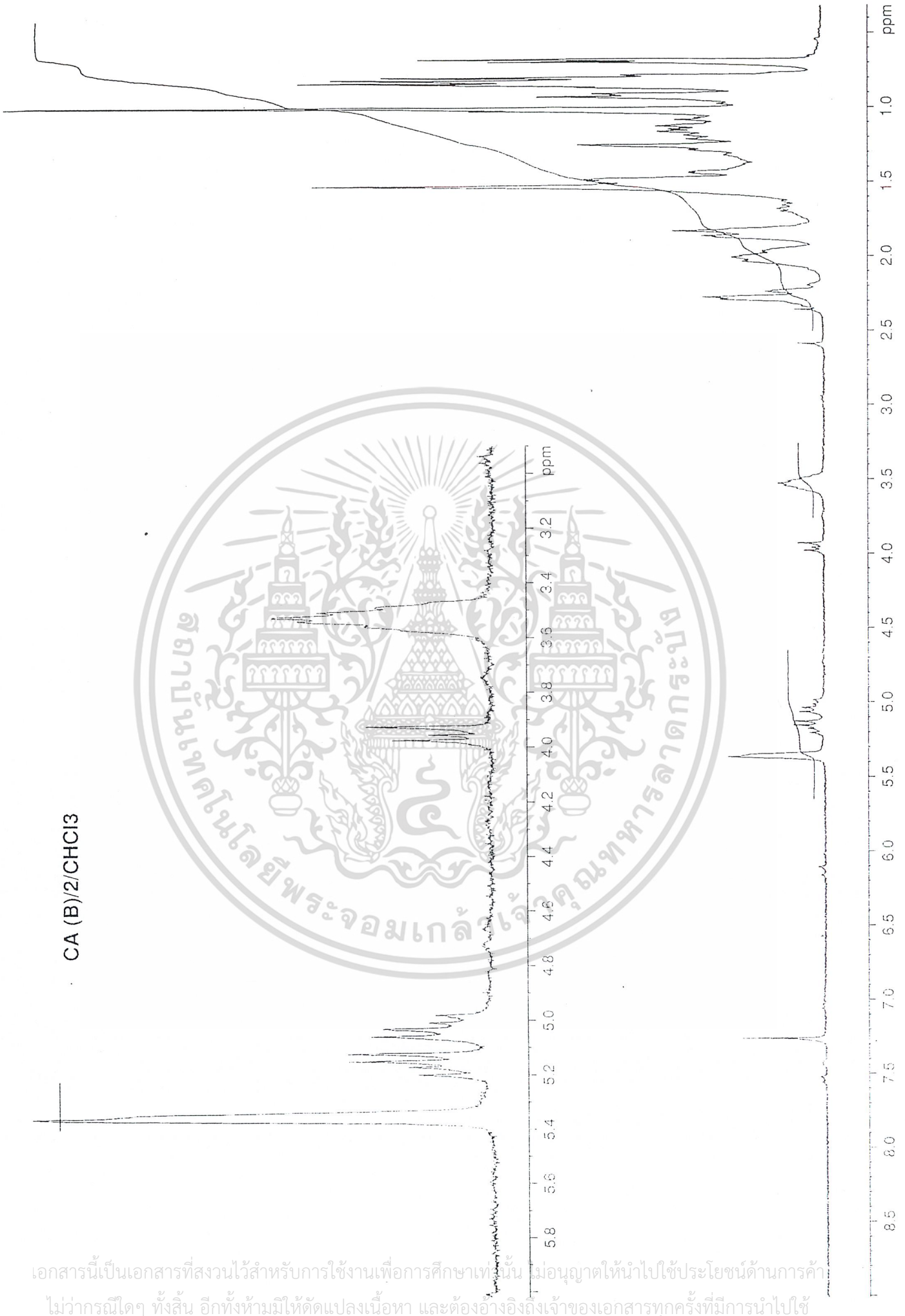
δ (141 ppm) เป็นของ Terminal alkene (CH_2=C-R)

จาก สเปคตรัมทั้งหมดคาดคะเนโครงสร้างสารคร่าวได้ว่า $Ca(B)/2/CHCl_3$ น่าจะมี คาร์บอน ประมาณ 20 ตัว มีหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญคือ พันธะคู่ , หมู่ไฮดรอกซี และหมู่อัลคอกซี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.6 IR spectrum ของ Ca(B)/2/chloroform



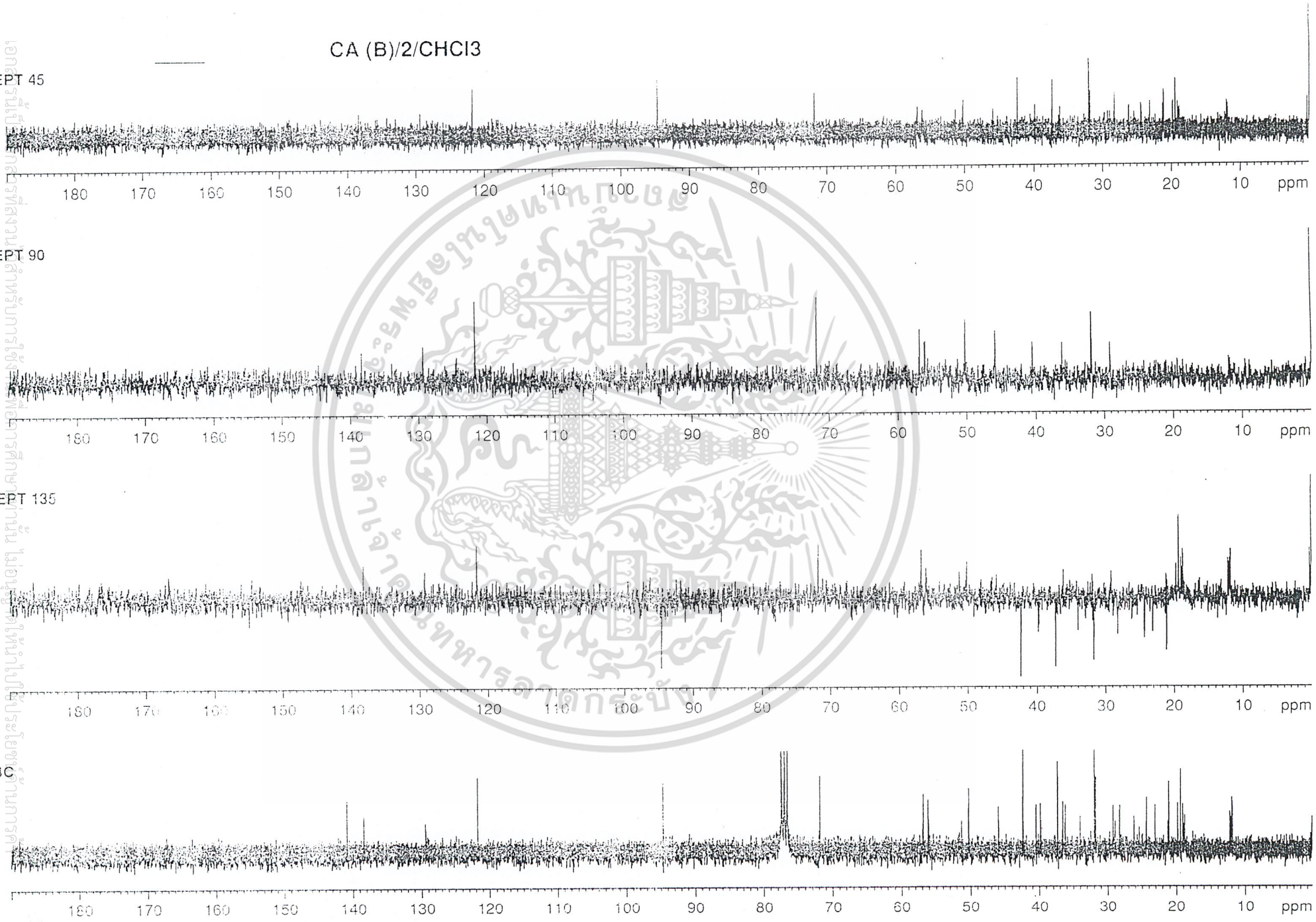


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.7 ^{1}H NMR ของ Ca(B)/2/chloroform

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.8 ^{13}C NMR ของ Ca(B)/2/chloroform



ภาพที่ 4.9 DEPT ^{13}C NMR ของ Ca(B)/2/chloroform

4.3 Ca(B)/3/$CHCl_3$

-ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR

เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR ได้อินฟาเรดสเปคตรัมออกมาดังรูปที่ 4.10 มาเทียบกับค่า ν_{max} เพื่อคาดคะเนหาหมู่ฟังก์ชันนัลของสาร

IR(near) : ν_{max} =3390.10 , 2959.00 , 1610.70 , และ1562.20 cm^{-1}

จากค่า ν_{max} การคาดคะเนหาหมู่ฟังก์ชันนัลที่ค่าต่างๆได้ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงค่า ν_{max} ที่น่าสนใจจาก IR spectrum และหมู่ฟังก์ชั่นนัลที่คาดว่าจะเป็น

νmax (cm-1)	หมู่ฟังก์ชันนัลที่คาดว่าจะเป็น
3390.10	OH
2959.00	C-H stretching
1610.70,1562.20	C=C aromatic

-ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR

Ca(B)/3/$CHCl_3$ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR ได้สเปคตรัมดังรูปที่ 4.11 เมื่อใช้ DMSOเป็นตัวทำละลาย สัญญาณค่า ^{1}H Chemical shift ที่น่าสนใจโดยผลอ่านจากขวาไปซ้ายมีดังนี้

δ ((2.5 ppm) เป็นของ –CH_3 มี2 หมู่

δ (3.5 ppm) เป็นของ OH-

δ (6.6 ppm) เป็นของ aromatic(doublet)

δ (7.1 ppm) เป็นของ aromatic(doublet)

δ (7.15 ppm) เป็นของ aromatic(singlet)

δ (7.45 ppm) เป็นของ aromatic(singlet)

δ (8.3 ppm) เป็นของ aromatic(singlet)

เมื่อนำไปหาค่า ^{13}C Chemical shift โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย จะทราบจำนวนคาร์บอนในสารและลักษณะและในสาร ดังรูป 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จาก ^{13}C NMR spectrum ค่า ^{13}C Chemical shift ที่น่าสนใจได้แก่

δ ที่ 21,29,120,136,148,182และ190 ppm

δ (21และ29ppm) เป็นของ $-CH_3$

δ (120 ppm) เป็นของ Ar-R(R –Alkyl subsituents)

δ (136 ppm) เป็นของ Ar-Y(Y-polar substituents)

δ (148ppm) เป็นของ -Aromatic

δ (182 และ190ppm) เป็น C=O ของconjugate olefin

จาก สเปคตรัมทั้งหมดคาดคะเนโครงสร้างสารคร่าวได้ว่า $Ca(B)/3/CHCl_3$ น่าจะมี คาร์บอน ประมาณ 16 ตัว มีหมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญคือ หมู่เมธิล หมู่คาบอนิล ไฮดรอกซีและอโรมาติก

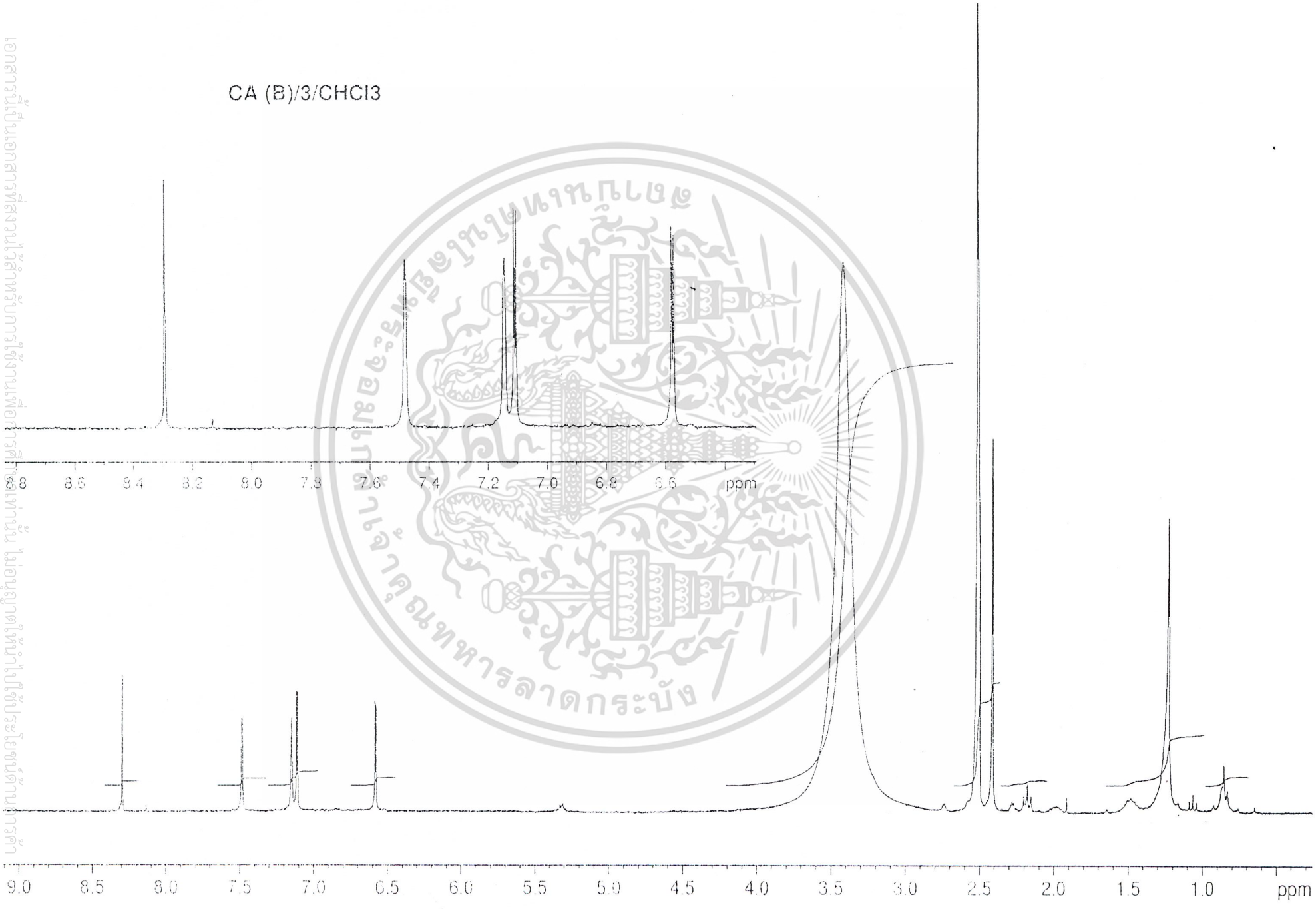
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

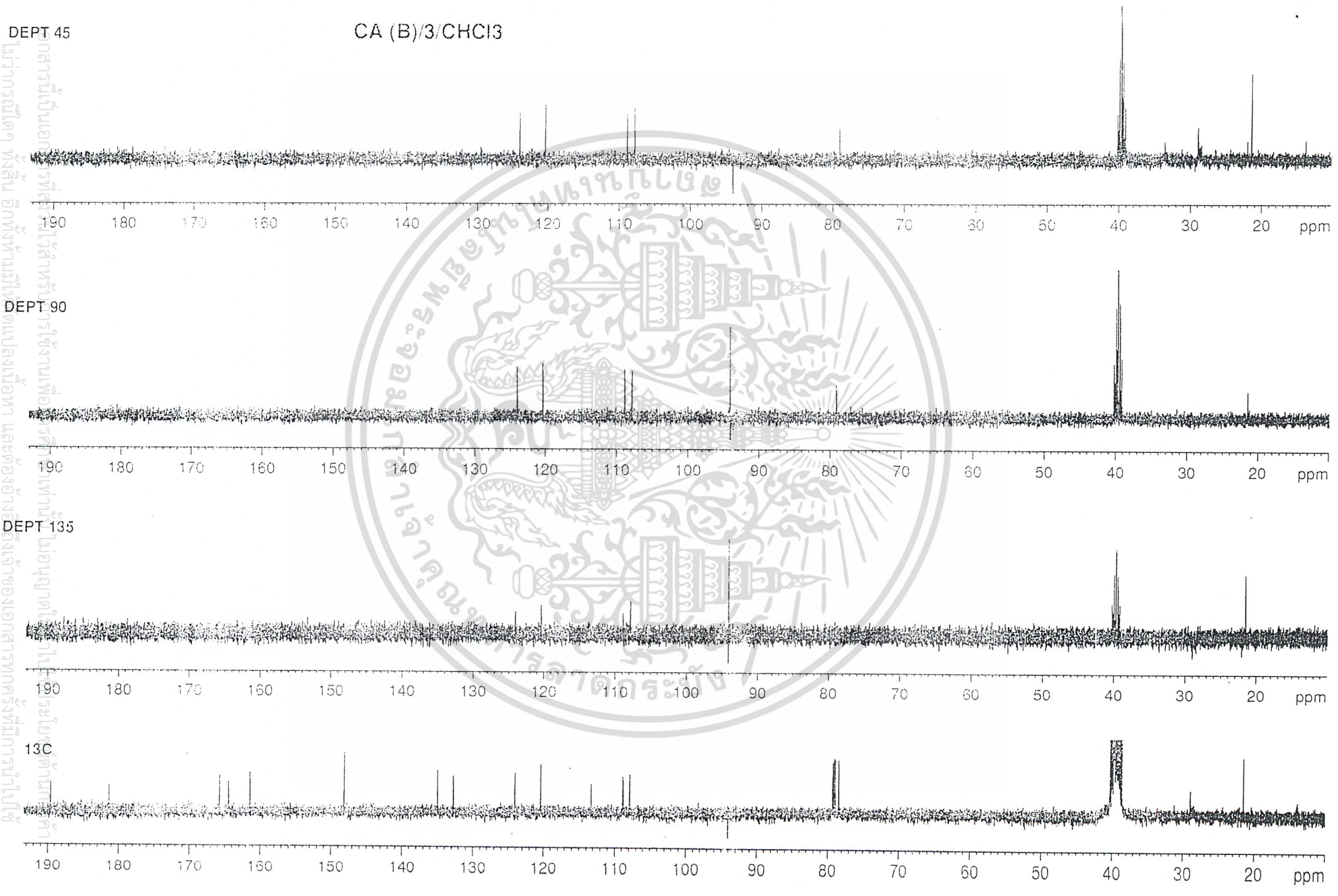
ภาพที่ 4.10 IR spectrum ของ Ca(B)/3/chloroform

ภาพที่ 4.11 ^{1}H NMR ของ Ca(B)/3/chloroform



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.12 ^{13}C NMR ของ Ca(B)/3/chloroform



ภาพที่ 4.13 DEPT ^{13}C NMR ของ Ca(B)/3/chloroform

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษาวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

5.1.1 เปลือกของต้นชุมเห็ดเทศ(*Cassia alata*)Leguminosae ที่สกัดในชั้น methanol มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

5.1.2 solvent system ที่เหมาะสมของ crude extract ในชั้นต่างๆเพื่อนำไปทดสอบสารด้วย TLC และใช้เป็นแนวทางในการแยกสารสำคัญ ด้วย column chromatography

5.1.3 crude extract ซึ่งสกัดจากชั้น hexane และ chloroform เมื่อนำมาแยกด้วย column chromatography พบว่า

ชั้น hexane พบสารที่สำคัญ 1 ชนิด

ชั้น chloroform พบสารสำคัญ 2 ชนิด

5.1.4 ลักษณะของสารที่ได้

สารที่แยกได้ในแต่ละ fraction จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน

Ca(B)/1/Hex ของเหลวหนืดสีขาว Rf =.0.62

Ca(B)/2/$CHCl_3$ เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง Rf = 0.37

Ca(B)/3/$CHCl_3$ เป็นของแข็งสีส้ม Rf = 0.30

5.1.5 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคปี

เนื่องจากในโครงงานพิเศษนี้ ไม่สามารถหาโครงสร้างของสารอย่างละเอียดได้เพราะผลการศึกษาไม่เพียงพอ แต่สามารถคาดคะเนหมู่ฟังชันก์ชันนัลและโครงสร้างได้เพียงคร่าวๆ

ผลการตรวจสอบด้วย IR , H NMR และ C13 NMR

Ca(B)/1/Hex

คาดคะเนว่าสารมีหมู่คาร์บอนิลและหมู่อีเธอร์โดยโครงสร้างคร่าวน่าจะเป็นสายโซ่ยาวและมีจำนวนคาร์บอนประมาณ 29-30 ตัว

Ca(B)/2/CHCl3

คาดคะเนว่าสารมีหมู่ไฮดรอกซี พันธะคู่และหมู่อีเธอร์โดยโครงสร้างคร่าวน่าจะเป็นสายโซ่ยาวและมีจำนวนคาร์บอนประมาณ 20 ตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$Ca(B)/3/CHCl_3$

คาดคะเนว่าสารมีหมู่ อะโรมาติก, คาร์บอนิล และมีจำนวนคาร์บอนประมาณ 16 ตัว

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. สารสำคัญในเปลือกชุมเห็ดเทศชั้นต่างๆที่มีสารสำคัญควรทำการศึกษาผลของสารสำคัญในแต่ละตัวที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งและมาลาเรีย
2. ในการแยกสารสำคัญต้องหา solvent system หรือการเลือกใช้ developing solvent ที่ไม่ควรเกิดปฏิกิริยากับสารสำคัญ
3. ในการแยกสารสำคัญออกจาก column ควรเพิ่มความเป็นขั้วของ solvent system ที่ใช้ให้น้อยที่สุดและควรหยุดเพิ่มเมื่อสารสำคัญเริ่มออกจาก column เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยก
4. การหา solvent system ที่เหมาะสมควรหาความเป็นขั้วของสารละลายแตกต่างกันหลายๆค่าเพื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบให้ผลการแยกที่ดีที่สุด
5. ก่อนการนำสารไปวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิคทาง spectroscopy หรือ test activity ต่างๆ ควรทำสารนั้นให้บริสุทธิ์ก่อนหรือมีสารเจือปนในปริมาณน้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน , หน้า 76-77 , 2541.

2. วีณา จิรัจฉริยากุล , ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติพิมพ์ครั้งที่ 1 , หน้าที่ 99-136 ,318-329 ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล , 2534

3. Silverstein,Bassler.Morrill,Spectrometric Identtification of Organic Compound, 288-290 , John Wilery&sons , United state ,1981

4. Dipit Gupta , J. Singh,"Flavonoid Glycosides from CASSIA ALATA"Phytochemistry,30(8),(1991),2761-2763

5. Hemlata , Suraj,B.Kalidhar, "Alatinone,An Amthraquinone from CASSIA ALATA",Journal32(6),1993,1616

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้