สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาส่วนประกอบทางเคมี

ในผลและเมล็ดของกำจัดต้น (*Zanthoxylum limonella* Alston)

T040073

นาย กฤษณ์ ศรีวะรมย์ รหัส 40052002

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2543

ก281ก
2543
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 40073
วัน, เดือน, ปี 24 ก.ค. 2544
.b.....
.i.....
สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on the Chemical Constituents

of *Zanthoxylum Limonella* Alston Fruit

Mr. Krit Sriwarom

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของผลกำจัดต้น
(Zanthoxylum limonella Alston, Rutacea)

นักศึกษา นายกฤษณ์ ศรีวะรมย์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. พัชนี เจริญยิ่ง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

.....
(ผศ. ดร. สมศักดิ์ วรมงคลชัย) หัวหน้าภาควิชาเคมี

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

.....
(ผศ. ดร. ตะวัน สุขน้อย) ประธานกรรมการ

.....
(ดร. วันฉัตร ชื่นชม) กรรมการ

.....
(ดร. พัชนี เจริญยิ่ง) กรรมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาหาส่วนประกอบทางเคมีของผลและเมล็ดกำจัดต้น

นักศึกษา นาย กฤษณ์ ศรีวะรมย์ 40052002

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. พัชนี เจริญยิ่ง

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของผลและเมล็ดของกำจัดต้น เพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัช ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล แยกส่วนประกอบทางเคมี และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าสารสกัดเบื้องต้นในชั้นเฮกเซน ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นหอม และ แวกซ์ เป็นองค์ประกอบหลัก สารสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม มีสารจำพวกแวกซ์, ของแข็งเป็นผลึก สามารถแยกส่วนประกอบทางเคมีในสารสกัดเบื้องต้นชั้นคลอโรฟอร์มให้บริสุทธิ์ได้สาร 2 ตัว นำสารที่แยกได้ไปศึกษาหาโครงสร้างด้วย NMR พบว่าเป็นสารจำพวกไตรเทอร์พีนอยด์ และสารจำพวกอะเซตโตฟีโนนชนิดใหม่ คือ 1-(2-ไฮดรอกซี-4,5-ไดเมทอกซีฟีนิล)-เอทาโนน ซึ่งมีปริมาณ 0.14 % และ 9.64 % ของน้ำหนักสารสกัดเบื้องต้น

จากการทดสอบทางเภสัชวินิจฉัย พบว่าสารสกัดเบื้องต้นในชั้นคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย และวัณโรคเพียงพอที่จะพัฒนาเป็นยาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study in The Chemical Constituent of *Zanthoxylum Limonella* (Alston) Fruit
Name	Mr. Krit Sriwarom 40052002
Special Project Advisor	Dr. Patchanee Charoenying
Department	Chemistry
Academic	2000

Abstract

Two chemical constituents were isolated from fruit of *Zanthoxylum limonella* Alston (Rutacea), a spices plant from the north of Thailand, by column chromatography technique. The structures of the 2 compounds were elucidated by MS and NMR techniques. One of the compounds is a triterpenoid, the other is a acetophenone compound, 1-(-2-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-ethanone. The main components of the hexane crude extract are essential oil and wax. The major components of the chloroform crude extract were oil and white crystalline solid. We found that the crude extract in chloroform layer show antimalarial activity and antituberculous.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้ ดำเนินไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือ แนะนำ อำนวยความสะดวก ของคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และผู้เกี่ยวข้อง

ขอขอบพระคุณ ดร. พัชนี เจริญยิ่ง ที่คอยเอาใจใส่ ช่วยเหลือ ในการทำโครงงานพิเศษ และให้โอกาสในการเสนอความคิดเห็นอย่างเต็มที่ในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. โกศัลย์ คูสำราญ , ผศ. ดร. ตะวัน สุขน้อย, และ ดร. วันฉัตร ชื่นชม อาจารย์คณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำหรับการทดสอบทางเภสัชวินิจฉัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์ในการทดลอง

ขอขอบคุณชมรมศิลปะการแสดงและวรรณกรรมสำหรับกำลังใจ ประสบการณ์ที่ล้ำค่า การค้นพบสิ่งใหม่ๆ ให้กับชีวิต และให้รู้สึกว่ามีที่หนึ่งให้กลับมาได้เสมอ

ขอขอบคุณชินนุชา ดวงพรชัย ที่ให้คำแนะนำในด้านคอมพิวเตอร์ และการเตรียมการนำเสนองาน

นายกฤษณ์ ศรีวะรมย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
อักษรย่อ	
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดหวังว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสมุนไพรและเครื่องเทศ	4
2.2 ตัวยาและสารสำคัญในพืชสมุนไพร	6
2.3 การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์สารสำคัญจากสมุนไพร	11
2.4 การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟี	17
2.5 กำจัดต้น	21
2.6 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	22
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย	
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	23
3.2 ขั้นตอนงานวิจัย	24
3.3 วิธีการทดลอง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดส่วนประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย 28

4.2 ผลการทดสอบทางเภสัชวินิจฉัยของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่างๆ 28

4.3 ผลการศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการแยกส่วนประกอบทางเคมีจากสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยเทคนิค TLC เพื่อนำไปใช้แยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี 29

4.4 ผลการแยกสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี 32

4.5 ผลการทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

4.6 ผลการตรวจสอบโครงสร้างและจุดหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์ 37

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย 46

5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย 48

5.3 ข้อเสนอแนะ 48

เอกสารอ้างอิง 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 4.1	แสดงน้ำหนักของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่างๆ	28
ตารางที่ 4.2	แสดงค่า EC_{50} จากการทดสอบการต่อต้านมาลาเรีย	28
ตารางที่ 4.3	แสดงผลการทดสอบการต่อต้านเชื้อวัณโรค	29
ตารางที่ 4.4	แสดงระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ	30
ตารางที่ 4.5	ผลของการแยกสารสกัดด้วย TLC โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า	30
ตารางที่ 4.6	ผลของการแยกสารสกัดด้วย TLC โดยการทดสอบกับรังสี UV	31
ตารางที่ 4.7	ผลของการแยกสารสกัดด้วย TLC โดยทดสอบกับ Developing Solvent	31
ตารางที่ 4.8	แสดงการเก็บ Effluent ในการแยกสารสกัดชั้นเฮกเซน	32
ตารางที่ 4.9	แสดงการรวมส่วนประกอบที่แยกได้ของสารสกัดชั้นเฮกเซน	33
ตารางที่ 4.10	แสดงการเก็บ Effluent ในการแยกสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม	34
ตารางที่ 4.11	แสดงการรวมส่วนประกอบที่แยกได้ของสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม	34
ตารางที่ 4.12	ผลการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจในชั้นคลอโรฟอร์ม ด้วย TLC โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า	35
ตารางที่ 4.13	ผลการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจในชั้นคลอโรฟอร์ม ด้วย TLC โดยการทดสอบกับรังสี UV	35
ตารางที่ 4.14	ผลการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจในชั้นคลอโรฟอร์ม ด้วย TLC โดยทดสอบกับ Developing Solvent	36
ตารางที่ 4.15	แสดงน้ำหนักและค่า R_f ของสารบริสุทธิ์	36
ตารางที่ 4.16	แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 จาก ^{1}H-NMR Spectra	37
ตารางที่ 4.17	แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 จาก ^{13}C-NMR Spectra	38
ตารางที่ 4.18	แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 จาก ^{1}H-NMR Spectra	41
ตารางที่ 4.19	แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 จาก ^{13}C-NMR Spectra	41
ตารางที่ 4.20	แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 จาก Mass Spectra	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2.1	สูตรโครงสร้างขององค์ประกอบบางชนิดของน้ำมันหอมระเหยบางชนิด	7
ภาพที่ 2.2	โครงสร้างของสารแอลคาลอยด์บางชนิด	8
ภาพที่ 2.3	โครงสร้างของ คาร์ดิแอค ไกลโคไซด์ บางชนิด	9
ภาพที่ 2.4	โครงสร้างของ แอนทราควิโนนที่พบในพืช	10
ภาพที่ 2.5	ต้นกำจัดต้น (*Zanthoxylum limonella* Alston)	21
ภาพที่ 2.6	ต้นกำจัดต้น (*Zanthoxylum limonella* Alston)	21
ภาพที่ 2.7	ผลและเมล็ด กำจัดต้น (*Zanthoxylum limonella* Alston)	22
ภาพที่ 4.1	แสดงการแยกของส่วนประกอบในสารสกัดด้วย TLC ที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า	30
ภาพที่ 4.2	แสดงการแยกของส่วนประกอบในสารสกัดด้วย TLC โดยทดสอบกับรังสี UV 254 nm และ 366 nm	31
ภาพที่ 4.3	แสดงการแยกของส่วนประกอบในสารสกัด ชั้นต่างๆ ด้วย TLC ทดสอบกับ Developing Solvent	32
ภาพที่ 4.4	แสดงการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจในชั้นคลอโรฟอร์มด้วย TLC ทดสอบกับรังสี UV 254 nm และ 366 nm	35
ภาพที่ 4.5	แสดงการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจชั้นในคลอโรฟอร์มด้วย TLC ทดสอบกับ developing solvent	36
ภาพที่ 4.6	โครงสร้างที่เป็นไปได้ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71	38
ภาพที่ 4.7	แสดง ^{1}H NMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71	39
ภาพที่ 4.8	แสดง ^{13}C NMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71	40
ภาพที่ 4.9	โครงสร้างที่เป็นไปได้ของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49	41
ภาพที่ 4.10	แสดง ^{1}H NMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49	43
ภาพที่ 4.11	แสดง ^{13}C NMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49	44
ภาพที่ 4.11	แสดง Mass Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อ

EtOAc	Ethyl Acetate
$CHCl_3$	Chloroform
CH_2Cl_2	Dichloromethane
EC_{50}	ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เชื้อโรคตาย 50 %
F	Fruit
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatography
H	Hexane
M	Methanol
Me	Methyl Group
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
TLC	Thin-Layer Chromatography
UV	Ultraviolet
nm	Nanometer
ZL	*Zanthoxylum Limonella* Alston

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

มนุษย์เรารู้จักการใช้สมุนไพรและเครื่องเทศมาตั้งแต่ก่อนคริสตกาลนับพันปี ชาวอียิปต์โบราณได้บันทึกวิธีการทำมัมมี่ไว้ในกระดาษปาปิรุส(papyrus) ว่าใช้เครื่องเทศหลายชนิดใส่ลงไปในท้องมัมมี่เพื่อรักษาศพมิให้เน่าเปื่อย ในอดีตพืชเครื่องเทศเคยเป็นพืชที่มีค่าเทียบเท่าทองคำ การแสวงหาอาณานิคม และการค้นพบดินแดนใหม่ๆ ในสมัยโบราณสาเหตุสำคัญประการหนึ่งคือความต้องการเครื่องเทศ ได้ถูกบันทึกไว้ในประวัติศาสตร์ อาทิ มาร์โคโปโล เดินทางไปหาซื้อเครื่องเทศถึงประเทศจีน จนเกิดเส้นทางสายไหม (Silk Routes) การค้นพบหมู่เกาะอินเดียตะวันตกของ โคลัมบัส เพราะการแสวงหาทองคำและเครื่องเทศ

สมุนไพรและเครื่องเทศได้เข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของปัจจัย 4 ในการดำรงชีวิต ในรูปแบบของอาหารและยารักษาโรค สังคมไทยสมัยโบราณมีการใช้สมุนไพรบำบัดรักษาอาการเจ็บป่วยต่างๆ หรือที่เรียกกันว่าเป็นการแพทย์แผนไทย ต่อมาได้มีการรับเอาการแพทย์แผนตะวันตกเข้ามา ทำให้ความรู้และการพัฒนาเกี่ยวกับสมุนไพรไทยขาดช่วงลง ทว่า ในสามทศวรรษที่ผ่านมาได้มีโรคใหม่ๆ ที่การคิดค้นพัฒนายารักษาโรคตามวิธีแพทย์แผนตะวันตก หรือการแพทย์แผนปัจจุบันไม่สามารถรักษาได้ จึงได้มีการย้อนกลับมาให้ความสนใจสมุนไพร และการแพทย์แผนโบราณอีกครั้ง

สมุนไพรของประเทศไทยมีคุณสมบัติในการที่จะนำมาผลิตเป็นยารักษาโรคได้มากกว่า 300 ชนิด แต่ขาดผู้ที่ให้ความสนใจ และการสนับสนุนจากภายในประเทศให้พัฒนาให้เป็นยารักษาโรค ผู้ที่ให้ความสนใจกลับกลายเป็นบริษัทยาจากต่างชาติ ที่เข้ามาศึกษาและนำสมุนไพรไทยมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคจดทะเบียนลิขสิทธิ์เป็นของตน เช่น บริษัทของเยอรมันที่นำหัวดองดึงส์ไปผลิตยารักษาโรครูมาติซัม บริษัทยาญี่ปุ่นที่นำใบหนุมานประสานกายและใบเปล้าน้อยไปผลิตเป็นยาและวางจำหน่ายทั่วโลก ซึ่งทำให้เกิดความสูญเสียโอกาสในการสร้างรายได้อย่างยั่งยืนแก่ประเทศชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ประโยชน์จากเครื่องเทศส่วนใหญ่มุ่งเน้นในด้านการปรุงแต่งรสชาดอาหารและใช้ในการถนอมอาหาร ทั้งนี้เพราะช่วยให้กลิ่นและรสชาดของอาหารดีขึ้น สรรพคุณทางยาหรือประโยชน์ทางด้านการแพทย์ของพืชเครื่องเทศ คือ มีสรรพคุณด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี นอกจากนี้ลักษณะเด่นของพืชเครื่องเทศคือ มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบ จึงได้มีการพัฒนาไปใช้ในวงการเครื่องสำอางด้วย

การใช้ประโยชน์ของพืชเครื่องเทศและสมุนไพรเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรค ให้มีผลการรักษาที่แน่นอน ต้องมีการสกัดสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มาใช้ในรูปของสารบริสุทธิ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในตัวยารักษาโรค

ต้นพริกหอม หรือ กำจัดต้น (*Zanthoxylum Limonella* (Alston)) เป็นพืชเครื่องเทศของไทยชนิดหนึ่ง ที่นิยมใช้กันในภาคเหนือเพื่อปรุงอาหาร โดยใช้ผลแห้งซึ่งมีกลิ่นหอม ในการดับกลิ่นคาวของอาหาร นอกจากนี้ในต่างประเทศยังได้มีการศึกษาพืชชนิดเดียวกันนี้ในส่วนเปลือก พบสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ทั้งต่อต้านเชื้อมาลาเรีย และพบน้ำมันหอมระเหยในผลและเมล็ด งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดจากผลกำจัดต้น ที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย การสกัด และการแยกส่วนประกอบทางเคมีนี้จะนำเทคนิคพื้นฐานทางด้านเคมีอินทรีย์มาประยุกต์ใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการแยกสารประกอบจากผลและเมล็ดกำจัดต้น
2. เพื่อหาโครงสร้างของส่วนประกอบทางเคมีของผลและเมล็ดกำจัดต้น

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของ ผลและเมล็ดของต้นกำจัดต้นที่น่าสนใจ มีผลในการรักษาโรค ถ้าผลการตรวจสอบทางเภสัชวินิจฉัยได้ผล จะนำไปสู่การศึกษารายละเอียดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการเตรียม และการเก็บรักษา สมุนไพรธรรมชาติ ที่จะใช้ในการวินิจฉัย
2. ทราบถึงวิธีการสกัด เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร
3. ทราบถึงวิธีแยกสารสำคัญ และการเก็บรักษาเพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของสาร
4. ทราบถึงวิธีการวิเคราะห์โครงสร้างของสารสำคัญในสมุนไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสมุนไพรและเครื่องเทศ

2.1.1 ความหมาย

สมุนไพร (Medicinal plants) ตามความหมายในพจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถานได้ให้คำจำกัดความของคำว่าสมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้เป็นเครื่องทำยา ซึ่งหาได้ตามพื้นเมือง ส่วนพระราชบัญญัติยา พ.ศ. 2522 และความหมายในตำหรับยาไทยให้ความหมายของ ยาสมุนไพร หมายถึงยาที่ได้จากพฤกษชาติ สัตว์ หรือแร่ ซึ่งยังไม่ได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ เช่น พืชก็ยังคงสภาพเป็นส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก หรือผลอยู่ ยังมิได้ผ่านการแปรรูปใดๆ ทั้งสิ้น แต่ในความเป็นจริงแล้วสมุนไพรมักถูกดัดแปลงเป็นรูปแบบที่แตกต่างกัน อาทิเช่น การตัดเป็นส่วนๆ การบดเป็นผง อัดเป็นเม็ด

เครื่องเทศ (Spices) หมายถึง ของหอมฉุน และรสเผ็ดร้อน ที่ได้จากต้นไม้ ใช้สำหรับทำยาและปรุงอาหาร ส่วนใหญ่เครื่องเทศจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากพืช ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการแต่งกลิ่นและรสอาหาร ส่วนของพืชที่นำไปใช้เป็นเครื่องเทศมีหลายส่วน เช่น เปลือกอบเชย เมล็ดลูกจันทร์ ผลพริกไทย ลำต้นใต้ดินของขิงและข่า เป็นต้น หากนำเครื่องเทศใดมาเป็นยารักษาโรคจะเรียกว่าเป็นสมุนไพร

2.1.2 การเก็บเกี่ยวพืชสมุนไพร

พืชสมุนไพร มีส่วนประกอบที่สำคัญได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด สรรพคุณของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการบำบัดโรคขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณสารสำคัญของพืชสมุนไพร ตัวยาที่อยู่ในพืชสมุนไพรจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่ง คือ ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บสมุนไพร การเก็บในช่วงระยะเวลาที่ไม่เหมาะสมจะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา แนวทางที่ใช้เป็นหลักทั่วไปของการเก็บเกี่ยวส่วนที่ใช้เป็นยาของพืชสมุนไพร ได้แก่

1. ส่วนราก หรือหัวสะสมอาหาร เป็นส่วนที่มีการสะสมสารสำคัญไว้ค่อนข้างสูง ควรเก็บเกี่ยวในช่วงที่พืชหยุดการเจริญเติบโต ส่วนอื่นๆ ของลำต้นหลุดร่วงหมด ซึ่งจะอยู่ในช่วงต้นฤดูหนาว ถึงปลายฤดูร้อนจะเป็นช่วงที่พืชสะสมสารสำคัญไว้ที่ส่วนรากและหัวสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ส่วนใบ ควรเก็บในช่วงที่พืชมีการเจริญเติบโตมากที่สุด หรือในช่วงที่ดอกตูมเริ่มบาน หรือบานเต็มที่ สารสำคัญในพืชบางชนิดจะมีมากในใบแก่ บางชนิดมีมากในใบที่ไม่อ่อนและไม่แก่จนเกินไป

3. ส่วนเปลือกต้น และเปลือกราก ในช่วงปลายฤดูร้อนต้นฤดูฝน จะเป็นช่วงที่มีการสะสมตัวยามากที่สุด การเก็บเปลือก ไม่ควรลอกออกรอบลำต้นเพราะจะส่งผลต่อการลำเลียงอาหารอาจทำให้พืชตายได้

4. ส่วนดอก บางชนิดจะเก็บในช่วงดอกเริ่มบานเช่น ดอกคำฝอย ดอกกระเจี๊ยบ บางชนิดเก็บในช่วงดอกตูม เช่น กานพลู

5. ส่วนผลและเมล็ด เก็บเกี่ยวตามลักษณะการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ผลฝรั่งดิบ กล้วยดิบ แต่ส่วนใหญ่แล้วมักจะเก็บเกี่ยวในช่วงที่ผลแก่เต็มที่ เช่น ผลมะแว้ง ดีปลี พริกหอม เมล็ดฟักทอง เป็นต้น

คุณภาพของสรรพคุณตัวยาสมุนไพรยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น พื้นที่ปลูก

2.1.3 การแปรสภาพและการเก็บรักษาสมุนไพร

เมื่อเก็บสมุนไพรแล้ว การรักษาตัวยาให้คงสภาพก่อนที่จะนำมาใช้เป็นสิ่งจำเป็น ดังนั้นจึงต้องมีวิธีการแปรสภาพ และเก็บรักษาสมุนไพรด้วยวิธีที่เหมาะสม โดยอาจใช้วิธีการ ผึ่งแดดให้แห้ง ผึ่งลมให้แห้งในที่ร่ม ต้มหรือนึ่งแล้วทำให้แห้ง หรือ อบให้แห้งด้วยตู้อบ

สมุนไพรที่มีแป้ง โปรตีน หรือ Enzyme เป็นองค์ประกอบมาก เช่น ขมิ้น กระชาย จะนิยมทำการเปลี่ยนสภาพเอนไซม์ ด้วยการนึ่ง ก่อนทำให้แห้ง การทำให้แห้งต้องคำนึงถึงการรักษาตัวยาไม่ให้สลายตัวไปก่อนนำไปใช้ประโยชน์ โดยการใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม ดังนี้

1. ส่วนของผลและเมล็ด ใช้อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส
2. ส่วนของราก กิ่ง เปลือก ใช้อุณหภูมิ 30-65 องศาเซลเซียส
3. ส่วนของดอก ใบ และลำต้น ใช้อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส หรือใช้การผึ่งในที่ร่ม
4. สมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหย เช่น กระเพรา ตะไคร้หอม พริกหอม ใช้อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส
5. สมุนไพรที่มีสารสำคัญเป็นแอลคาลอยด์ หรือ ไกลโคไซด์ เช่น มะขามแขก ดองดึงส์ ใช้อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส

หลังจากสมุนไพรแห้งดีแล้ว (ความชื้น < 5 %) ควรเก็บในภาชนะที่ป้องกันความชื้น และอากาศเข้าไปทำปฏิกิริยาทำให้สมุนไพรเสื่อมคุณภาพ โดยเก็บในที่แห้งเย็น และอากาศถ่ายเทได้ดี ป้องกันแมลงและสัตว์เลี้ยงทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2. ตัวยาและสารสำคัญในพืชสมุนไพร

สรรพคุณของพืชสมุนไพร ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณสารสำคัญ ซึ่งเป็นสารประกอบเคมีที่มีอยู่ในพืช โดยปริมาณสารจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สิ่งแวดล้อมที่ปลูกตลอดจนช่วงระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวสมุนไพร สารประกอบเคมีที่พบในพืชสมุนไพรจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

2.2.1 **สารปฐมภูมิ** (Primary Metabolite) พบในพืชทุกชนิด จัดเป็นสารที่มีบทบาทในขบวนการ Metabolism หลักทั่วๆ ไปของพืช เช่น กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง การสังเคราะห์โปรตีน ไขมัน รงควัตถุ ซึ่งจะทำให้ได้สารจำพวก คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และรงควัตถุ สารเหล่านี้จัดเป็นสารปฐมภูมิของพืช

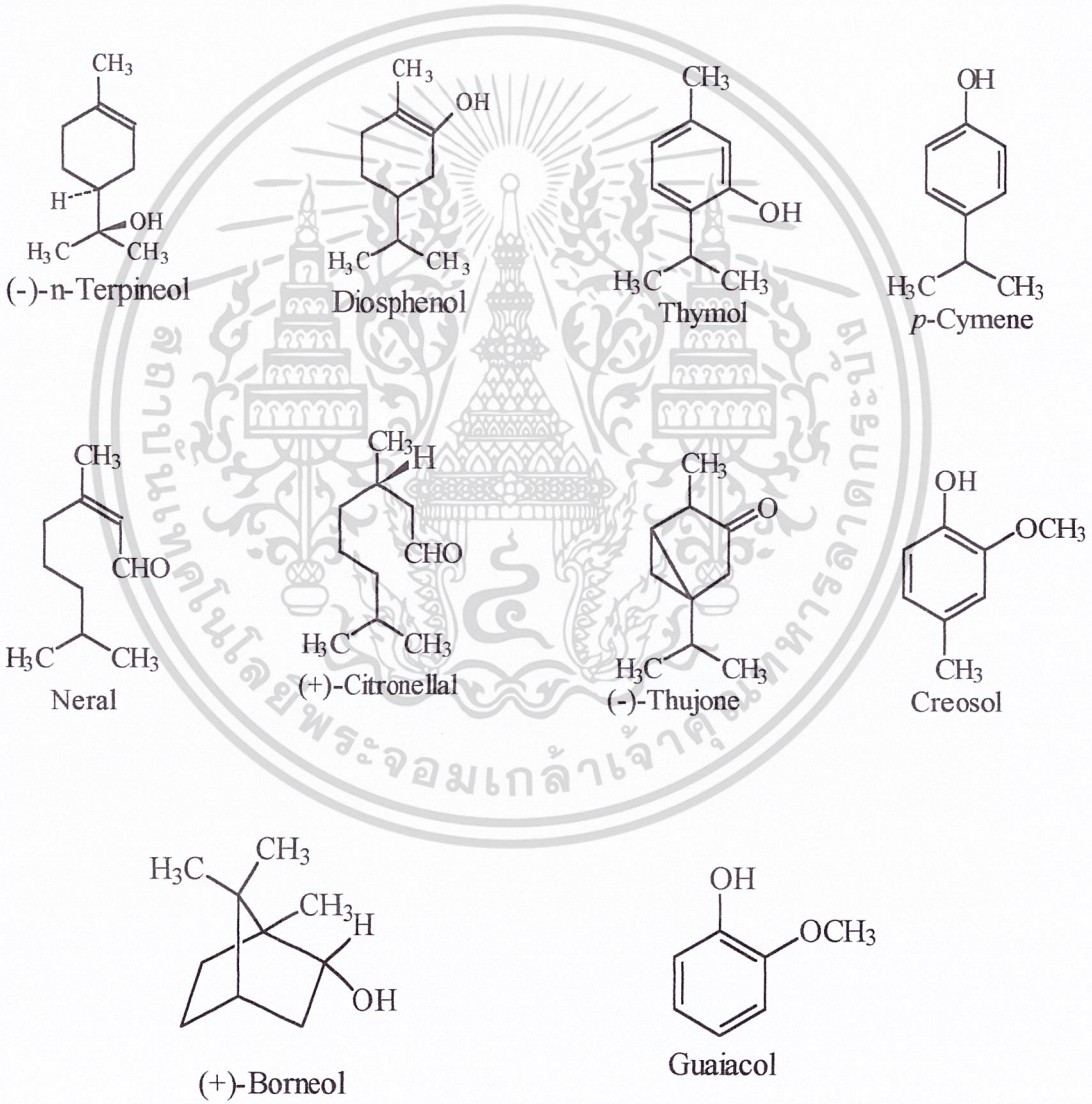
2.2.2 **สารทุติยภูมิ** (Secondary Metabolite) เป็นสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นแตกต่างไปจากสารปฐมภูมิ โดยอาจเกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ในพืชต่างชนิดกันจะพบสารต่างกัน เช่น พบสารอัลลิซิน(Allicin) ในกระเทียม พบสารคาเฟอีน (Caffeine) ในกาแฟ เป็นต้น สารประกอบเคมีในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารจำพวกแอลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ สเตียรอยด์ กัม แทนนิน ลาเท็กซ์ น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น

สารประกอบเคมีในพืชสมุนไพร มีมากมายแต่มักพบว่าสารที่มีสรรพคุณทางยา จะเป็นสารในกลุ่มทุติยภูมิ ซึ่งสารทุติยภูมิที่สำคัญ ได้แก่

1. น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil หรือ Volatile Oil)
2. แอลคาลอยด์ (Alkaloid)
3. ไกลโคไซด์ (Glycoside)
4. แทนนิน (Tannin)
5. กัม (Gum)
6. ลาเท็กซ์ (Latex)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

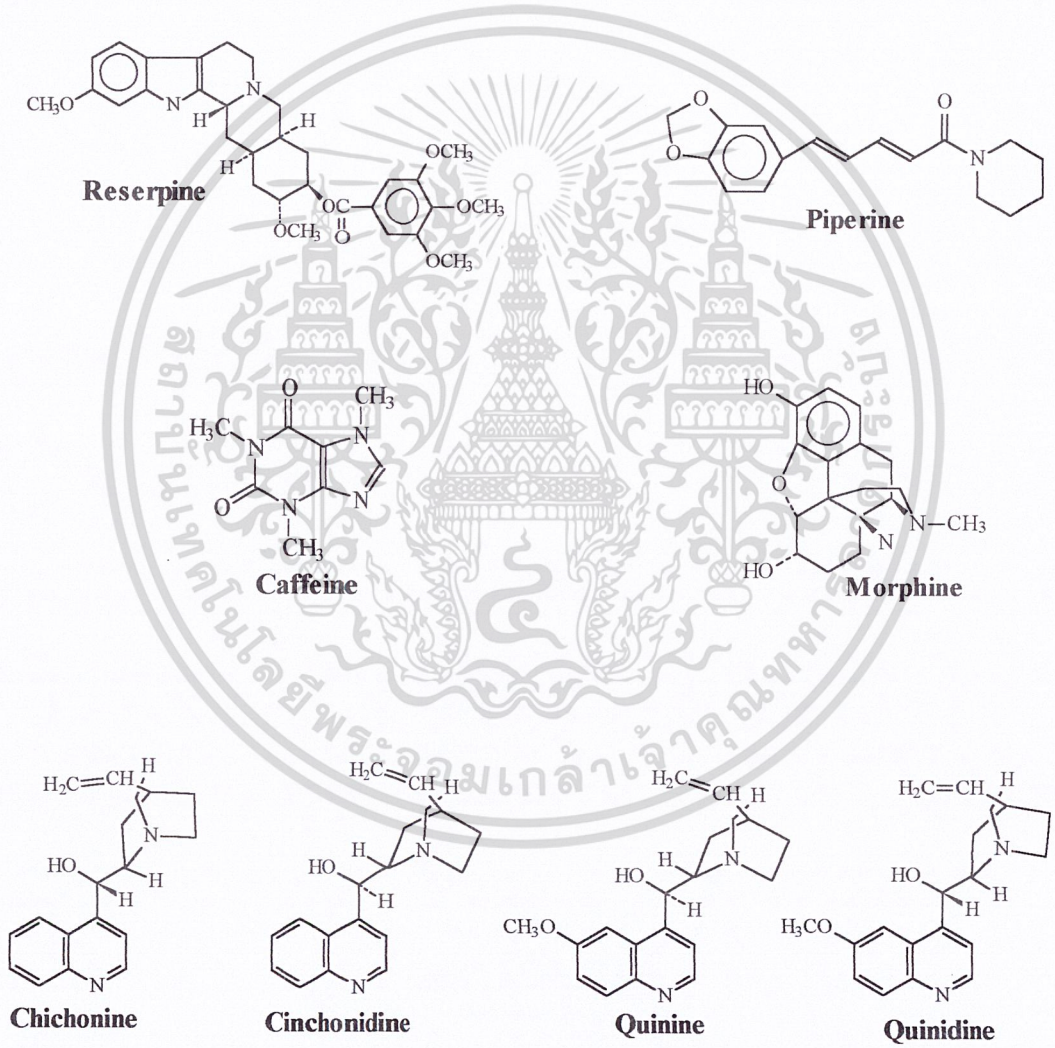
1. น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil หรือ Volatile Oil) จัดเป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืชหลายชนิด คุณสมบัติโดยทั่วไปมีกลิ่นเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิปกติ มักมีน้ำหนักเบากว่าน้ำ พบมากในพืชสมุนไพร พวกเครื่องเทศ สามารแยกออกมาได้ด้วยการกลั่นไอน้ำ (Steam Distillation) ในน้ำมันอาจมีส่วนผสมของสารเคมีหลายชนิด สรรพคุณทางยามักใช้เป็นยาขับลมและฆ่าเชื้อโรค ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ให้น้ำมันหอมระเหยได้แก่ กระเทียม ขิง ข่า ตะไคร้ มะกรูด ไพล สะระแหน่ ขมิ้น และพริกหอม เป็นต้น



ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างขององค์ประกอบบางชนิดของน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **แอลคาลอยด์** (Alkaloid) เป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นเบส ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ถ้าอยู่รูปของเกลือ จะละลายน้ำได้ สารในกลุ่ม Alkaloid ที่มีผลทางยาต่อระบบต่างๆ ในร่างกาย เช่น Atropine จากต้นลำโพง ลดการบีบตัวของลำไส้ Reserpine ในรากกระย่อม มีสรรพคุณลดความดันโลหิต Quinine จากเปลือกต้นซิงโคนา มีสรรพคุณในการรักษาโรคมาลาเรีย



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของสารแอลคาลอยด์บางชนิด

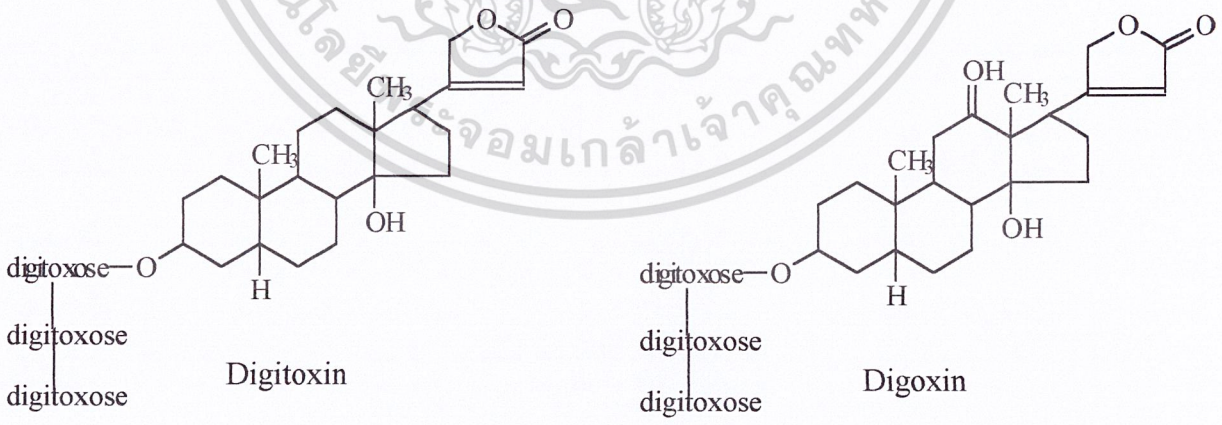
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ไกลโคไซด์ (Glycoside) เป็นสารประกอบอีกชนิดหนึ่งที่พบมากในพืชสมุนไพร นำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง ในสูตรโครงสร้างของสารจะมีส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล และส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (Aglycone) แบ่งตามฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ดังนี้

- Flavonoid เป็นสารที่เป็นรงควัตถุในส่วนต่างๆของพืช มีหลายชนิด เช่น สีน้ำเงิน สีแดง สีม่วง เป็นสารจำพวก anthocyanin

- Saponin สารจำพวกนี้เมื่อเขย่ากับน้ำจะเกิดฟอง จึงสามารถใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว และทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ ในทางเภสัชใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ สเตียรอยด์ สมุนไพรที่ให้สารจำพวกนี้ได้แก่ พืชจำพวก กลอย (Dioscorea spp.)

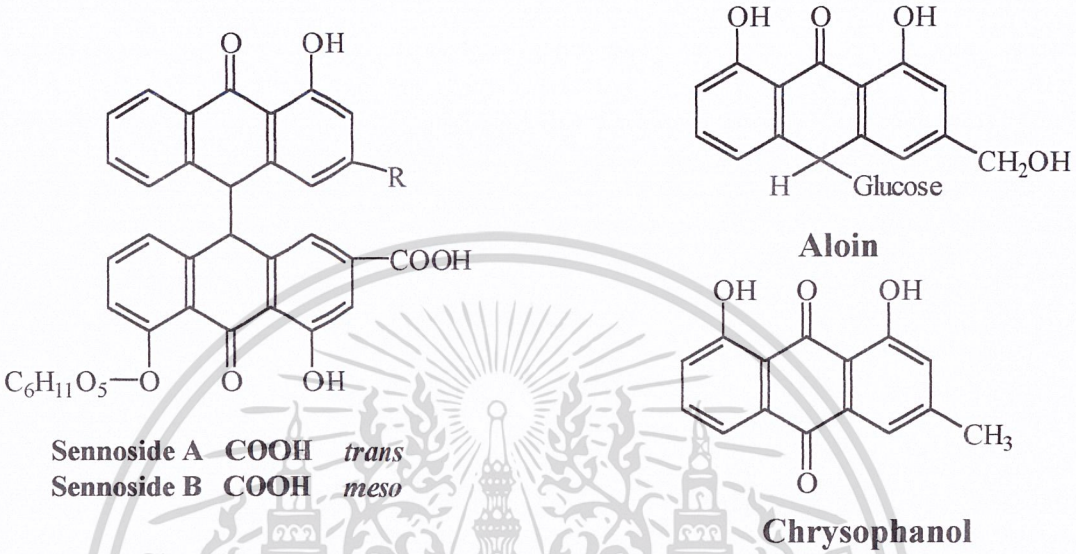
- Cardiac Glycoside ออกฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจ และระบบการไหลเวียนของโลหิต เช่น Oleandroside จากต้น ยี่โถ Thervetin B จากต้นตีนเป็ดน้ำ



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของ cardiac glycoside บางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Anthraquinone Glycoside ออกฤทธิ์เป็นยาระบาย (laxative) ยาฆ่าเชื้อ (antibiotic) และสีย้อม พืชสมุนไพรที่ให้สารจำพวกนี้ได้แก่ มะขามแขก โกฐน้ำเต้า คูน ขี้เหล็ก



Sennoside A COOH *trans*
Sennoside B COOH *meso*

Aloin

Chrysophanol

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของ แอนทราควิโนนที่พบในพืช

- Cyanogenetic Glycoside เมื่อสลายตัวจะให้สารพิษจำพวก Cyanide เช่น มันสำปะหลัง ลูกกระ ต้นตำแย ผักเสี้ยนผี ใบยางพารา ฝักสะตอ

- Lactone Glycoside เป็นสารที่มีกลิ่นหอม เช่น Coumarin จากเปลือกต้นชะลูด ใช้ผสมในเครื่องสำอาง เป็นส่วนผสมในครีมป้องกันการแพ้แสงแดด

4. Tannin พบทั่วไปในพืช มีรสฝาด มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ สรรพคุณทางยา มีฤทธิ์ฝาดสมาน ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย บรรเทาอาการท้องร่วงได้ พบในใบฝรั่ง กล้วยน้ำว้า

5. Gum เป็นสารเหนียวที่พืชขับออกมา เมื่อได้รับบาดแผล

6. Latex เป็นสารที่มีลักษณะคล้ายน้ำยางสีขาวข้น ประกอบด้วย สารจำพวก แป้ง กัม เรซิน สารในกลุ่มนี้เมื่อรวมตัวกับสารบางชนิดจะเกิดเป็น Co-carcinogen

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร
(Isolation, Separation and Identification of Active Principles from Medicinal Plants

มนุษย์เราได้รู้จักการนำพืชมาใช้เป็นยามาตั้งแต่สมัยโบราณ ปัจจุบันวิทยาศาสตร์ได้ก้าวหน้าขึ้น และสามารถในการนำเอาสารบริสุทธิ์จากต้นพืชมาใช้ การนำสารบริสุทธิ์มาใช้เป็นยาจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนต่างๆ คือ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)
2. การสกัด (Extraction)
3. การทำให้สารเข้มข้น (Concentration)
4. การแยกส่วนประกอบ (Separation)
5. การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification)

2.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชนับเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ซึ่งต้องคำนึงถึง สิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ได้แก่

1. การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง
2. ไม่มีพืชอื่นปน เพราะจะทำให้ได้สารแปลกปลอม อาจเป็นสารอันตรายได้
3. ไม่มีโรคพืช
4. ความแตกต่างของสารสำคัญในพืช (Variation of plant constituents) ในการเก็บพืชแต่ละครั้งเพื่อนำมาสกัดสารสำคัญในพืชอาจแตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิด ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น ความแตกต่างเนื่องจากสายพันธุ์ แหล่งที่ปลูก
5. ผลของการเก็บรักษาและเตรียมพืช (Effect of preserving and processing process) ในระหว่างการเก็บสมุนไพรควรควบคุมให้มีน้ำอยู่น้อยกว่า 5% เพื่อลดการทำงานของ Enzyme ที่จะไปสลายสารสำคัญในพืช เช่น Glycoside แต่การทำพืชให้แห้งบางครั้งจะทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเสียไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมตัวอย่างพืชมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1.1 การทำสมุนไพรให้แห้ง

โดยทั่วไปแล้ว การสกัดจะได้ผลดีเมื่อเราสามารถสกัดสารจากพืชสด โดยการนำเอาพืชสดที่เก็บมาต้มกับ Alcohol เพื่อทำลาย Enzyme เสียก่อนนำไปสกัด หรือ เก็บพืชสดมาแช่ Alcohol ระหว่างที่ไม่ได้สกัด แต่วิธีการเหล่านี้ไม่สะดวกและไม่เหมาะกับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องนำเอาตัวอย่างพืชสดมาทำให้แห้งก่อน โดยต้องใช้วิธีการทำให้แห้งโดยใช้เวลาน้อย อุณหภูมิต่ำๆ อาจทำได้หลายวิธี เช่น

- Air Drying เป็นการทำให้แห้งในอากาศ อาจเป็นการทำให้แห้งในที่ร่ม (Shade drying) หรือผึ่งแดด(sun drying)

- Artificial heat เป็นการทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากพลังงานอื่น เช่น ไฟฟ้า ได้แก่ การทำให้แห้งโดยใช้ตู้อบ ซึ่งจะมีการควบคุมอุณหภูมิ และอากาศที่ผ่านเข้าออก

2.3.1.2 การแตกย่อยเนื้อเยื่อ (Disintegration of Tissue)

เป็นขบวนการแตกย่อยเนื้อเยื่อของพืชให้มีขนาดเล็กลง อาจทำได้หลายวิธีคือ

1. การย่อยเชิงกล (Mechanical method) ได้แก่ การบด ด้วยโกร่ง หรือเครื่องบดไฟฟ้า

2. การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzyme Disintegration) เป็นวิธีการย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้ Enzyme ชนิดต่างๆ เช่น เอนไซม์สำหรับย่อย pectin cellulose เป็นต้น

3. การย่อยโดยใช้สารเคมี (Chemical disintegration) เช่น ใช้ Dimethyl formamide ทำให้เซลล์ Chlorella แตก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดี และข้อจำกัดแตกต่างกัน ดังนี้

2.3.2.1 Maceration เป็นขบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือ โถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (Marc) ให้มากที่สุด รวมสารที่สกัดได้นำไปกรอง วิธีนี้มีข้อดีคือ สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.3.2.2 Percolation เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เมื่อพองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุผงยาทีละชั้นลงใน Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับอยู่สูงกว่าสมุนไพรประมาณ 0.5 cm ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขสารละลายออก และควรเติมให้ตัวทำละลายอยู่เหนือสมุนไพรเสมออย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบเอาสารสกัดออกมาให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

2.3.2.3 Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในขวดก้นกลมระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน Extracting สูงถึงระดับ จะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในขวดก้นกลม วนเวียนเรื่อยๆ เกิดการสกัดสมบูรณ์ วิธีนี้มีข้อดีคือ ประหยัดตัวทำละลาย แต่มีข้อเสีย คือ ความร้อนที่ใช้อาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

2.3.2.4 Liquid-Liquid Extraction เป็นการสกัดสารจากสารละลายที่เป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

- Extract lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัด เบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร
- Rafinate lighter คือ ตัวทำละลายที่ใช้สกัดน้ำหนักเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.5 การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil)

2.1 Mechanical Expression หรือ การบีบ

2.2 Resorption เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีดูดซับ โดยมาใช้สกัดกลีบดอก

2.3 Solvent Extraction เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น สกัดน้ำมันกานพลูโดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์

2.4 Steam Distillation เป็นการกลั่นโดยใช้ไอน้ำ โดยผ่านไอน้ำบนสมุนไพรซึ่งบรรจุไว้ใน flask พร้อมกับไอน้ำ ไอน้ำจะพาเอาน้ำมันหอมระเหยไปยัง condenser แล้วกลั่นตัวเป็นของเหลว เมื่อทิ้งไว้น้ำมันจะแยกตัวออกจากน้ำ

2.5 Water distillation เป็นวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรโดยต้มกับน้ำ เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหยระเหยขึ้นไปถึง condenser จะกลั่นตัวแล้วจึงนำของเหลวที่ได้ไปแยกน้ำมันหอมระเหยจากชั้นน้ำ เครื่องมือที่ใช้คือ Cleveneaur's apparatus ซึ่งมีทั้งชนิดสำหรับน้ำมันหอมระเหยที่เบากว่าน้ำและสำหรับน้ำมันหอมระเหยที่หนักกว่าน้ำ

การเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัด

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่เหมาะสมควรมีคุณสมบัติ

1. เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้ดีพอ
2. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
3. ไม่เป็นพิษ
4. ราคาไม่แพง

ในการเลือกใช้ตัวทำละลายเราอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้คือ

1. สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน
2. ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด และละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด
3. แรง ซึ่งเกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจาก Transient charger induce ในโมเลกุล พวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะประกอบด้วยโมเลกุลซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้สารที่ไม่มีขั้วแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

3.2 Dipole-Dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายมีขั้ว

3.3 พันธะไฮโดรเจน (H- Bonding)

โดยทั่วไปแล้วตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะสมกับสารที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมาะสมกับสารที่มีขั้ว การผสมระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว หรือ ขั้วน้อยกว่า อาจทำให้การละลายดีขึ้น

ตัวทำละลายที่ใช้กันมากได้แก่

1. เฮกเซน เหมาะสำหรับสารที่ไม่มีขั้ว มักเป็นตัวทำละลายที่ใช้สำหรับกำจัดไขมันออกจากสมุนไพร ข้อดี คือราคาถูก
2. คลอโรฟอร์ม เป็นตัวทำละลายที่ดี คือละลายสารออกมาได้มาก แต่มี selectivity น้อย เกิดเป็น อิมัลชันได้ง่าย ถ้าใช้สกัดสารที่เป็นด่างอาจเกิดการสลายตัว
3. อีเทอร์ มีความสามารถในการละลายสารได้น้อยกว่าคลอโรฟอร์ม แต่มี selectivity ดีกว่า ข้อเสียคือ ระเหยง่าย เกิดออกไซด์ได้ง่าย และดูดน้ำได้มาก
4. แอลกอฮอล์ ที่ใช้มากคือเมทานอล และเอทานอล เป็น all purpose solvent เนื่องจากมีอำนาจการละลายกว้างมาก และยังใช้ทำลายเอนไซม์ในพืชด้วย

2.3.3 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วสารสกัดที่ได้มักมีปริมาตรมากและเจือจาง จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี คือ

1. Free Evaporation คือการระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือ hotplate
2. Distillation in vacuum เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงเกือบเป็นสุญญากาศ โดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary Evaporator
3. Ultrafilltration เป็นการทำให้สารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้ membrane ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 การแยกส่วนผสมทางเคมีของสารสกัด

ในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิด ดังนั้นสารสกัดที่ได้ในเบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมี เพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์จึงต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์ต่างๆ ซึ่งการแยกอาจทำได้โดย

1. Chemical means โดยอาศัยคุณสมบัติ และปฏิกิริยาทางเคมีที่แตกต่างกัน แยกสารออกจากกันได้ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง
2. Physical means เป็นการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ที่แตกต่างกัน เช่น
   2.1 Distillation เป็นการกลั่นเพื่อแยกเอาสารที่ระเหยได้ออกจากสารที่ไม่ระเหย หรือแยกสารที่มีจุดเดือดแตกต่างกัน
   2.2 Steam Distillation เป็นการแยกน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ
   2.3 Sublimation เช่น การแยกคาเฟอีนจากแอลคาลอยด์อื่นที่ไม่ระเหิดจากใบชา
   2.4 Solvent Separation เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยหลักการละลายในตัวทำละลายที่แตกต่างกันของสาร
   2.5 Solvent/solvent Precipitation เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยหลักการละลายและการตกตะกอนในตัวทำละลายที่แตกต่างกันของสาร โดยนำสารสกัดละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม แล้วเติมตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งที่สารสกัดละลายได้น้อยกว่าลงไป

2.3.5 การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification)

2.3.5.1 Preliminary Examination – ตรวจสอบ สถานะ (Physical State), สี (Color) ดูมีของสาร และสีที่เปลี่ยนไปขณะหาจุดเดือด สีอาจแสดงถึงโครงสร้างของสารที่มี Chromophore หรือสารมีการปนเปื้อน, และ กลิ่น (Odor) - กลิ่นของสาร สารที่มีกลิ่นมักมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยระเหยได้ง่าย

2.3.5.2 Ignition Test - ดูการติดไฟของสาร ว่าเกิดการระเบิดหรือไม่ หลอมเหลวอย่างไร เถ้าที่เหลือจากการเผา

2.3.5.3 Physical Property ได้แก่ การหาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ต่างๆ เช่น จุดหลอมเหลว จุดเยือกแข็ง ความถ่วงจำเพาะ, refractive index, optical rotation, น้ำหนักโมเลกุล โดยน้ำหนักโมเลกุลอาจหาได้จากเทคนิค Mass Spectroscopy

2.3.5.4 Chromatography โดยการเปรียบเทียบ retention time หรือ R_f กับ known compound โดยเฉพาะ HPLC เริ่มมีบทบาทมากขึ้นในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.4 Chromatography

โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคการแยก และตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่ค้นพบตั้งแต่ศตวรรษที่ 17 โครมาโตกราฟีที่ค้นพบชนิดแรก คือ Ion exchange Aristotle โดยใช้ดิน (earth) ในการทำให้น้ำทะเลบริสุทธิ์ หรือ ใช้ผงถ่านทำน้ำจากหัวบีทให้บริสุทธิ์ Tswett (1901) เป็นผู้ใช้คำว่า Chromatography เป็นคนแรก โดยได้ทำการแยกสีย้อมโปรตีน แต่ไม่มีผู้นิยมนัก จนกระทั่งในปี 1931 ที่ผู้สามารถแยก คาโรตีนอยด์ (carotenoid) ได้สำเร็จ จึงได้มีผู้สนใจและนำเทคนิคนี้มาแยกสารต่างๆ ตลอดจนแยกสารสำคัญต่างๆจากพืช

โครมาโตกราฟีเป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารในระหว่างเฟส 2 เฟส ที่ต่างกัน คือ Stationary Phase และ Mobile Phase สารจะเคลื่อนที่ (Migrate) ไปบน Stationary phase ด้วยการพาของ Mobile phase สารแต่ละชนิดจะมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาระหว่างสารกับ Stationary phase และระหว่างสารกับ Mobile phase สารที่เกิดอันตรกิริยา กับ Stationary Phase ได้ดีก็จะเคลื่อนที่ได้ช้า อันตรกิริยานี้อาจเกิดโดยกระบวนการต่อไปนี้

1. การดูดซับที่ผิว
2. การดูดซึมเข้าช่องว่าง ของ Stationary phase
3. การกระจายตัว เข้าไปในของเหลวที่เคลือบอยู่ที่ผิวของ Stationary phase
4. การสร้าง Heteropolar bond กับ ion ของ Stationary Phase
5. การระเหย (Volatility)

Stationary Phase

มี 2 ชนิดคือ เป็นของแข็ง หรือของเหลวเคลือบบนของแข็ง ของแข็งที่ใช้กันมาก ได้แก่

1. Silica Gel หรือ Kieselgel Silica gel จะมีหมู่ Sylanol (-SiOH) ทำหน้าที่เป็น active site เหมาะสำหรับแยกสารที่เป็นกรด และเป็นกลาง อาศัยการแยกทั้ง partition และ adsorption

2. Alumina ใช้สำหรับแยกสารที่เป็นด่าง หรือนำมาผสมกับน้ำจะเป็นการ deactivate สามารถแยกพวก น้ำตาล หรือ กรดอะมิโนได้

3. Diatomaceous earth มักใช้เป็น solid support โดยมากใช้แยกสารที่มีขั้ว

4. Cellulose และ อนุพันธ์ ใช้กับสารที่ละลายน้ำ สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล หรือ แอลกอฮอล์ หรือ น้ำ ได้

5. Polyamide เป็นพอลิเมอร์ใช้แยกสารพวก phenolic compound

6. Ion exchange resin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

40073

การเลือก Adsorbent เราต้องคำนึงถึงคุณสมบัติต่อไปนี้

1. ความมีขั้วของสาร
2. ความเป็นกรด-ด่าง
3. ปฏิกิริยาเคมีระหว่าง adsorbent กับสาร หรือสารกับ Mobile Phase

โดยทั่วไปสารที่ละลายน้ำ หรือมีขั้วสูงจะใช้ Cellulose, Polyamide ส่วนสารที่มีขั้วต่ำๆ ไม่ละลายน้ำ จะใช้ Alumina, Silica Gel

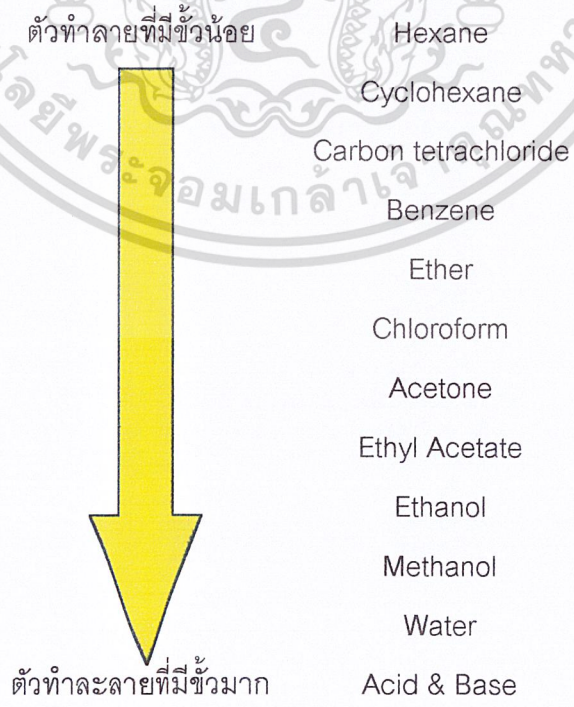
Mobile Phase

อาจจะเป็นก๊าซ หรือของเหลว อาจเรียกว่า Solvent, wash liquid, developer หรือ eluent ก็ได้ Mobile phase ที่ใช้ในงานเป็น chromatographic grade ถ้าใช้ analytical grade อาจจะต้องนำไปกลั่นในเครื่องกลั่น ที่ทำด้วยแก้วอีกครั้งหนึ่งก่อน หรือผ่าน Alumina column

Mobile phase ที่ใช้ใน chromatography แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. Isocratic เป็นตัวทำละลายเดี่ยว หรือเป็นส่วนผสมของตัวทำละลาย โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นขั้วของตัวทำละลาย
2. Gradient เป็นการใช้ ตัวทำละลาย ซึ่งเป็นส่วนผสมของตัวทำละลาย 2 ชนิดขึ้นไป เพื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นขั้วของตัวทำละลาย

ตัวทำละลายอาจจัดเรียงลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามากได้ดังนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 Thin-layer Chromatography (TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้ Stationary phase ซึ่งแผ่เป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว aluminum หรือ polyethylene เมื่อ spot สารลงบน Stationary phase แล้ว จึงนำแผ่น TLC ไปใส่ใน Tank ซึ่งบรรจุ Mobile Phase ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการ development คือ ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบน Stationary phase ผ่าน spot สาร และแยกสารออกจากกัน โดยอาศัยทั้งกลไก partition และ adsorption

ประโยชน์ของ TLC ในการศึกษาสารเคมีจากสมุนไพร

1. ใช้วิเคราะห์สารเบื้องต้นว่ามีกี่ชนิด และบางครั้งอาจบอกได้ว่าเป็นสารประเภทใด
2. ใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ เพื่อหาระบบตัวทำละลาย (Solvent System) สำหรับ column chromatography
3. ใช้ตรวจสอบ fraction ที่ได้จาก column chromatography เพื่อรวม fraction ที่เหมือนกัน
4. แยกสารบางชนิดที่มีปริมาณน้อย

2.4.2 Column Chromatography

เป็นวิธีการแยกสารโดยให้สารเคลื่อนที่ไปบน Stationary phase ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วกลวง (Column) เส้นผ่าศูนย์กลาง และความยาวขึ้นอยู่กับปริมาณของสารและความยากง่ายของการแยก ถ้าคอลัมน์ยิ่งยาวการแยกจะดีขึ้น Stationary Phase ที่ใช้ก็เช่นเดียวกับ TLC โดยใช้อัตราส่วนของ สาร: adsorbent ประมาณ 1: 30 หรืออาจมากกว่านี้ถ้าสารที่แยกมีคุณสมบัติคล้ายกันมาก Column Chromatography เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำให้สารบริสุทธิ์

2.4.3 Gas Chromatography

เป็น Chromatography ซึ่ง mobile เป็น Gas สารที่ต้องการจะถูกก๊าซพาไปบนคอลัมน์ เกิดการกระจายตัวอยู่ระหว่าง stationary phase และ Mobile phase ได้ไม่เท่ากัน จึงถูกแยกออกจากกันได้

ในการใช้ Gas Chromatography สารผสมที่จะแยกต้องระเหยได้ ถ้าไม่ระเหยต้องทำให้เป็นอนุพันธ์ที่ระเหยได้ ประโยชน์ของ GC ในด้านสมุนไพร คือ ใช้ตรวจสอบชนิด คุณภาพ และส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 กำจัดต้น (Zanthoxylum Limonella Alston)

ภาพที่ 2.5 ต้นกำจัดต้น (Zanthoxylum Limonella Alston)

กำจัดต้น (Zanthoxylum Limonella Alston)

เป็นพืช ในตระกูล Zanthoxylum ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นที่มีมากมาย กว่า 200 ชนิด กระจายตัวอยู่ในเขตป่าร้อนชื้น เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย และ ไทย

ชื่ออื่น มะแขว่น (ภาคเหนือ), พริกหอม, กำจัด, กำจัดต้น (ภาคกลาง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 10-15 เมตรมีกิ่งก้านสาขา

ใบ ใบเดี่ยวรูปไข่

ดอก เป็นช่อ

ผล กลมขนาดเท่าเมล็ดพริกไทย เปลือกสีแดง ออกดอกเป็นช่อ เมื่อแก่จะแตกออก มีเมล็ดกลมเล็ก สีดำ ผิวมัน

ภาพที่ 2.6 ต้นกำจัดต้น (*Zanthoxylum Limonella* Alston)

เอกสารนี้ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.7 ผลและเมล็ดกำจัดต้น (*Zanthoxylum Limonella* Alston)

การขยายพันธุ์ ใช้เมล็ด

ฤดูกาลเก็บส่วนขยายพันธุ์ ตุลาคม-พฤศจิกายน

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต
ขึ้นตามป่าโปร่งและป่าเบญจพรรณ

การใช้ประโยชน์

ทางอาหาร ใบอ่อน รับประทานเป็นผักสดจิ้ม ร่วมกับน้ำพริกปลาร้า ลาบ และก้อย
ผลแห้ง เป็นเครื่องเทศผสมกับลาบ พลู ยำต่างๆ และเครื่องแกงแค เช่น ใส่เป็นเครื่องเทศแกงอ่อมไก่ แกงอ่อมเนื้อ

ทางยา ใบ แก้รำมะนาด แก้ปวดฟัน
เมล็ด แก้ลม วิงเวียน บำรุงโลหิต บำรุงหัวใจ ขับลมในลำไส้ ขับปัสสาวะ บำรุงธาตุ ถอนพิษ ฟกช้ำบวม แก้หนองใน
รากและเนื้อไม้ ขับลมในลำไส้ แก้ลมเบื้องบน หน้ามืด ตาลาย วิงเวียน ขับระดู

ฤดูกาลที่ใช้ประโยชน์ ช่วงปลายฤดูฝน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

Jirovetz และผู้ร่วมงาน จากมหาวิทยาลัยเวียนนา ประเทศออสเตรีย ได้ทำการศึกษา น้ำมันหอมระเหยจาก เมล็ดของ *Zanthoxylum rhetsa* ในประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นพืชในตระกูลเดียวกับกำจัดต้น ด้วย GC-FID และ GC-MS พบสารจำพวก Monoterpene เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ sabinene, limonene, pinene, p-cymene และ terpenines และ Monoterpene alcohol ที่สำคัญคือ terpenine-4-ol และ alpha-terpineol[5]

H.Shibuya, Y.Takeda, I.Kitakawa ชาวญี่ปุ่น ได้ทำการศึกษาเปลือกของ *Zanthoxylum Rhetsa* ในประเทศอินโดนีเซีย พบสารจำพวก phenylpropanoids ชนิดใหม่ คือ O-geranylsinnapyl alcohol และ O-generanylconiferyl alcohol และสารจำพวก acid amide ชนิดใหม่ คือ Hazaleamide คณะวิจัยได้ทำการศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี และผลทดสอบทางเภสัชวินิจฉัยพบว่า Hazaleamide ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อพลาสโมเดียม ฟัลซิปารัม[6]

ในประเทศไทย พืชจำพวก กำจัดต้น ยังไม่ได้รับการศึกษาวิจัยกันแพร่หลาย เนื่องจากเป็นพืชพื้นเมืองที่ไม่เป็นที่รู้จักกันมากนัก การศึกษาส่วนประกอบที่สำคัญของสมุนไพรไทย จึงต้องอาศัยความรู้ในระดับภูมิปัญญาชาวบ้าน หรือ ตำราแพทย์แผนโบราณ เป็นแนวทางการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane)
2. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
3. เมทานอล (Methanol)
4. เอทธิล อะซิเตด (Ethyl Acetate)
5. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
6. 2-บิวทานอล (2-butanol)
7. แอนนิซาลดีไฮด์ (Anisaldehyde)
8. แอบโซลูท เอททานอล (Absolute Ethanol)
9. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. Sulfuric Acid)
10. น้ำกลั่น (distilled water)
11. ซิลิกาเจล เบอร์ 7729
12. ซิลิกาเจล เบอร์ 7734
13. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium Sulfate)

3.1.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. ขวดโหล
2. ขวดก้นกลม
3. ขวดรูปชมพู่
4. หลอดทดลอง
5. กระบอกตวง
6. ปิเปต
7. บีกเกอร์
8. หลอดหยด
9. แท่งแก้วคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Vial
11. แผ่นกระจกใส
12. กรวยกรอง
13. Capillary Tube
14. TLC Tank
15. TLC Plate (Silica Gel on Aluminium เบอร์ 5554)
16. กระดาษกรอง
17. ช้อนตักสาร
18. Rotary Evaporator
19. Aspirator
20. ชุดปั๊ม
21. Hot Plate
22. Stand + Clamp
23. คอลัมน์
24. UV Spectrometer
25. NMR Spectrometer
26. เครื่องหาจุดหลอมเหลว

3.2 ขั้นตอนงานวิจัย

1. เตรียมตัวอย่างพืช
2. แช่ในตัวทำละลายจากขั้วต่ำไปสูง เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เมทานอล 7 วัน
3. ทำสารสกัดให้เข้มข้น โดยระเหยตัวทำละลายด้วย Rotary Evaporator เรียกส่วนนี้ว่า สารสกัดเบื้องต้น หรือ Crude Extract
4. แบ่งสารสกัดที่ได้ส่งทดสอบฤทธิ์ทางยา ดังต่อไปนี้
   4.1 ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านมาลาเรีย
   4.2 ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านวัณโรค
5. หาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC)
6. แยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
7. วิเคราะห์หาโครงสารของสารองค์ประกอบด้วยเทคนิค NMR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียม สารสกัด ในแต่ละชั้นตัวทำละลายต่างๆ

1. นำผลและเมล็ดแห้งของต้นพริกหอมมาบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า นำมาชั่งน้ำหนัก แล้วแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน เป็นเวลา 7 วัน หมั่นคนทุกวัน

2. กรองแยกกาก และชั้นตัวทำละลายด้วยผ้าขาวบาง บีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด แล้วนำชั้นตัวทำละลายมากรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง กากที่ได้นำไปผึ่งให้แห้ง

3. นำชั้นตัวทำละลายที่กรองแล้วไประเหยตัวทำละลายด้วย Rotary Evaporator ด้วยอุณหภูมิ 30-40 ^{o}C จนแห้งจะได้ สารสกัดเบื้อง (Crude Extract)

4. ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ ให้รหัสเป็น ZR(F)/H

5. นำกากที่ผึ่งแห้งแล้วในข้อ 3 มาสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น ได้แก่ คลอโรฟอร์ม, เมทานอล ด้วยวิธีการเดียวกันกับตัวทำละลาย เฮกเซน

6. นำ สารสกัด ของทุกชั้นตัวทำละลายส่งทดสอบสมบัติทางเภสัชวิทยา

3.3.2 การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโตกราฟี

1. นำสารสกัดที่ได้มาใส่ Vial แล้วละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัด

2. ตัด TLC Plate ขนาด 2 x 5 cm ลากเส้น Solvent Front และทำการ Spot สารละลายสารสกัด ในข้อ 1 ลงบนแผ่น 2 จุด แต่ละจุดให้มีความเข้มข้น(จำนวนครั้งที่ spot)แตกต่างกัน

3. เตรียมเฟสเคลื่อนที่เหมาะสม โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำที่สุดคือ เฮกเซน และเพิ่มขั้วตัวทำละลายด้วยการผสมกับตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าทีละน้อย คือ ไดคลอโรมีเทน และเอทธิล อะซิเตด ตามลำดับ ในอัตราส่วนต่างๆ นำตัวทำละลายผสมใส่ลงใน TLC Tank

4. นำกระดาษกรองวางไว้ด้านข้างใน TLC Tank ปิดด้วยกระจก ทิ้งไว้สักครู่จนกระทั่งภายใน TLC Tank อิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย สังเกตจากตัวทำละลายเคลื่อนที่จนเต็มกระดาษกรอง

5. นำแผ่น TLC ในข้อ 2 มาจุ่มลงใน TLC Tank ปิดกระจก ตั้งทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึง Solvent Front ที่กำหนดไว้ แล้วให้นำแผ่น TLC ออก ผึ่งให้แห้ง สังเกตผลการทดลองด้วยตาเปล่าว่าสารเกิดการแยกอย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำแผ่น TLC ที่ได้ ไปทดสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm สังเกตผลการทดลองว่าสารเกิดการแยกอย่างไร นำแผ่น TLC ที่ได้ไปย้อมด้วย Developing Solvent นำไปอุ่นบน hot plate สังเกตผลการทดลองว่าสารเกิดการแยกอย่างไร และการเปลี่ยนสีของจุดสารที่น่าสนใจ

7. นำข้อมูลจากข้อ 6-8 พิจารณาว่าขั้วของตัวทำละลายที่ใช้สามารถแยกสารได้ดีหรือไม่ ทำการปรับเพิ่มหรือลดขั้วของตัวทำละลายให้เหมาะสม แล้วทำซ้ำอีกครั้งจนกว่าจะได้ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด หากจุดของสารที่แยกออกมามีการเกิด Tailing ให้หยด 2-บิวทานอล ลงในตัวทำละลาย 3 หยด ต่อ ตัวทำละลาย 10 ml

8. เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว ให้นำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์-โครมาโตกราฟี ต่อไป

3.3.4 การแยกส่วนประกอบในสารสกัด ชั้นต่างๆ ด้วย วิธี คอลัมน์โครมาโตกราฟี

1. จัดคอลัมน์โดยใช้ Stand และ Clamp ตั้งฉากกับพื้น
2. Pack คอลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจล เบอร์ 7729
3. ชั่งซิลิกาเจล (ขึ้นอยู่กับขนาดและปริมาณสารตัวอย่าง) ใส่บีกเกอร์ เติม ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำสุดของระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยก คนให้เข้ากันจนไม่มีฟองอากาศ
4. ใช้สำลีอุดที่ปลายคอลัมน์กดสำลีด้วยแท่งแก้ว เติมตัวทำละลายที่ใช้ในข้อ 3 ลงไปเล็กน้อยให้พอท่วมสำลี แล้วเทซิลิกาเจลที่ผสมตัวทำละลาย ในข้อ 3 ลงในคอลัมน์ เปิดให้ตัวทำละลายไหลออกที่ปลายคอลัมน์
5. ใช้ลูกยางเคาะด้านข้างของคอลัมน์เบาๆ เพื่อให้ซิลิกาเจล เรียงตัวตัวได้ดี
6. ทำการปรับผิวหน้าคอลัมน์ให้เรียบแล้ว ปิดผิวหน้าด้วย anh. $MgSO_4$
7. เตรียมสารตัวอย่างที่ต้องการแยก โดยละลายสารสกัด ลงในขวดก้นกลมขนาด 50 ml เติมซิลิกาเจลเบอร์ 7734 คนให้เข้ากัน จนแห้งเป็นผง ถ้ายังชุ่มด้วยตัวทำละลายให้นำไประเหยออกด้วย Rotary Evaporator
8. เทสารตัวอย่างที่คลุกกับซิลิกาเจล เบอร์ 7734 ลงในคอลัมน์ให้หมด โดยไม่ต้องล้างขวดก้นกลมด้วยตัวทำละลาย
9. ใช้ตัวทำละลายที่ใช้ Pack คอลัมน์ ล้างด้านข้างของคอลัมน์ไขให้เหลือตัวทำละลายเหนือสารตัวอย่างน้อยที่สุด ระวังอย่าให้ซิลิกาเจลแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ทำการชะสารตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำสุดในระบบตัวทำละลาย ประมาณ 100 ml จากนั้นเพิ่มขั้วของตัวทำละลายทีละน้อย ทำการเก็บสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ (Effluent) ใส่ในหลอดทดลอง ตามลำดับที่เขียนหมายเลขเอาไว้
11. ทำการตรวจสอบสารที่ออกจากคอลัมน์ทุหลอดด้วย TLC เทียบกับสารสกัด (วิธีการเหมือนการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม)
12. ทำการรวมสารละลายในหลอดทดลองที่ให้ผล TLC เหมือนกัน เข้าด้วยกันในขวดก้นกลม แล้วนำมาแยกด้วยคอลัมน์อีกครั้งจนได้สารที่บริสุทธิ์
13. เมื่อได้สารบริสุทธิ์ นำสารที่ได้ไปชั่งน้ำหนักแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างของสาร

2.3.5 การวิเคราะห์โครงสารของสารที่ได้

ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ด้วยเทคนิค NMR, MS และตรวจสอบโครงสร้างของสารว่าเป็นสารชนิดใหม่หรือไม่จาก http://webbook.nist.gov/chemistry/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดตัวอย่างพืชด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดเบื้องต้น(Crude Extract) ในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารตัวอย่าง	น้ำหนักสารสกัด	% yield
เฮกเซน	1960.37	196.79	10.02 %
คลอโรฟอร์ม	1699.04	33.61	1.99 %
เมทานอล	1548.77	21.97	1.42 %

4.2 ผลการทดสอบทางเภสัชวินิจฉัยของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ

ส่งสารสกัดไปทดสอบทางเภสัชวินิจฉัย ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology: BIOTEC) โดยทดสอบกับเชื้อมาลาเรียและวัณโรคในสภาวะจำลอง (In vitro) ได้ผลดังนี้

4.2.1 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านมาลาเรีย

Testing : In Vitro antimalarial Activity against Plasmodium falciparum, K1 stain

Method : Microculture Radioisotope Technique

Date : 6/12/00

Test by : Antimalarial Screening Laboratory, BIOTEC

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า EC_{50} จากการทดสอบการต่อต้านมาลาเรีย

สารสกัดจากชั้น	*EC_{50} (µg/ml)
เฮกเซน	Inactive
คลอโรฟอร์ม	3.3 (Active)
เมทานอล	Inactive

* ถ้า EC_{50} มีค่าน้อยถือว่ามีความสามารถในการต่อต้านสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการต้านวัณโรค

Testing : In Vitro antituberculous Activity against Mycobacterium tuberculosis H37Ra

Method : Microplate Alamar Blue Assay (MABA)

Date : 7/12/00

Test by : Antituberculous Screening Laboratory, BIOTECH

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการทดสอบการต่อต้านวัณโรค

สารสกัดจากชั้น	*Results against TB at 200 µg/ml
เฮกเซน	Inactive
คลอโรฟอร์ม	Active
เมทานอล	Inactive

* ทำการทดสอบที่ 200 µg/ml ถ้าสามารถต่อต้านเชื้อวัณโรคได้ถือว่า Active

จากผลการทดสอบทางเภสัชวินิจฉัยพบว่าสารสกัดในชั้นคลอโรฟอร์มสามารถต้านมาลาเรียและวัณโรคได้ เราจึงมุ่งเน้นการแยกส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

4.2.3 ผลการศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการแยกส่วนประกอบทางเคมีจากสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยเทคนิค TLC เพื่อนำไปใช้แยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

4.2.4 ผลการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัด ชั้นต่างๆ

เมื่อนำสารสกัดจากชั้น เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เมทานอล มาทำการทดสอบด้วย TLC โดยทำการสุ่มค่าความเป็นขั้วของระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ แสดงได้ดัง ตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกส่วนประกอบของสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ

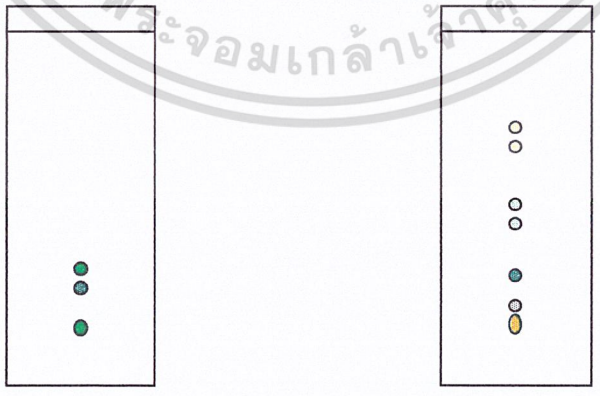
สารสกัดชั้นตัวทำละลาย	ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม
เฮกเซน	90 % เฮกเซน : 10 % เอทธิล อะซิเตด (10 ml) + 2-บิวทานอล 3 หยด
คลอโรฟอร์ม	100 % CH_2Cl_2 (10 ml) + 2-บิวทานอล 3 หยด
เมทานอล	ยังไม่สามารถหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วย normal phase TLC

4.2.5 ผลของการแยกสารสกัดด้วยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

ทำการพิจารณาการแยกของส่วนประกอบในสารสกัด ด้วย TLC โดยสังเกตจากตาเปล่า, ทดสองกับรังสี UV และ Developing Solvent ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 4.5 ผลการแยกสารสกัดด้วย TLC โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

สารสกัด	ผลการสังเกต
ชั้นเฮกเซน	พบจุดของสาร 3 จุด
ชั้นคลอโรฟอร์ม	พบจุดของสาร 7 จุด



(1) (2)

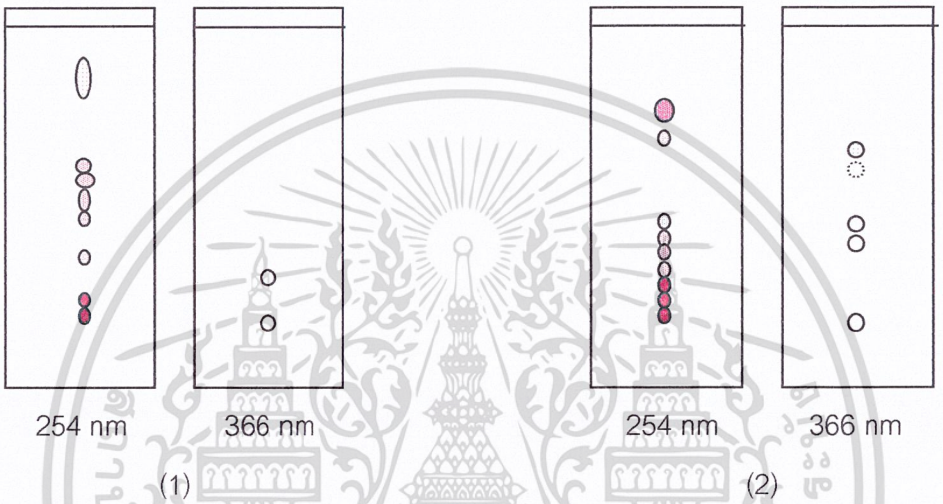
ภาพที่ 4.1 แสดงการแยกของส่วนประกอบในสารสกัดด้วย TLC ที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า

(1) สารสกัดชั้นเฮกเซน (2) สารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการแยกสารสกัดด้วย TLC โดยทดสอบกับรังสี UV

สารสกัด	UV 254 nm	UV 366 nm
ชั้นเฮกเซน	พบจุดของสาร 8 จุด	พบจุดของสาร 2 จุด
ชั้นคลอโรฟอร์ม	พบจุดของสาร 9 จุด	พบจุดของสาร 5 จุด



ภาพที่ 4.2 แสดงการแยกของส่วนประกอบในสารสกัดด้วย TLC โดยทดสอบกับรังสี UV 254 nm และ 366 nm

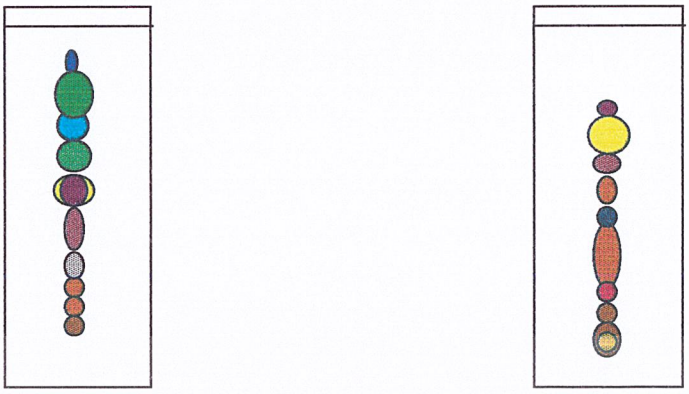
(1) สารสกัดชั้นเฮกเซน

(2) สารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

ตารางที่ 4.7 ผลของการแยกสารสกัดด้วย TLC โดยทดสอบกับ Developing Solvent

สารสกัด	ผลของการทดสอบ
ชั้นเฮกเซน	พบจุดของสาร 11 จุด
ชั้นคลอโรฟอร์ม	พบจุดของสาร 10 จุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(1) (2)

ภาพที่ 4.3 แสดงการแยกของส่วนประกอบในสารสกัด ชั้นต่างๆ ด้วย TLC ทดสอบกับ Developing Solvent

(1) สารสกัดชั้นเฮกเซน

(2) สารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

4.4 ผลการแยกสารสกัดชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

4.4.1 ผลของการแยกส่วนประกอบในชั้น เฮกเซน

รหัสสารตัวอย่าง : ZL(F)/H

Stationary Phase : Silica เบอร์ 7729

Solvent system : 1. เฮกเซนเพิ่มความเป็นขั้วด้วยไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2)

2. ไดคลอโรมีเทนเพิ่มความเป็นขั้วด้วยเอทธิลอะซิเตด (EtOAc)

ตารางที่ 4.8 แสดงการเก็บ Effluent ในการแยกสารสกัดชั้นเฮกเซน

Eluent	(Effluent)Flask No.
30 % CH_2Cl_2 : 70 % Hexane	1-2
35 % CH_2Cl_2 : 65 % Hexane	3-11
40 % CH_2Cl_2 : 60 % Hexane	12-14
50 % CH_2Cl_2 : 50 % Hexane	15-17
60 % CH_2Cl_2 : 40 % Hexane	18-22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

Eluent	(Effluent)Flask No.
70 % CH_2Cl_2 : 30 % Hexane	13-24
80 % CH_2Cl_2 : 20 % Hexane	25-26
90 % CH_2Cl_2 : 10 % Hexane	27
100 % CH_2Cl_2	28
10 % EtOAc : 90 % CH_2Cl_2	29
20 % EtOAc : 80 % CH_2Cl_2	30
30 % EtOAc : 70 % CH_2Cl_2	31
40 % EtOAc : 60 % CH_2Cl_2	32-33
50 % EtOAc : 50 % CH_2Cl_2	34-37
60 % EtOAc : 40 % CH_2Cl_2	38-40
80 % EtOAc : 20 % CH_2Cl_2	41-43
100 % EtO Ac	44

ทำการตรวจสอบสารที่เก็บจากคอลัมน์ด้วย TLC และรวมส่วนประกอบที่ให้ผลเหมือนกันได้ดังนี้

ตารางที่ 4.9 แสดงการรวมส่วนประกอบที่แยกได้ของสารสกัดชั้น Hexane

Fraction No.	1	2	3	4	5	6	7
Effluent ขวดที่	1-4	5-9	10-16	17-27	28-30	31-43	44
รหัส	ZL(F)/H/1	ZL(F)/H/2	ZL(F)/H/3	ZL(F)/H/4	ZL(F)/H/5	ZL(F)/H/6	ZL(F)/H/7

ลักษณะของสารที่สามารถแยกได้ในชั้น เฮกเซน ประกอบด้วย Wax และ Oil เป็นองค์ประกอบหลัก มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว

4.4.2 ผลของการแยกส่วนประกอบของสารสกัดในชั้นคลอโรฟอร์ม

Stationary phase : Silica เบอร์ 7729

Solvent system : 1. เฮกเซนเพิ่มความเป็นขั้วด้วยไดคลอโรมีเทน

2. ไดคลอโรมีเทนเพิ่มความเป็นขั้วด้วยเอทธิล อะซิเตด

3. เมทานอล(All purpose elution)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงการเก็บ Effluent ในการแยกสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

Eluent	(Effluent)Flask No.
90 % CH_2Cl_2 : 10 % Hexane	1-7
95 % CH_2Cl_2 : 5 % Hexane	8-20
100 % CH_2Cl_2	21-28
10 % EtOAc : 90 % CH_2Cl_2	29-34
20 % EtOAc : 80 % CH_2Cl_2	35-36
30 % EtOAc : 70 % CH_2Cl_2	37-39
40 % EtOAc : 60 % CH_2Cl_2	40
50 % EtOAc : 50 % CH_2Cl_2	41
60 % EtOAc : 40 % CH_2Cl_2	42-46
70 % EtOAc : 30 % CH_2Cl_2	47-49
80 % EtOAc : 20 % CH_2Cl_2	50-55
90 % EtOAc : 60 % CH_2Cl_2	56-59
100 % EtOAc	60-73
100 % เมทานอล	74-76

ทำการตรวจสอบสารที่เก็บจากคอลัมน์ด้วย TLC และรวมส่วนประกอบที่ให้ผลเหมือนกันได้ดังนี้

ตารางที่ 4.11 แสดงการรวมส่วนประกอบที่แยกได้ของสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์ม

Fraction No.	1	2	3	4	5	6
Effluent ขวดที่	1-2	3-4	5-6	7-11	12-15	16-29
Code	ZL(F)/$CHCl_3$/1	ZL(F)/$CHCl_3$/2	ZL(F)/$CHCl_3$/3	ZL(F)/$CHCl_3$/4	ZL(F)/$CHCl_3$/5	ZL(F)/$CHCl_3$/6
Fraction No.	7	8	9	10	11	
Effluent ขวดที่	30-60	61-67	68-74	75	76	
Code	ZL(F)/$CHCl_3$/7	ZL(F)/$CHCl_3$/8	ZL(F)/$CHCl_3$/9	ZL(F)/$CHCl_3$/10	ZL(F)/$CHCl_3$/11	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

ในการแยกสารบริสุทธิ์เราจะเลือกนำส่วนประกอบที่น่าสนใจ กล่าวคือการตกผลึกหรือแยกได้ง่าย

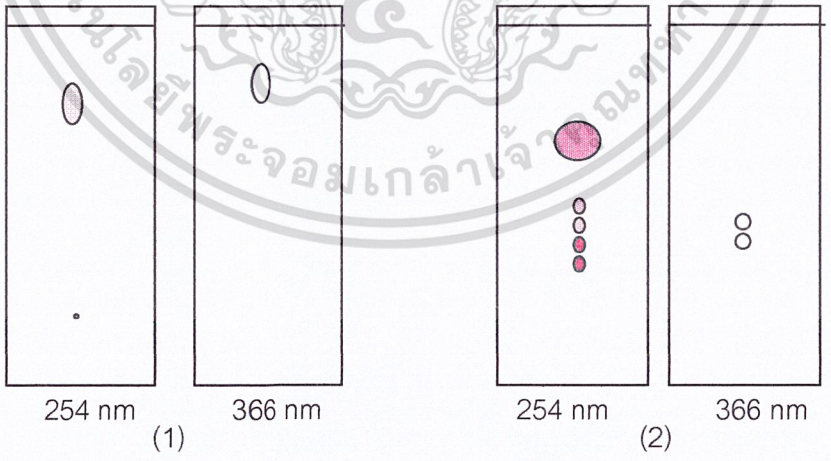
4.5.1 ผลการทดสอบด้วย TLC ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1 และ ZL(F)/$CHCl_3$/3

ตารางที่ 4.12 ผลการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจในชั้นคลอโรฟอร์มด้วย TLC โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

สาร	ผลการสังเกต
ZL(F)/$CHCl_3$/1	ไม่พบจุดของสาร
ZL(F)/$CHCl_3$/3	ไม่พบจุดของสาร

ตารางที่ 4.13 ผลการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจในชั้นคลอโรฟอร์มด้วย TLC โดยการทดสอบกับรังสี UV

สาร	UV 254 nm	UV 366 nm
ZL(F)/$CHCl_3$/1	1 จุด	1 จุด
ZL(F)/$CHCl_3$/3	4 จุด	2 จุด



ภาพที่ 4.4 แสดงการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจชั้นคลอโรฟอร์มด้วย TLC ทดสอบกับรังสี UV ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm

(1) ZL(F)/$CHCl_3$/1

(2) ZL(F)/$CHCl_3$/3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ผลการแยกส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจในชั้นคลอโรฟอร์มด้วย TLC โดยการทดสอบกับ Developing Solvent

สาร	ผลของการทดสอบ
ZL(F)/$CHCl_3$/1	3 จุด
ZL(F)/$CHCl_3$/3	5 จุด

(1) (2)

ภาพที่ 4.5 แสดงการแยกของส่วนประกอบทางเคมีที่สนใจในชั้นคลอโรฟอร์ม ทดสอบกับ Developing Solvent

(1) ZL(F)/$CHCl_3$/1

(2) ZL(F)/$CHCl_3$/3

4.5.2 ผลการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

- สามารถแยกสารที่น่าสนใจในสารสกัดจากชั้นคลอโรฟอร์มได้ 2 ตัวจาก ZL(F)/$CHCl_3$/1 และ ZL(F)/$CHCl_3$/3 ดังนี้

ตารางที่ 4.15 แสดงน้ำหนัก และ R_f ของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์จาก	น้ำหนัก (กรัม)	Yield เทียบกับ crude*	Yield เทียบกับตัวอย่างพืช	รหัส	R_f **
ZL(F)/$CHCl_3$/1	0.0294	0.14 %	0.0017 %	ZL(F)/$CHCl_3$/1/71	0.7750
ZL(F)/$CHCl_3$/3	2.025	9.64 %	0.1192 %	ZL(F)/$CHCl_3$/1/49	0.6625

*น้ำหนัก crude ที่แยกด้วย คอลัมน์ 21 กรัม

** Solvent System : 100 % CH_2Cl_2 + 3 หยด ของ 2-บิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การตรวจสอบโครงสร้างและจุดหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์

- ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 มีปริมาณมากพอ สามารถทดสอบหาจุดหลอมเหลว ตรวจสอบโครงสร้าง NMR และ MS
- เนื่องจากสารบริสุทธิ์จาก ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 มีปริมาณน้อยมาก จึงสามารถทำการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR เท่านั้น

4.6.1 ผลการตรวจสอบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

4.6.1.2 การตรวจสอบโครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71

^{1}H-NMR: (ภาพที่ 4.7)

ตารางที่ 4.16 แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 จาก ^{1}H-NMR Spectra

δ(ppm)	Type of peak	Integration of peak	Available functional group
5.35	doublet	3	R-C<u>H</u>=C<u>H</u>$_2$
4.60	doublet	1	-O-C<u>H</u>-CH-
4.05	triplet	1	CH_2-C<u>H</u>
2.25	quartet	4	-C<u>H</u>$_2$-CH_3 2 หมู่
2.05	Triplet	4	โปรตอนของ methine, methylene, methyl group ที่อยู่บน Isoprene unit
1.6	quartet	6	
1.30	Singlet	70	
1.05	Singlet	2	
0.98	doublet	12	

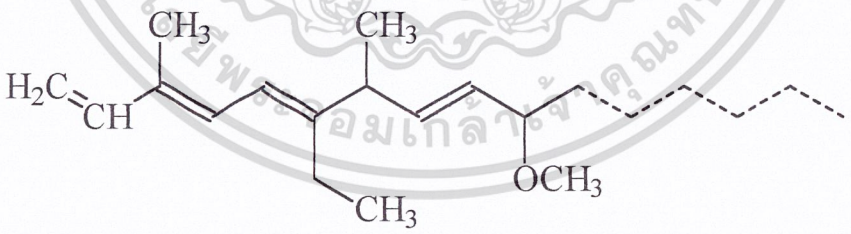
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

^{13}C-NMR: (ภาพที่ 4.8)

ตารางที่ 4.17 แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 จาก ^{13}C-NMR Spectra

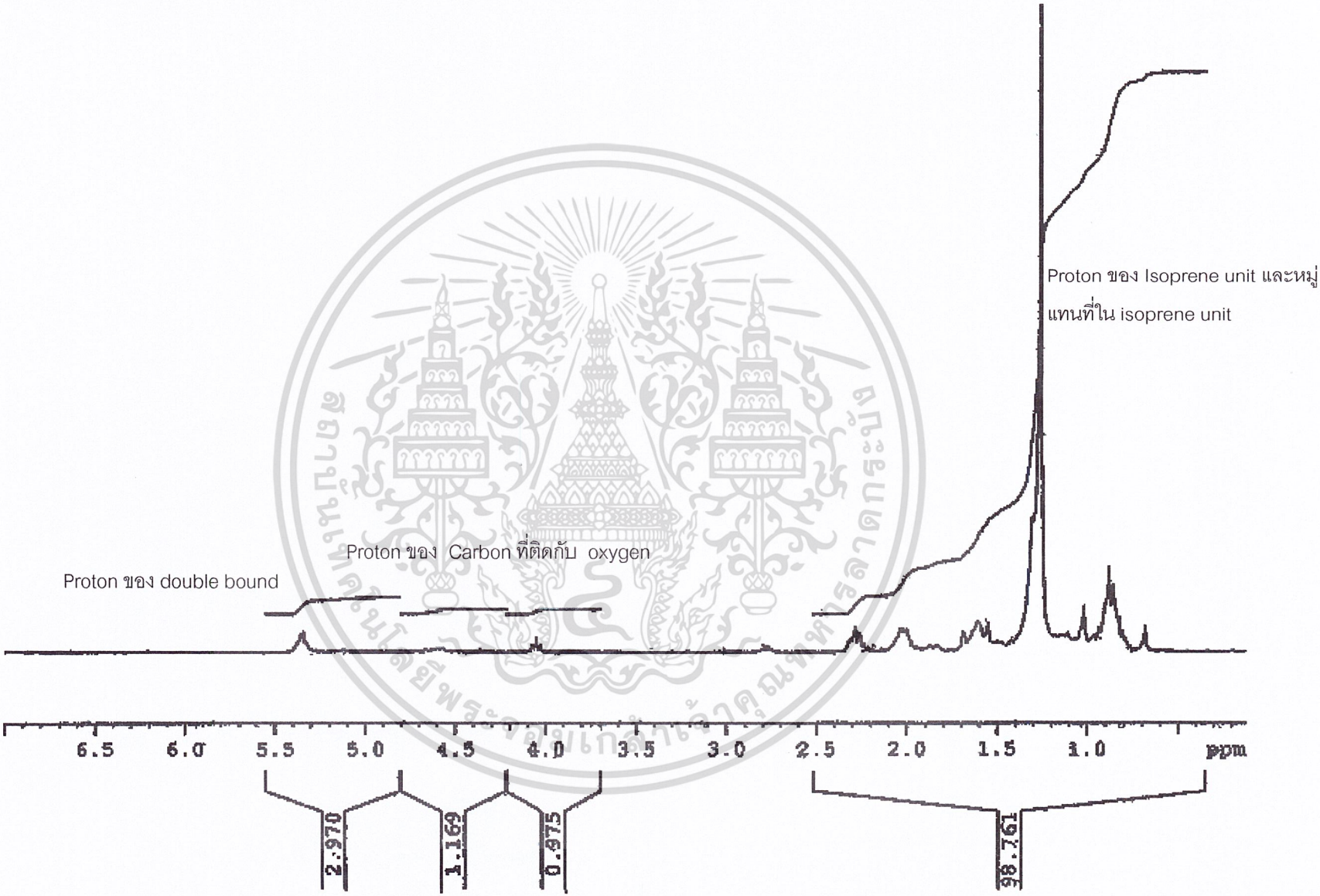
δ (ppm)	Available functional group
10-50	คาร์บอนของ >C<, >CH-, $>CH_2$, $-CH_3$ ประมาณ 30 ตัว
50-75	คาร์บอนของ C-O-C ประมาณ 3 ตัว
110-145	คาร์บอน 8 ตัว ของ -C=C-C=C-R

จากข้อมูลทาง Spectroscopy โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 ไม่สามารถหาได้เนื่องจากข้อมูลไม่เพียงพอ แต่สามารถคาดเดาได้จาก NMR Spectra ว่า น่าจะเป็นสารจำพวก Triterpenoid ที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่ มีคาร์บอนอะตอมมากกว่า 30 อะตอม มีหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญคือ Isoprene unit และ ether (R-0-R) ในโมเลกุล โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 ที่คาดว่าจะเป็นไปได้ คือ

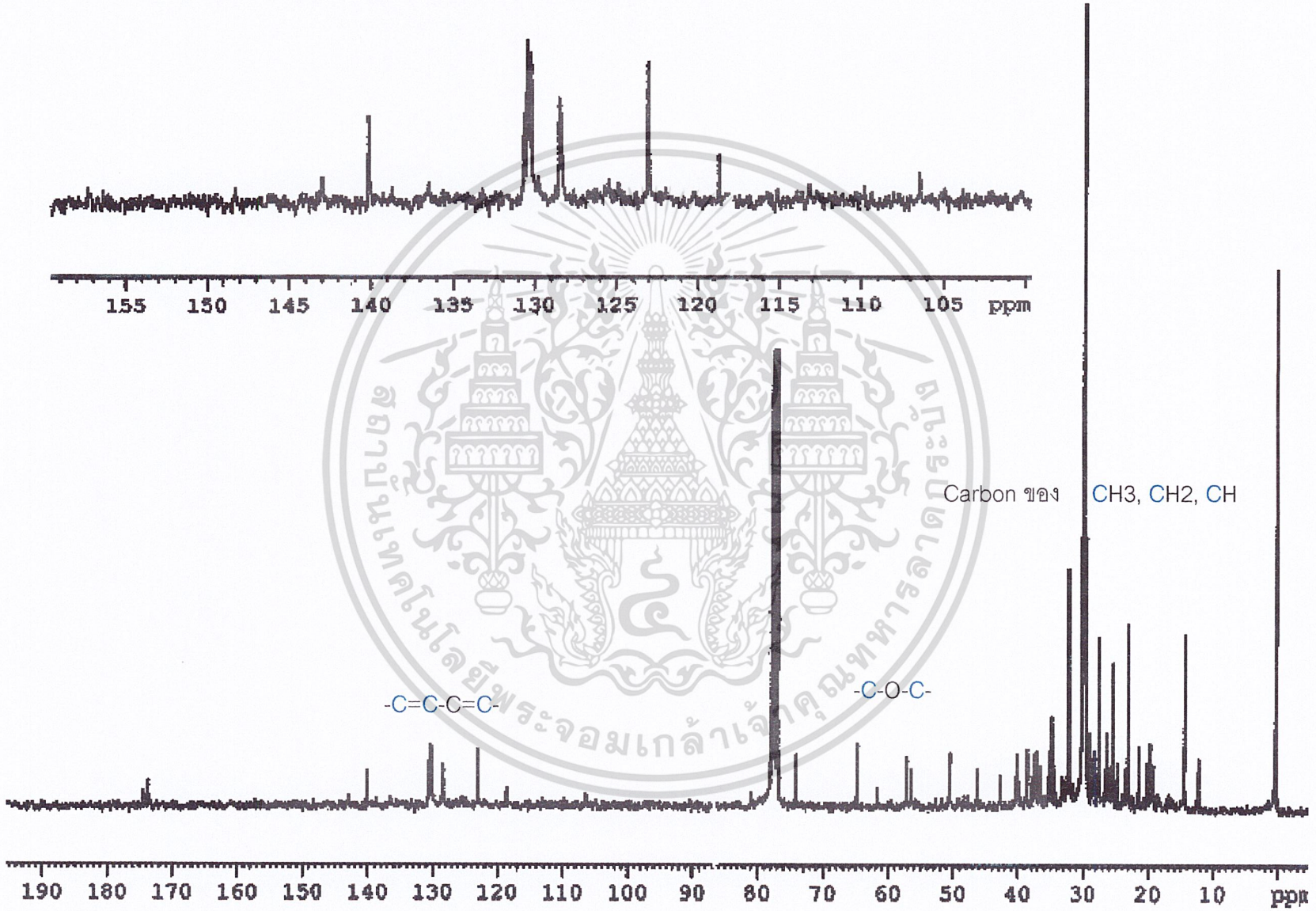


ภาพที่ 4.6 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7แสดง ^{1}HNMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71



ภาพที่ 4.8 แสดง ^{1}HNMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71

4.6.1.1 การตรวจสอบโครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49

^{1}H-NMR: (ภาพที่ 4.10)

ตารางที่ 4.18 แสดงการวิเคราห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 จาก ^{1}H-NMR Spectra

δ(ppm)	Type of peak	Integration of peak	Available functional group
14.00	Singlet	1	Phenolic Proton เกิด H-bond
6.00	Doublet	2	Proton ของ Benzene ring ที่มี หมู่แทนที่ 4 หมู่
3.85	Doublet	6	ϕ-O-CH_3 x 2
2.60	Singlet	3	-CO-CH_3

^{13}C-NMR: (ภาพที่ 4.11)

ตารางที่ 4.19 แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 จาก ^{13}C-NMR Spectra

δ (ppm)	Available functional group
203.154	>C=O ของ unsat. Ketone
167.595, 166.110, 162.927, 105.998	Carbon ของ Benzene ring ที่ H ถูกแทนที่
90.710, 93.50	Carbon ของ Benzene ring ที่ H ไม่ถูกแทนที่
55.531	ϕ-O-CH_3 2 หมู่
32.913, 29.149	-CH_3 ที่ติดกับ >C=O

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

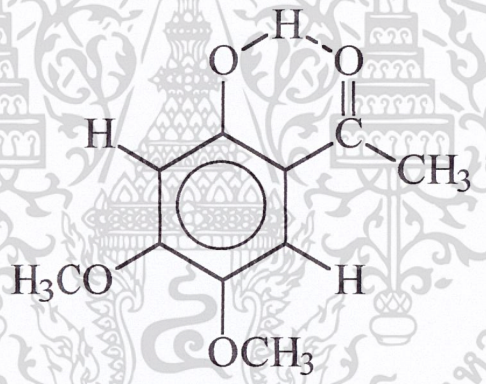
Mass Spectrometry

จากภาพที่ 12 แสดง Mass Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนได้ดังนี้

ตารางที่ 4.20 แสดงการวิเคราะห์โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 จาก Mass Spectra

m/z	การวิเคราะห์
196	สารมีน้ำหนักโมเลกุล 196 กรัม/โมล
181	ยืนยันหมู่methyl ของ ketone
138, 123, 95	ยืนยันตำแหน่งของหมู่ methoxy 2 หมู่ อยู่ในตำแหน่ง C ติดกัน

จากข้อมูลทาง Spectroscopy โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 คือ



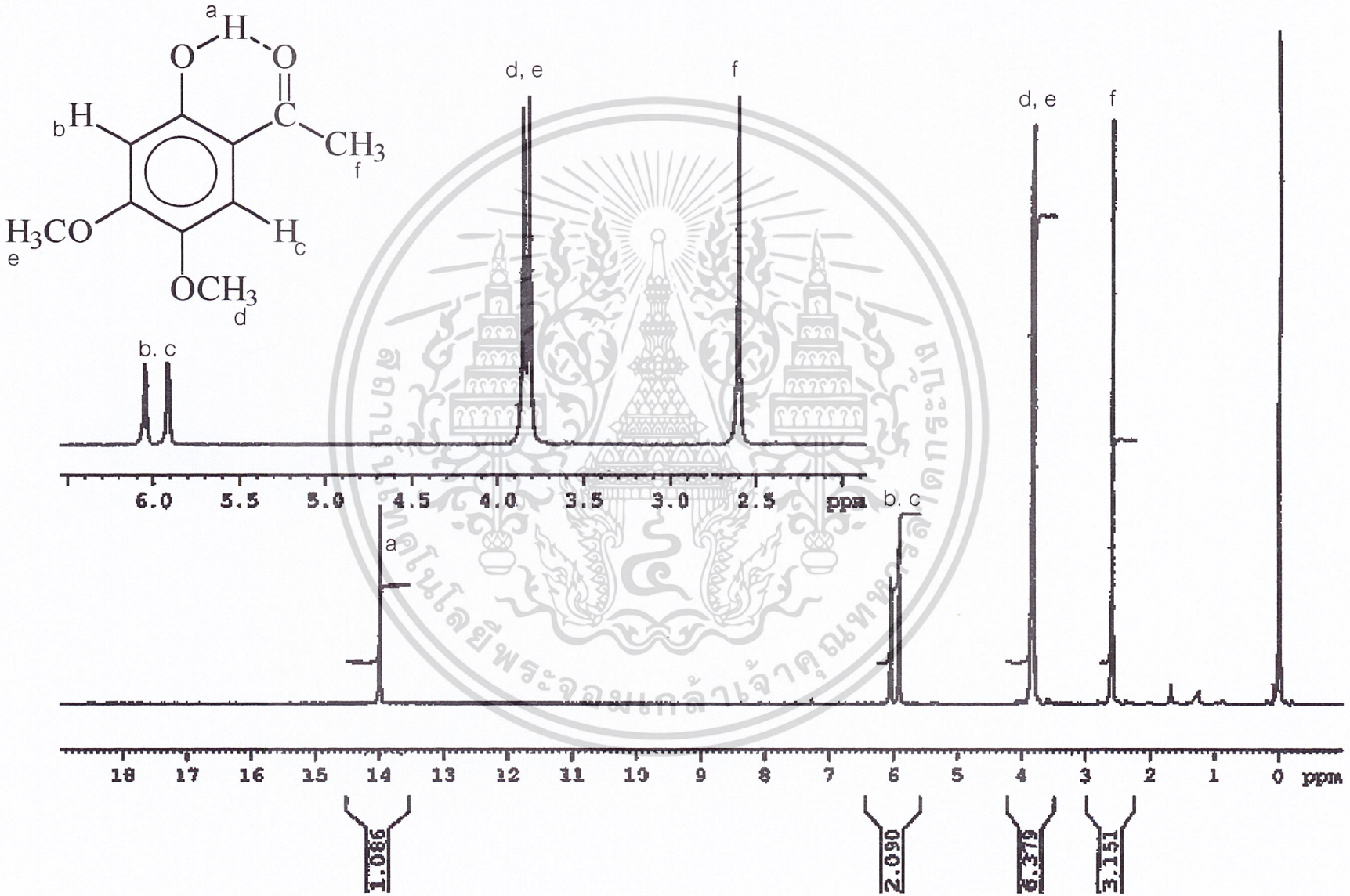
1-(2-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-ethanone

ภาพที่ 4.9 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของ ZL(F)/CHCl3/3/49

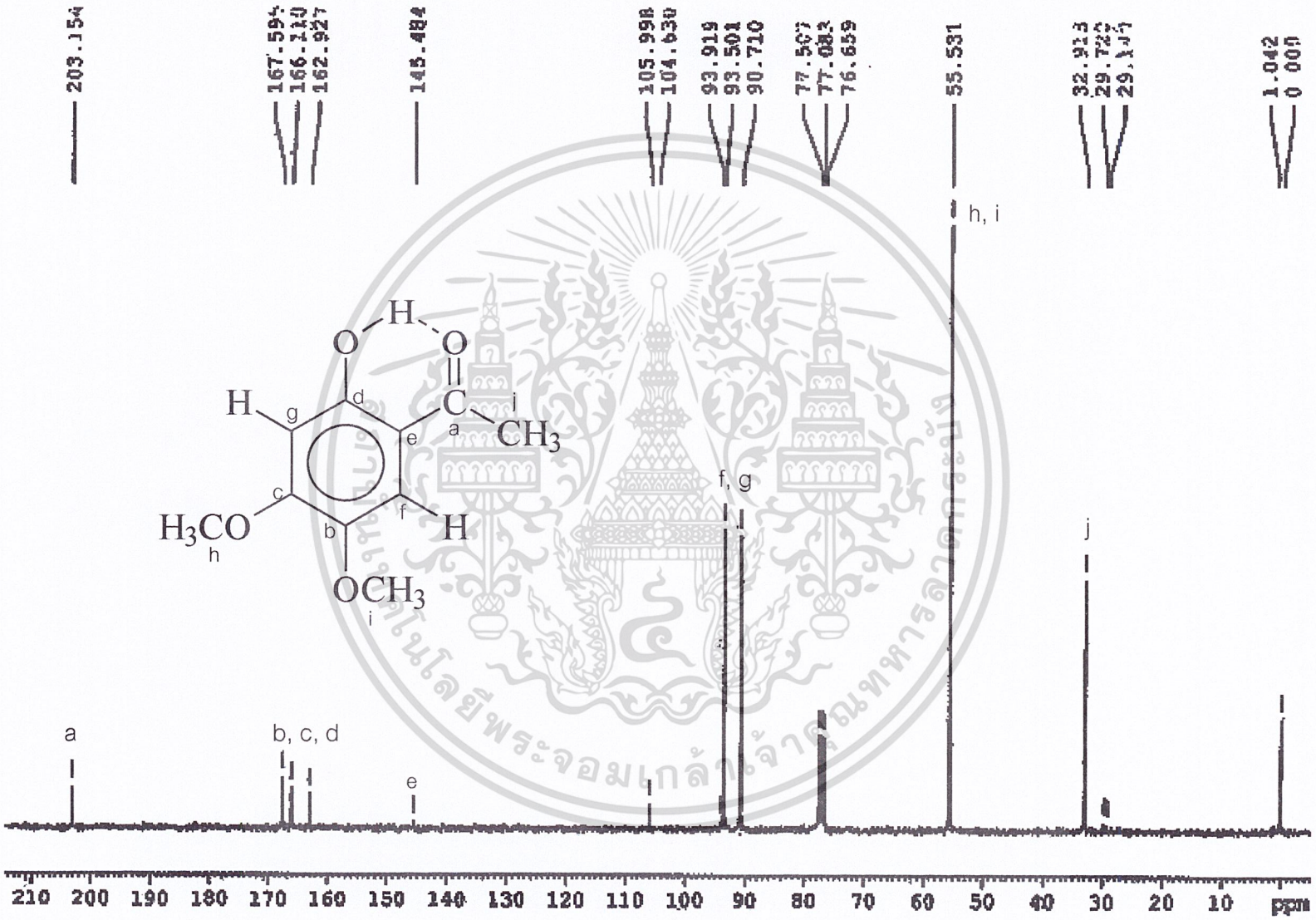
4.6.2 ผลการทดสอบหาจุดหลอมเหลวของสารบริสุทธิ์

ทำการหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่องหาจุดหลอมเหลว สามารถหาจุดหลอมเหลวของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 ได้ 80.40 °C

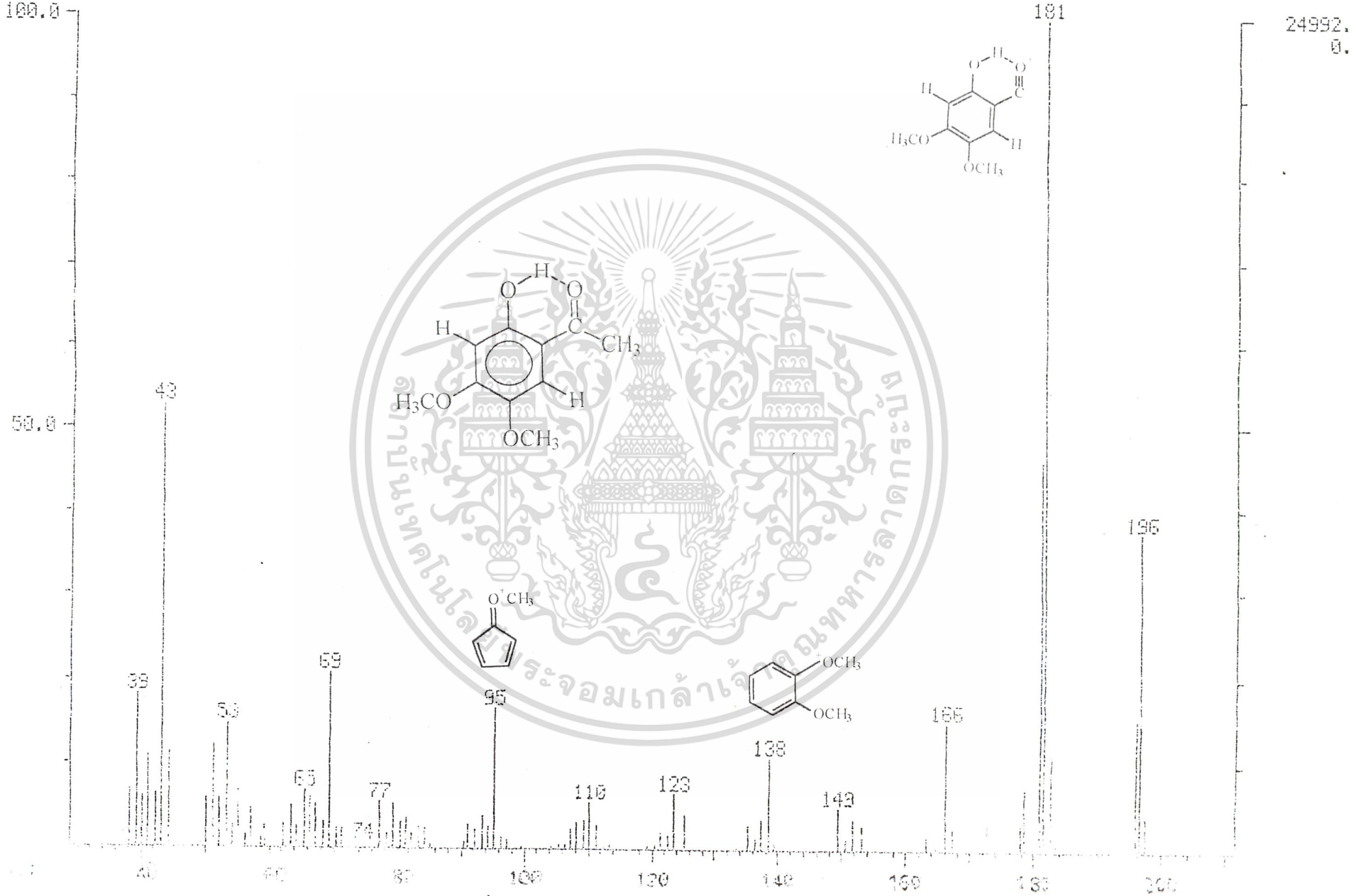
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 แสดง ^{1}HNMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71



ภาพที่ 4.11 แสดง ^{13}C NMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49



ภาพที่ 4.12 แสดง Mass Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

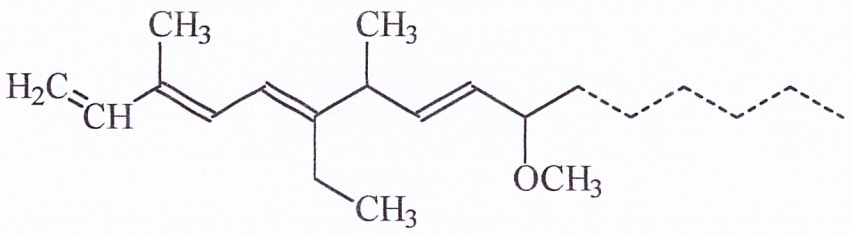
5.1 สรุปผลการวิจัย

1. สามารถสกัดสารจากตัวอย่างผลของกำจัดต้น ด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, และ เมทานอล ได้สารสกัดเบื้องต้น (Crude Extract) 10.02 %, 1.99 %, และ 1.42 % ของน้ำหนักพืชตัวอย่าง ตามลำดับ

2. สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากผลกำจัดต้น (*Zanthoxylum Limonella* Alston, Rutacea) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ โดยสามารถแยกสารสกัดจากชั้นเฮกเซน ได้ 7 ส่วนประกอบ และสารสกัดจากชั้น คลอโรฟอร์ม ได้ 11 ส่วนประกอบ สารสกัดในชั้นเฮกเซน ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด บางส่วนประกอบมีกลิ่นหอม บางส่วนประกอบมีกลิ่นเผ็ดร้อน และ แวกซ์ เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนสารสกัดจากชั้นคลอโรฟอร์มมีของแข็งเป็นผลึกสีขาวหลายชนิดเป็นองค์ประกอบหลัก มีส่วนที่เป็นน้ำมันและแวกซ์ เล็กน้อย

3. สามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดชั้นคลอโรฟอร์มส่วนประกอบที่ 1 และ 3 ได้ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 และ 1-(2-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-ethanone (ZL(F)/$CHCl_3$/3/49) ตามลำดับ

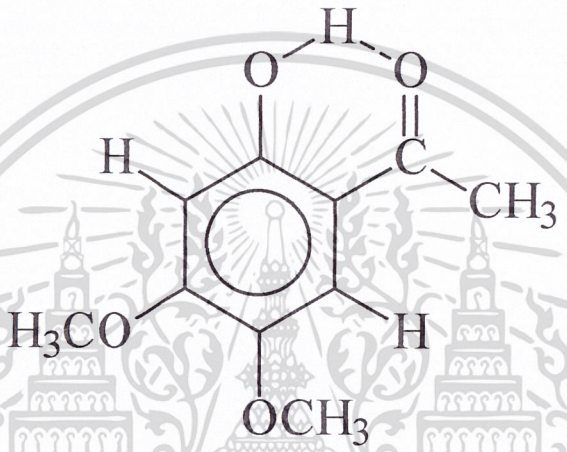
- ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 มีปริมาณ 0.14 % โดยน้ำหนัก ของสารสกัดเบื้องต้น มีลักษณะเป็นน้ำมันเหลวใส มีความหนืดสูง จากผล NMR คาดว่าเป็นสารจำพวก Triterpenoid ที่มีคาร์บอนอะตอมมากกว่า 30 อะตอม



ภาพที่ 4.6 โครงสร้างที่เป็นไปได้ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ZL(F)/$CHCl_3$/3/49 เป็นสารจำพวก Acetophenone ชนิดใหม่ คือ 1-(2-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-ethanone มีปริมาณมาก เป็นองค์ประกอบที่มีมากที่สุด ในสารสกัดเบื้องต้นชั้นคลอโรฟอร์ม คิดเป็น 9.64 % โดยน้ำหนัก ของสารสกัดเบื้องต้น มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวเป็นผลึก มีกลิ่นเฉพาะตัว มีจุดหลอมเหลวที่ 80.4 °C จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR และ MS พบว่ามีโครงสร้างดังภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.9 โครงสร้างของ ZL(F)/$CHCl_3$/3/49

4. จากผลการทดสอบเภสัชวินิจฉัยในสภาวะจำลอง (in vitro) พบว่าสารสกัดเบื้องต้นจากผลกำจัดต้นชั้นคลอโรฟอร์ม สามารถต้านเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิปารัมซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรียโดยมีค่า EC_{50} 3.3 µg/ml และสามารถต้านวัณโรคได้โดยมีค่าการต้านวัณโรค 200 µg/ml ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาในรายละเอียดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย

- เนื่องจากการเตรียมคอลัมน์ เพื่อใช้ในการแยกสารต้องอาศัยความชำนาญ และ คอลัมน์ที่เตรียมได้แต่ละครั้งจะมี Theoretical plate เกิดขึ้นต่างกัน ทำให้สามารถแยกสารได้ต่างกัน สารสกัดชนิดเดียวกัน อาจแยกได้จำนวน fraction ไม่เท่ากัน นอกจากนี้ จำนวน fraction ยังขึ้นอยู่กับปริมาณการแบ่งเก็บสารที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วย ถ้าเก็บสารทีละน้อยๆ จะสามารถแยก fraction ได้ดีแต่จะเสียเวลาในการเก็บสาร และทดสอบ TLC มาก อาจทำให้สารติดอยู่ในซิลิกาเจลนานเกินไปและเกิดการสลายตัวได้

- NMR Spectra ของ ZL(F)/$CHCl_3$/1/71 มีสัญญาณรบกวนเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากสารยังมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ เนื่องจาก สารในส่วนประกอบต้นๆ จะเป็นสารจำพวกน้ำมัน และน้ำมันหอมระเหย ซึ่งแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ยาก อาจจะต้องใช้ Gas Chromatography และ/หรือ High Performance Liquid Chromatography ในการแยก

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. การสกัดสารอาจทำได้ด้วยวิธีอื่น เช่น การสกัดด้วย กรด หรือ เบส ซึ่งสามารถศึกษาเพิ่มเติมได้จากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 3 แล้วจึงนำมาแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

2. เนื่องจาก *Zanthoxylum Limonella* (Alston) เป็นพืชที่ใช้เมล็ดแห้งเป็นเครื่องเทศ และสารที่แยกได้จากสารสกัดเบื้องต้นในชั้นเฮกเซน หลายส่วนมีกลิ่นหอม ควรมีการศึกษาต่อในส่วนของน้ำมันหอมระเหย โดยอาจจะใช้วิธีการกลั่นไอน้ำ สกัดด้วยตัวทำละลาย แล้ววิเคราะห์ด้วย GC-FID และ GC-MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. นิจศิริ เรืองรังสี, พยอม ตันติวัฒน์, *พืชสมุนไพร* พิมพ์ครั้งที่ 1. หน้า 1-9 สำนักพิมพ์โอเดียร์สโตร์, กรุงเทพ, 2534
2. วันทนี สว่างอารมณ์, *เอกสารคำสอน รายวิชาพืชเครื่องเทศและสมุนไพร.*, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา, กรุงเทพฯ, 2542
3. วีณา จิรัจฉริยากุล, *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ*, พิมพ์ครั้งที่ 1 , หน้า 99-136, 318-329 ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. ร.ศ. รัชนี ตัณฑะพานิชกุล, *เคมีอินทรีย์ 1* พิมพ์ครั้งที่ 6 หน้า 255-264, 355-368, 409-410, ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงชวนพิมพ์ , กรุงเทพฯ, 2534
5. Jirovetz, L; Buchbauer, G; Shafi, MP; Saidutty, A. "Analysis of the aroma compound of the essential oil of seed of spice plant *Zamthoxylum rhetsa* from southern India., *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1998, 206:3, 228-229; 8 ref.
6. Shibuya, H; Takeda, Y; Zang, RS; Tong, RX; Kitagawa, I., "Indonesian medicinal plants. III. On the constituents of bark of *Zanthoxylum rhetsa* (Rutacea) (1) : alkaloid, phenylpropanoid, and acid amide"., *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1992, 40:9, 2325-2330; 25 ref.
7. Silverstein, Robert Milton., "Spectrometric identification of organic compounds"., 4th Edition., John Wiley & Sons, Inc., 1981.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้