การสกัดเทอร์ปีนแลคโตนจากใบแปะก๊วย

TERPENE LACTONES EXTRACTION FROM *GINKGO BILOBA* LEAVES

กัญญามาศ พุทธานุ

ธนาภรณ์ มาศวรรณา

แสงเทียน แสวงดี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2556

การสกัดเทอร์ปีนแลคโตนจากใบแปะก๊วย

TERPENE LACTONES EXTRACTION FROM *GINKGO BILOBA* LEAVES

กัญญามาศ พุทธานุ

ธนาภรณ์ มาศวรรณา

แสงเทียน แสวงดี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีการศึกษา 2556

TERPENE LACTONES EXTRACTION FROM *GINKGO BILOBA* LEAVES

Kanyamas Puttanu

Thanaporn Maswanna

Sangtian Sawangdee

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENT CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การสกัดเทอร์ปีนแลคโตนจากใบแปะก๊วย

Terpene lactones extraction from *Ginkgo biloba* leaves

ชื่อนักศึกษา 1. นางสาวกัญญามาศ พุทธานุ รหัส 53051148

2. นางสาวธนาภรณ์ มาศวรรณา รหัส 53051191

3. นางสาวแสงเทียน แสวงดี รหัส 53051291

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2556

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ	ลายมือชื่อ
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์	
ดร.เอกรัฐ เดชศรี	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสกัดเทอร์ปีนแลคโตนจากใบแปะก๊วย		
	Terpene lactones extraction from *Ginkgo biloba* leaves		
ชื่อนักศึกษา	1. นางสาวกัญญามาศ	พุทธานุ	รหัส 53051148
	2. นางสาวธนาภรณ์	มาศวรรณา	รหัส 53051191
	3. นางสาวแสงเทียน	แสวงดี	รหัส 53051291
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต		
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม		
ปีการศึกษา	2556		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์		

บทคัดย่อ

แปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) เป็นพืชสมุนไพรที่ถูกใช้ในทางการแพทย์ทางเลือกให้แก่ผู้ป่วยที่มีอาการด้านต่างๆ ใบแปะก๊วยนั้นมีสารทุติยภูมิ (secondary metabolite)ที่สำคัญคือสารกลุ่มเทอร์ปีนแลคโตน (Terpene lactones) ซึ่งมี 2 ชนิดคือ Ginkgolide (ซึ่งมี Ginkgolide A,B,C,J และ M) และ Bilobalide โครงงานพิเศษนี้ต้องการพัฒนาวิธีการสกัดสารทุติยภูมิดังกล่าวโดยใช้เทคนิค liquid-liquid extraction หาปริมาณสารสกัดด้วยวิธี HPLC-ELSD จากนั้นวิเคราะห์ผลในเชิงกึ่งปริมาณ (Semi-Quantitative Analysis) ผลการคัดเลือก solvent ที่ใช้ในการทำ liquid-liquid extraction พบว่า Methanol สกัดสารที่ต้องการได้ในปริมาณสูงสุดโดยมีความบริสุทธิ์เพียง 12.3% อย่างไรก็ดี Dichloromethane แม้จะสกัดสารที่ต้องการได้ปริมาณน้อยที่สุดแต่มีความบริสุทธิ์สูงที่สุดถึง 87.5% ต่อมาได้ทำการต้มผงใบแปะก๊วยในน้ำ สารละลายบัฟเฟอร์ pH 5-7 และ Ethanol 85.4% เพื่อให้สารที่ต้องการออกมาในชั้นน้ำ จากนั้นทำการสกัดด้วย Dichloromethane พบว่า Ethanol 85.4% จะสกัดได้สารที่ต้องการสูงที่สุด โดยมีความบริสุทธิ์ 15.4% ส่วนการต้มที่เหลือจะทำให้ได้ปริมาณสารสกัดน้อยกว่า Ethanol 85.4% ประมาณ 3.4% แต่จะมีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 64-76% ดังนั้นการทดลองนี้จึงเสนอวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยอย่างสะดวกและได้ความบริสุทธิ์สูงโดยต้มใบแปะก๊วยกับน้ำแล้วสกัดด้วย Dichloromethane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Terpene lactones extraction from *Ginkgo biloba* leaves	
Students	Kanyamas	Puttanu
	Thanaporn	Maswanna
	Sangtian	Sawangdee
Degree	Bachelor of Science	
Major Program	Environmental Chemistry	
Academic Year	2013	
Advisor	Dr. Cherdsak	Maneeruttanarungroj

ABSTRACT

Ginkgo (*Ginkgo biloba*) is widely used in the alternative medication for the patients. Ginkgo leaf has two specific secondary metabolites of Terpene lactones group which are ginkgolide (ginkolide A, B, C, J and M) and bilobalide. The aim of this study is to develop the extraction method of Terpene lactones through liquid-liquid extraction method. The active ingredients were analyzed by HPLC-ELSD as semi-quantitive analysis. Solvent screening showed that ginkgolide and bilobalide can be extracted in the highest amount with the purity of 12% when methanol was used. However, dichloromethane even showed the lowest amount of active ingredients, but showed the highest purity of 87.5%. Next, the ginkgo leaf powder was boiled in water, buffer pH 5-7, and 85.4% Ethanol to allow Terpene lactones distribute in aqueous phase. The boiled filtrate was extracted by dichloromethane. The result showed that Terpene lactones were recovered in the highest yield with only 15.4% purity when boiled in ethanol. The heat conditions showed the lesser portion of 3.4% with the purity of 64-76%. From this study, we propose the convenient and economy method to extract Terpene lactones from ginkgo leaf by boiling in water followed by dichloromethane extraction.

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำแนะนำให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิดและเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจแก้โครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณพี่สุนันท์ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่คอยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความร่วมมืออำนวยความสะดวก ในการทำโครงงานพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำโครงงานพิเศษ

กัญญามาศ พุทธานุ

ธนาภรณ์ มาศวรรณา

แสงเทียน แสวงดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของใบแปะก๊วย	4
2.1.1 ประวัติและความเป็นมาของใบแปะก๊วย	4
2.1.2 ข้อมูลทั่วไปของแปะก๊วย	5
2.1.3 สารประกอบเคมีในใบแปะก๊วย	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2 ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบแปะก๊วย	9
2.2.1 ฤทธิ์ทางชีววิทยา (Biological effect)	9
2.2.1.1 ความผิดปกติและการทำลายของระบบประสาท	9
2.2.1.2 การปรับปรุงการไหลเวียนโลหิต	10
2.2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological effect)	11
2.2.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	11
2.2.2.2 ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด	11
2.2.2.3 ฤทธิ์เพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปยังสมอง	12
2.2.2.4 ฤทธิ์กระตุ้นระบบไหลเวียนของโลหิต	12
2.2.2.5 ฤทธิ์เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้	13
2.2.2.6 ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเพอรอกไซด์	13
2.2.2.7 ฤทธิ์ช่วยให้ความจำดีขึ้น	13
2.2.2.8 ฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัว	13
2.2.2.9 ฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัว	13
2.2.2.10 ฤทธิ์เพิ่มการมองเห็น	14
2.2.2.11 ฤทธิ์ยับยั้งการเสื่อมของสมอง	14
2.3 ข้อมูลในสัตว์ทดลอง (Pre-clinic evidence)	15
2.4 ข้อมูลทางคลินิกและขนาดที่ใช้ต่อวัน	15
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	18
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	18
3.2 ตัวอย่างและสารเคมี	19
3.3 วิธีการทดลอง	20
3.3.1 การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลายอินทรีย์ 19 ชั่วโมง	20
3.3.2 การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลายบัฟเฟอร์ น้ำ และ Ethanol 85.4 %	20
3.3.3 การเตรียมสารละลาย Ethanol 85.4 %	21
3.3.4 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	21
3.3.5 การเตรียมสารเพื่อฉีด HPLC	22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	24
4.1 ผลการวิจัย	24
4.2 อภิปรายผล	33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	41
ภาคผนวก ก HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones	43
ภาคผนวก ข การคำนวณ Area/g DW และ การคำนวณ Purity	65
ภาคผนวก ค การคำนวณค่าความมีขั้ว (Polarity)	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 1 แสดงสารประกอบหลักของใบแปะก๊วย 7

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC 23

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธี ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC 24

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram 24

ตารางที่ 5 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak ต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (ตอนที่ 1) 28

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธีของการทดลองตอนที่ 2 31

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram 31

ตารางที่ 8 แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak ต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (ตอนที่ 2) 32

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณของ Terpene lactones จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ 34

ตารางที่ 1.1ข แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram 45

ตารางที่ 1.2ข แสดงข้อมูลดิบน้ำหนักของสารสกัดทั้งหมดที่สกัดได้ 45

ตารางที่ 1.3ข แสดงน้ำหนักสารสกัดใน 50% Ethanol 2 mL (การเตรียมสารเพื่อฉีด HPLC) 46

ตารางที่ 1.4ข แสดงปริมาณของสารสกัด Terpene lactones จาก 50 µL 46

ตารางที่ 1.5ข แสดงน้ำหนักแห้ง (1 g) ในสารสกัด 50 µL 47

ตารางที่ 1.6ข แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak ต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม 47

ตารางที่ 2.1ข แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram 48

ตารางที่ 2.2ข แสดงข้อมูลดิบน้ำหนักของสารสกัดทั้งหมดที่สกัดได้ 48

ตารางที่ 2.3ข แสดงน้ำหนักสารสกัดใน 50% Ethanol 1 mL 49

ตารางที่ 2.4ข แสดงปริมาณของสารสกัด Terpene lactones จาก 50 µL 49

ตารางที่ 2.5ข แสดงน้ำหนักแห้ง (1 g) ในสารสกัด 50 µL (เทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น 30 g) 50

ตารางที่ 2.6ข แสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak ต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม 50

ตารางที่ 3ข แสดง %Area ของแต่ละ Peak จากการทดลองตอนที่ 1 51

ตารางที่ 4ข แสดง %Area ของแต่ละ Peak จากการทดลองตอนที่ 2 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1A แสดงลักษณะของต้นแปะก๊วย	6
ภาพที่ 1B แสดงลักษณะใบของแปะก๊วย	6
ภาพที่ 1C แสดงลักษณะผลของแปะก๊วย	7
ภาพที่ 2A แสดงสูตรโครงสร้างของ Ginkgolide	8
ภาพที่ 2B แสดงสูตรโครงสร้างของ Bilobalide	8
ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ %Recovery	16
ภาพที่ 4 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ในสารสกัดมาตรฐาน HERBAL ONE	25
ภาพที่ 5 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ที่สกัดโดย Ethyl acetate	26
ภาพที่ 6A HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน Ginkgolide A, B, C, J, BB	27
ภาพที่ 6B HPLC-ELSD chromatograms ของสารตัวอย่าง	27
ภาพที่ 7 HPLC Chromatogram ของ Terpenoids ในสารสกัดมาตรฐาน	27
ภาพที่ 8 แสดงปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด	29
ภาพที่ 9 แสดง Purity ของ Terpene lactones ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด	29
ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงปริมาณของ Terpene lactones จากการสกัดในสภาวะต่างๆ	32
ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดง Purity ของ Terpene lactones จากการสกัดในสภาวะต่างๆ	33
ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Total Terpenoids และ Polarity ของตัวทำละลายอินทรีย์	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ใบแปะก๊วยเป็นใบพืชจากต้นแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Ginkgoaceae ใบแปะก๊วยนั้นเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ในประเทศจีนมากว่า 4,000 ปี โดยใช้เนื้อในเมล็ดเป็นยาช่วยย่อยอาหารอีกทั้งเนื้อในเมล็ดที่กะเทาะเปลือกออกแล้วนิยมนำมาต้มกับน้ำตาลเป็นของหวานหรือคั่วรับประทาน เมื่อต้นศตวรรษที่ 16 ในตำราจีนได้ระบุให้ใช้ยาชงจากใบแปะก๊วยแล้วนำมาสูดดมเพื่อรักษาโรคหืด ปอด และโรคหัวใจ ต่อมาเมื่อ 30 ปีที่แล้วมาจึงได้มีการผลิตยาสารสกัดใบแปะก๊วยออกจำหน่ายเพื่อรักษาโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด ปัจจุบันสารสกัดใบแปะก๊วยกำลังเป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเนื่องจากในใบแปะก๊วยนี้ประกอบไปด้วยสารเคมีมากมายหลายชนิด ซึ่งสารเคมีหลักๆก็คือ สารเคมีทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มที่ชื่อว่า " เทอปีนแลคโตน (Terpene lactones)" อันประกอบไปด้วยสารสำคัญอยู่ 2 ชนิด คือ Ginkgolide และ Bilobalide สาร Ginkgolide นั้นสามารถแยกออกได้เป็น Ginkgolide A, B, C, J และ M ซึ่งชื่อที่แตกต่างกันนี้เนื่องมาจากมีหมู่บางหมู่ที่แตกต่างกันแต่โครงสร้างหลักยังเหมือนเดิม โดยสารพวก Ginkgolide จะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ Platelet Activating Factor (PAF) โดยเฉพาะ Ginkgolide B จะมีฤทธิ์เป็น anti-PAF ได้ดีที่สุด ใช้ในการรักษาโรคต่างๆเช่น asthma, bronchitis, dementia senilis, allergy, cardiac disorders และพวก circulatory system diseases อื่นๆ นอกจากนี้ Ginkgolide A และ B ยังช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตในสมองด้วย ส่วน Bilobalide นี้จะมีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น Encephalopaties, cerebral edemas, demyelinating, neuropaties และ myelopathies และจากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่า สารสกัดใบแปะก๊วยนั้นมีสรรพคุณทางยาและมีประโยชน์มาก ดังนั้นหากเราสามารถพัฒนาวิธีการสกัดสารที่มีประโยชน์นี้ออกมาให้ได้ในปริมาณที่สูงขึ้นก็อาจจะเป็นประโยชน์หรือสามารถนำไปประยุกต์ใช้จริงในอุตสาหกรรมการผลิตสารสกัดจากใบแปะก๊วยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษนี้จึงเป็นการศึกษาถึงวิธีที่ใช้สกัดสารพวก Terpene lactones อันได้แก่ Ginkgolide และ Bilobalide จากใบแปะก๊วยโดยเปรียบเทียบปริมาณของสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธี

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาวิธีที่ใช้สกัดสารพวก Terpene lactones ซึ่งได้แก่ Ginkgolide และ Bilobalide จากใบแปะก๊วย

1.2.2 เปรียบเทียบปริมาณของสารสกัดจากใบแปะก๊วยที่ได้ในแต่ละวิธี

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ศึกษาวิธีการสกัดที่จะให้สาร Ginkgolide และ Bilobalide ออกมาในปริมาณที่มากที่สุด โดยทำการทดลอง 2 ตอน ตอนที่ 1 คือการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์นาน 19 ชั่วโมง โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้มี 6 ชนิด ได้แก่ Ethanol, Methanol, Dichloromethane, Ethyl acetate, Acetone และ Isopropanol และตอนที่ 2 คือการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ pH 5, pH 6, pH 7, น้ำ และ Ethanol 85.4%

1.3.2 ตรวจสอบและคำนวณปริมาณของสาร Ginkgolide และ Bilobalide โดยใช้เทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยที่มี ELS (Evaporative Light Scattering) เป็น Detector

1.3.3 เปรียบเทียบปริมาณของสารสกัดที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1 โดยเลือกสารละลายอินทรีย์ที่สกัดได้ดีที่สุดมาใช้ในการทดลองตอนที่ 2 เพื่อนำมาใช้สกัดและกำจัด impurity โดยใช้เทคนิค liquid-liquid extraction

1.3.4 เปรียบเทียบปริมาณของสารสกัดที่ได้จากทั้งการทดลองตอนที่ 1 และ 2 เพื่อวิเคราะห์ดูว่าสภาวะใดสามารถที่จะสกัด Ginkgolide และ Bilobalide ออกมาได้ในปริมาณมากที่สุดโดยจะคำนึงถึงปริมาณและความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถสกัดเอาสาร Ginkgolide และ Bilobalide ออกมาจากใบแปะก๊วยได้

1.4.2 เปรียบเทียบได้ว่าวิธีใดที่จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุด

1.4.3 สามารถที่จะนำไปเป็นแนวทางเพื่อประยุกต์หรือนำไปต่อยอดใช้ในเชิงอุตสาหกรรมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลเบื้องต้นของใบแปะก๊วย

2.1.1 ประวัติและความเป็นมาของใบแปะก๊วย

แปะก๊วยหรือ *Ginkgo biloba* เป็นพืชในวงศ์ Ginkgoaceae ต้นแปะก๊วยมีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน และเป็นพืชชนิดเดียวในวงศ์ Ginkgoaceae ที่หลงเหลืออยู่จากยุค Cretaceous เมื่อประมาณ 80 ล้านปีมาแล้ว และเชื่อว่าเป็นพืชที่เก่าแก่ที่สุดในโลกชนิดหนึ่ง

จากหลักฐานทางโบราณคดีเข้าใจว่าพืชในตระกูล Ginkgo เริ่มอุบัติขึ้นในโลกเมื่อราว 180 ล้านปีในยุคจูราสิคซึ่งเป็นยุคที่ไดโนเสาร์เฟื่องฟู ในยุคนั้นมีพืชตระกูลนี้ถึง 4 ชนิดด้วยกัน และมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางทั้งในซีกโลกตอนเหนือและบางส่วนของซีกโลกทางตอนใต้ แต่การเปลี่ยนแปลงของดินฟ้าอากาศที่หนาวเย็นลงอย่างมากประกอบกับปรากฏการณ์ของธารน้ำแข็งไหล (Glacier) เมื่อประมาณ 2 ล้านปีที่แล้วมาเป็นสาเหตุให้พันธุ์พืชหลายชนิดสูญหายไปจากพื้นโลก รวมทั้งพืชตระกูล Ginkgo อื่นๆด้วย คงเหลือเพียงแปะก๊วยเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งพบหลงเหลืออยู่ในประเทศจีนแต่ก็ยังเป็นพืชที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ โดยพบอยู่ในธรรมชาติเพียงไม่กี่ต้น ภายหลังจึงได้มีการนำต้นแปะก๊วยไปปลูกในประเทศญี่ปุ่นและเกาหลี อีกทั้งมีการนำไปปลูกในยุโรปเมื่อราวศตวรรษที่ 18 ปัจจุบันต้นแปะก๊วยเป็นไม้ประดับที่นิยมปลูกมากตามแนวถนนและในสวนสาธารณะทั่วๆไปทั้งในยุโรปและอเมริกา (เชิดศักดิ์, 2545)

การนำใบแปะก๊วยมาใช้ทางยาเพิ่งเริ่มมีขึ้นเมื่อ ค.ศ. 1436 ในสมัยราชวงศ์หมิง และต่อมาใบแปะก๊วยก็ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างแพร่หลายในแถบยุโรป ส่วนในสหรัฐอเมริกาใบแปะก๊วยคือ 1 ใน 10 สมุนไพรยอดนิยมที่ถูกนิยมนำไปใช้เป็นอาหารเสริมอย่างกว้างขวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค.ศ. 1980 ประเทศเยอรมันนีมีการนำสารสกัดจากใบแปะก๊วยมาใช้ในการบำรุงรักษาภาวะบกพร่องของสมองในส่วนซีรีบรัม มีการทดลองกับผู้ป่วยที่มีอาการบกพร่องเรื้อรังของสมอง

ส่วนซีรีบรัมและหลอดเลือด พบว่าใบแปะก๊วยช่วยให้มีการพัฒนาทางด้านความจำ ความคิด นอนหลับได้ง่ายขึ้น ส่วนผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์นั้นในสหรัฐอเมริกาใบแปะก๊วยก็ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อเป็นยารักษาอาการดังกล่าวโดยมีการทดลองในปี ค.ศ. 1994 ทดลองให้ใบแปะก๊วยกับกลุ่มผู้ป่วยอัลไซเมอร์ พบว่าผู้ป่วยมีความจำและสมาธิได้ดีขึ้น

ในปี ค.ศ.1996 ได้มีการพบว่า ใบแปะก๊วยมีประสิทธิภาพช่วยป้องผู้ที่มีอาการ AMS (Asthma & Acute Mountain Sickness) หรือภาวการณ์ผิดปกติของการหายใจขณะขึ้นสู่ที่สูง ส่วนคนในกลุ่มที่ประสบปัญหาหูอื้ออยู่เป็นประจำ การรับประทานอาหารที่ทำจากใบแปะก๊วยยังช่วยลดภาวะหูอื้อได้อีกด้วย (เชิดศักดิ์, 2545)

ในปี ค.ศ.1998 ได้มีการทดลองเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเส้นเลือดดำ โดยให้ผู้ที่มีอาการปวดหลังจากการเดินรับประทานใบแปะก๊วยเข้าไป ทำให้พบว่าใบแปะก๊วยมีส่วนช่วยลดอาการปวดได้จริงทั้งยังทำให้เดินได้ในระยะทางที่ไกลขึ้นอีกด้วย รวมไปถึงยังมีการทดลองพบว่า ใบแปะก๊วยช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเลือดเพื่อเข้าไปเลี้ยงแขนขาได้ดีขึ้นอย่างมาก (www.ego.co.th/2006/health02.php, เมื่อวันที่ 21 สิงหาคม 2556)

ในปี ค.ศ.2003 Ahlemeyer และ Krieglstein ได้ทดลองนำสารสกัดใบแปะก๊วยมาใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบว่าสารสกัดใบแปะก๊วยสามารถที่จะรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้โดยจะไปยับยั้งการสะสมของอนุมูลอิสระและยับยั้งการตายของเซลล์

ในปี ค.ศ.2006 ได้มีการพบว่าสารสกัดใบแปะก๊วยมีประสิทธิภาพในการป้องกันความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง (CNS disorders) (Po-Chuen Chan, 2007:211-244)

และในปัจจุบันสารสกัดมาตรฐานจากใบแปะก๊วยได้ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ และกำลังเป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์อาหารเสริมซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย

2.1.2 ข้อมูลทั่วไปของใบแปะก๊วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แปะก๊วยเป็นพืชวงศ์ Ginkgoaceae จำพวก Gymonospermae กล่าวคืออยู่ในกลุ่มพืชที่แตกต่างจากไม้ดอกทั่วๆไปโดยดอกตัวเมียจะมีไข่ (Ovule) ที่ปราศจากสิ่งห่อหุ้ม แปะก๊วยมีชื่อ

วิทยาศาสตร์คือ *Ginkgo biloba* และมีชื่อสามัญคือ *Salisburya adiantifolia, Maidenhair tree, Forty-coin tree, Pai Kuo Yeh(Chinese)*(www.thaiherbinfo.com/knoeledge-herb.php?id_herb=19, เมื่อวันที่ 21 สิงหาคม 2556)

ต้นแปะก๊วยเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ซึ่งอาจจะมีความสูงได้ถึง 40 เมตรต้นที่โตเต็มที่อาจมีเส้นรอบวงถึง 7 เมตรใบเป็นใบเดี่ยว ลักษณะคล้ายพัด กว้าง 5-10 เซนติเมตร ก้านในยาว ใบแก่มีรอยหยักเว้าตรงกลาง ใบออกเวียนสลับกันหรือออกเป็นกระจุกตามปลายกิ่ง เส้นใบขนานกันจำนวนมาก ใบอ่อนมีสีเขียวอ่อน เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มเมื่อโตเต็มที่ในที่สุดจะเป็นสีเหลืองทองในฤดูใบไม้ร่วง ดอกจะแยกเพศคือดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจะอยู่คนละต้น ดอกตัวผู้ออกเป็นช่อยาว ส่วนดอกตัวเมียออกเป็นกระจุกตรงปลายกิ่งประกอบด้วยก้านดอกยาวและปลายยอดจะมีไข่ซึ่งปราศจากสิ่งห่อหุ้ม 2 อัน ต้นแปะก๊วยจะออกดอกในฤดูใบไม้ผลิ

ภาพที่ 1A แสดงลักษณะของต้นแปะก๊วย

ภาพที่ 1B แสดงลักษณะใบของแปะก๊วย

(http://www.ginkgo-biloba.fr/photos.html, เมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2556)

ในต้นที่มีอายุ 20 ปีขึ้นไปผลจะกลมรียาวประมาณ 2-3 เซนติเมตรและมีสีเหลือง เปลือกชั้นนอกห่อหุ้มด้วยเนื้อที่มีกลิ่นเหม็นภายในมีเมล็ดรูปกลมรี มีเปลือกแข็งหุ้มเนื้อใน เมล็ดมีสีเหลืองอ่อนรับประทานได้ (เอมอร และ วีณา, 2542:3-11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1C แสดงลักษณะผลของแปะก๊วย

(http://www.ginkgo-biloba.fr/photos.html, เมื่อวันที่ 2 ตุลาคม 2556)

2.1.3 สารประกอบเคมีในใบแปะก๊วย

ใบแปะก๊วยประกอบไปด้วยสารเคมีมากมายหลายชนิด โดยสารประกอบเคมีกลุ่มหลักๆซึ่งแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตารางแสดงสารประกอบหลักของใบแปะก๊วย (Po-Chuen Chan, 2007:213)

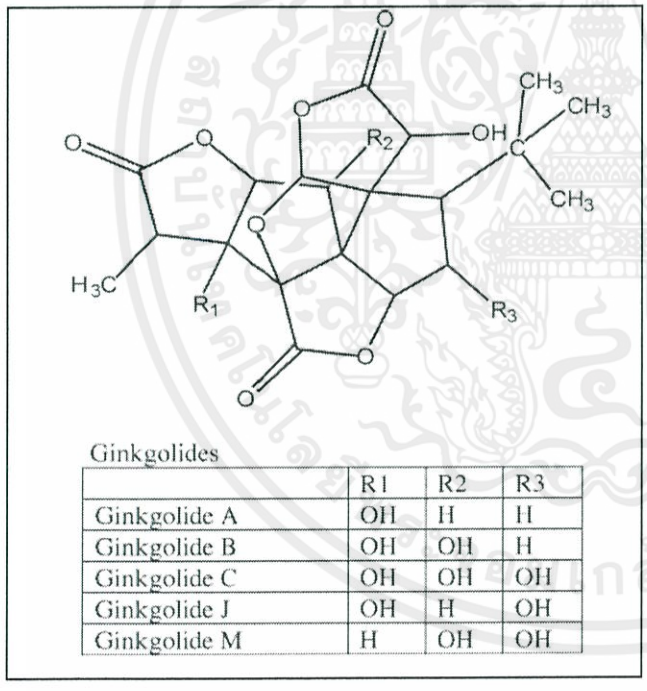
Table 1: The main constituents of *Ginkgo biloba* leaves

Class	Major chemical constituents
Terpenoids	Diterpenes: ginkgolides A, B, C, J (M is found in the root) Sesquiterpene: bilobalide Triterpenes: sterols
Flavonoids (flavone, flavonol glycosides, and aglycones)	kaempferol, quercetin, isorhamnetin, rutin, luteolin, delphidenon, myricetin
Biflavonoids	Sciadopitysin, ginkgetin, isoginkgetin, amentoflavone, bilobetin, 5'-methoxybilobetin
Organic acids	Benzoic acid derivatives (ginkgolic acid), *N*-containing acids
Polyprenols	di-*trans*-poly-*cis*-octadecaprenol
Others	waxes, steroids, 2-hexenal, cardanols, sugars, catechins, proanthocyanidins, phenols, aliphatic acids, rhamnose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

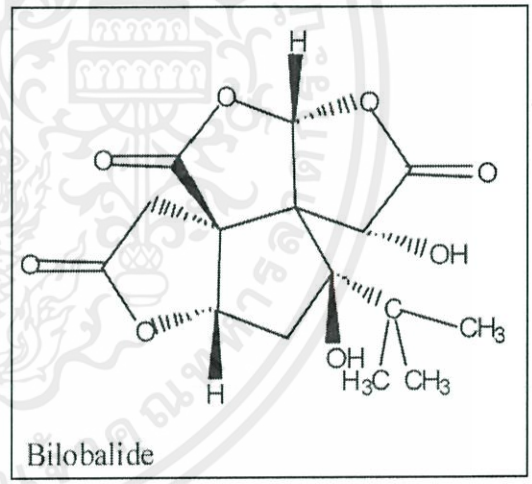
โดยสารประกอบจำพวก Diterpene terpenoids หรือ Diterpene lactones ที่สำคัญคือ Ginkgolide และ Bilobalide สำหรับ Ginkgolide ชื่อและโครงสร้างจะแสดงดังภาพที่ 2A สารประกอบประเภท Diterpene lactones จะมีคาร์บอนอะตอมอยู่ 20 อะตอม โดยสาร Ginkgolide นี้สามารถแยกออกได้เป็น Ginkgolide A, B, C, J และ M ซึ่งชื่อที่แตกต่างกันนี้เนื่องมาจากมีจำนวนและตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน Hydroxyl ที่แตกต่างกันแต่โครงสร้างหลักยังเหมือนเดิม

ส่วนโครงสร้างของ Bilobalide ดังแสดงในภาพที่ 2B ซึ่ง Bilobalide นั้นเป็นสารประเภท Sesquiterpene lactones จะมีอะตอมของคาร์บอนอยู่ 15 อะตอม ทั้ง Ginkgolide และ Bilobalide เป็นสารประกอบเคมีที่สำคัญที่ทำให้ใบแปะก๊วยมีฤทธิ์ทางชีววิทยาและเภสัชวิทยา (Po-Chuen Chan, 2007:211-244)



Ginkgolides

	R1	R2	R3
Ginkgolide A	OH	H	H
Ginkgolide B	OH	OH	H
Ginkgolide C	OH	OH	OH
Ginkgolide J	OH	H	OH
Ginkgolide M	H	OH	OH



ภาพที่ 2A แสดงสูตรโครงสร้างของ Ginkgolide

ภาพที่ 2B แสดงสูตรโครงสร้างของ Bilobalide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดสารจากใบแปะก๊วยในทางการค้าจะใช้ water-acetone หรือ water-ethanol ในการสกัดสารจากใบแปะก๊วยและในสารมาตรฐานนี้จะมี Flavonoids เป็นส่วนประกอบหลัก โดยทั่วไปในสารมาตรฐานสารสกัดใบแปะก๊วยจะมี flavonoid glycosides 22-27% terpene lactones 5-7% (มี Ginkgolide A, B, C 2.8-3.4 % และ Bilobalide 2.6-3.2 %) และ ginkgolic acid น้อยกว่า 5 mg / kg (5 ppm) ซึ่ง ginkgolic acid นี้เป็นสารพิษ ถ้ารับประทานเข้าไปในร่างกายจะทำให้ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหารและลำไส้ ปวดหัว วิงเวียนศีรษะ ถ้าหากสัมผัสถูกผิวหนังจะทำให้เกิดอาการระคายเคืองและเกิดอาการแพ้ นอกจากนั้นแล้วในใบแปะก๊วยยังมีอนุพันธ์ของ Alkylphenol และ Alkylbenzoic ซึ่งสารเหล่านี้สามารถที่จะทำให้เกิดอาการแพ้ มีพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันโรค และคุณสมบัติอื่นๆที่ไม่เป็นที่ต้องการ ดังนั้นในสารสกัดใบแปะก๊วยโดยทั่วไปจะมีการกำจัดสารนี้ออกไปด้วย (Po-Chuen Chan, 2007:211-244)

2.2 ฤทธิ์ของสารสกัดใบแปะก๊วย

2.2.1 ฤทธิ์ทางชีววิทยา (Biological effects)

สารสกัดใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* leave extract) จะออกฤทธิ์ผ่านหลายๆกลไก เช่น anti-oxidation effect, anti-PAF (platelet activating factor), Signal transduction และยับยั้งการสังเคราะห์กลูโคคอร์ติคอยด์ การออกฤทธิ์ของสารสกัดใบแปะก๊วยจะเกิดผ่านการรวมกันของกลไก 1 กลไกหรือมากกว่านั้น เช่น สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่เชื่อกันว่าจะสามารถป้องกันการเปราะบางของเส้นเลือดฝอยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยต้านการอักเสบและยังเป็นตัวจับอนุมูลอิสระ (free radical) อีกด้วย (Po-Chuen Chan, 2007) ฤทธิ์ทางด้านชีววิทยาอื่นๆมีดังนี้คือ

2.2.1.1 ความผิดปกติและการทำลายของระบบประสาท (Neurological Disorders and Neural Damage)

ตามรายงานวิชาการหลายฉบับได้มีการกล่าวถึงฤทธิ์ของใบแปะก๊วยว่ามีผลต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำอีกทั้งยังช่วยชะลอความแก่ในมนุษย์ได้อีกด้วย ปริมาณที่ใช้รับประทานโดยทั่วไปคือ 240 mg ของ GBE-761 (Ginkgo biloba leave extract-761) สารสกัดใบแปะก๊วยจะมีประสิทธิภาพทั้งในคนที่เริ่มมีอายุและคนที่ชราแล้วซึ่งมีสติปัญญาเริ่มเสื่อมถอยโดยถือว่าเป็นอัลไซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

เมอร์อีกประเภทหนึ่ง โดยใบแปะก๊วยสามารถที่จะลดการผลิตคอร์ติโคสเตอรอยด์ (Corticosteroid production) ซึ่งจะปรับปรุงการไหลเวียนของเลือดเข้าสู่สมอง เพิ่มการนำกลูโคสไปใช้ประโยชน์การผลิต ATP (ATP production) และมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial metabolism)

ตามรายงานของ Winter ได้มีการนำสารสกัดใบแปะก๊วยไปทดสอบกับหนูในปริมาณ 100 mg/kg/วัน โดยการให้ทางปากเป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ ปรากฏว่าหนูมีความจำและมีการเรียนรู้ที่ดีขึ้น (Winter, 1991:119-140) ส่วนในรายงานของ Cohen-salmon และคณะ ก็ได้มีการทดลองใช้สารสกัดใบแปะก๊วยกับหนูเช่นกัน โดยให้สารสกัดใบแปะก๊วยทางปากในปริมาณ 40 mg/kg/วัน เป็นเวลา 1-3 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าหนูมีการเรียนรู้ที่ดีขึ้นในช่วงที่มีอายุน้อยๆ (6 เดือน) และช่วงที่มีอายุมากๆ (22 เดือน) ถึงแม้ว่าในรายงานส่วนใหญ่จะมีการแสดงให้เห็นเสมอว่าใบแปะก๊วยมีฤทธิ์ที่สามารถจะป้องกันผลกระทบจากการที่ระบบประสาทถูกทำลาย ไม่ว่าจะเป็นการป้องกันระบบประสาท ทั้งจากการกระทำโดยตรงกับเซลล์ประสาทและจากผลกระทบทางอ้อมจากการปรับการไหลเวียนของเลือดและสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งข้อมูลนี้ยังไม่แน่ชัด

Krieglsten และเพื่อนร่วมงาน ระบุว่า Bilobalide และ Ginkgolide A, B ช่วยลดพื้นที่ของเนื้อร้ายจากการที่โลหิตอุดตันบนพื้นผิวสมองในหนู เนื้อร้ายจึงถูกจัดการก่อนที่จะไปอุดตันเส้นเลือดในสมอง เมื่อสารสกัดใบแปะก๊วยถูกฉีดเข้าไปในหนู สมองส่วนหน้าและสมองส่วนกลางที่ขาดเลือดก็จะมีการไหลเวียนของโลหิตที่ดีขึ้น (Krieglstein J, 1995:39-41) แต่การป้องกันระบบประสาท (Neuroprotection) ยังไม่ได้ถูกตั้งข้อสังเกต (Houghton, 1994:122-124)

2.2.1.2 การปรับปรุงการไหลเวียนโลหิต (Improvement of blood flow)

สารสกัดใบแปะก๊วยสามารถช่วยปรับปรุงการไหลเวียนของเลือดโดยตรงโดยการไปเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงและลดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงสามารถที่จะช่วยปรับปรุงการไหลของเซลล์และความหนืดของเลือด การที่สารสกัดใบแปะก๊วยไปมีผลต่อหลอดเลือดจะเกิดขึ้นได้จะต้องมีตัวกลางโดยผ่าน Endothelium – derived relaxing factor (EDRF) สันนิษฐานว่าสารตัวกลางนั้นน่าจะเป็นไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งไนตริกออกไซด์จะช่วยผ่อนคลายเซลล์ผนังของหลอดเลือด นอกจากนั้นแล้วไนตริกออกไซด์ยังเป็นตัวยับยั้งการปลดปล่อย Prostacylins จากเซลล์เพาะเลี้ยง Endothelium ของวัวอีกด้วย การกำจัดไนตริกออกไซด์ พบว่าสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

สกัดใบแปะก๊วยสามารถที่จะไปมีผลต่อ Prostacylins อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระของไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปก็อาจจะเป็นปัจจัยที่เป็นอันตรายและสามารถที่จะไปมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system ;CNS) (Dubey AK, 2004:225-229)

Bastia netto และคณะได้ข้อสรุปว่าสารสกัดใบแปะก๊วยสามารถที่จะป้องกันและช่วยเซลล์ hippocampal ในการต่อต้านพิษของไนตริกออกไซด์และความสามารถในการช่วยต่อต้านพิษของไนตริกออกไซด์ไม่ใช่แค่เพราะคุณสมบัติการต่อต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่านั้นแต่ยังเป็นเพราะความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งไนตริกออกไซด์โดยการกระตุ้นกิจกรรมของ PKC (Protein kinase C activity) (Bastianetto S, 2000:1882-1896)

2.2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological effect)

สารสกัดใบแปะก๊วยมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย โดยมีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและในคนไว้เป็นจำนวนมาก แต่ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญและมีการนำมาใช้ทางคลินิก ได้แก่

2.2.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของออกซิเจนเป็นผลมาจากสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีอยู่กว่า 20 ชนิดในใบแปะก๊วย จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดรูปแบบต่างๆ เช่น สารสกัดแอลกอฮอล์ 100% สารสกัดอะซิโตน 90% พบว่าสารสกัดเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้ง lipid peroxidation ซึ่งเหนี่ยวนำโดย hydrogen peroxide มีการลดปริมาณการผลิตอนุมูลอิสระอีกทั้งยังป้องกัน LDL จาก oxidative damage และป้องกันเม็ดเลือดแดงจาก oxidative damage ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลองและในคน นอกจากนี้สารสกัด GBE-761 (Ginkgo biloba leave extract) ยังสามารถป้องกันจอตา (retina) จาก lipid peroxidation ได้อีกด้วย (เชิดศักดิ์, 2545)

2.2.2.2 ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด (Antiplatelet aggregating activity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ginkgolide B เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง PAF (platelet aggregating factor) ซึ่งสาร PAF มีบทบาทสำคัญในการลดการเกาะตัวของเกร็ดเลือด เมื่อเกิดลิ่มเลือดหรือปฏิกิริยาการบวมและการแพ้ จาก

การทดลองให้สารสกัดเอทธานอล 30% ของใบแปะก๊วยแก่ผู้ป่วย 2 ราย พบว่ามีผลทำให้ bleeding time เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาในคนโดยใช้สาร Ginkgolide B (BN 52021) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์แรงที่สุดในกลุ่มกิงโกไลด์ พบว่าต้องให้ในขนาด 120-240 มก./กก. ในแต่ละวัน จึงจะเห็นผลในการต้าน PAF แต่แปะก๊วยจะไม่มีผลต่อการจับตัวของเกร็ดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วย ADP หรือสารอื่นๆ (เชิดศักดิ์, 2545)

2.2.2.3 ฤทธิ์เพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปยังสมอง (Enhancement of cerebral blood flow)

สารสกัดใบแปะก๊วยด้วยเอทธานอล 30% และ 100% ในขนาด 120-300 มก./คน/วัน เป็นเวลา 4-12 สัปดาห์ มีผลในการเพิ่มปริมาณโลหิตที่ไปเลี้ยงสมองทำให้อาการต่างๆที่เกิดจากโลหิตไปเลี้ยงสมองไม่พอ (Cerebral insufficiency) ดีขึ้นภายใน 4 สัปดาห์ และหลังจากให้สารเป็นเวลา 12 สัปดาห์ อาการของผู้ป่วยดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก การศึกษาผลของสารสกัด LI 1370 ในผู้ป่วยที่มีอาการโลหิตไปเลี้ยงสมองไม่เพียงพอจำนวน 90 คน ซึ่งมีอายุเฉลี่ย 62.7 ปี โดยให้สารสกัด 150 มก./วัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มีความจำดีขึ้น ระยะเวลาของความตั้งใจ (attention span) ในการทำงานเพิ่มขึ้น ความสามารถในการทำงานต่างๆที่ต้องใช้การปรับตัว และการตัดสินใจที่รวดเร็วดีขึ้นแต่การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมบางอย่างจะเห็นผลหลังสัปดาห์ที่ 6 (เชิดศักดิ์, 2545)

2.2.2.4 ฤทธิ์กระตุ้นระบบไหลเวียนของโลหิต (Circulation stimulation)

สารสกัดด้วยอะซิโตน และเอทธานอล 100% ของใบแปะก๊วยมีผลในการกระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต เมื่อฉีดสารละลาย 50, 100, 150 และ 200 มก.ของสารสกัด GBE 761 เข้าทางเส้นเลือดดำในคนไข้ 42 คน พบว่าสามารถเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตที่ผิวหนังได้ โดยฤทธิ์จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณสารสกัดที่ให้

จากการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเส้นเลือดแดงส่วนปลายอุดตัน จำนวน 60 คนโดยให้สารสกัด GBE 761 ปริมาณ 40 มก. วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดดังกล่าวช่วยให้ผู้ป่วยสามารถเดินได้ไกลขึ้น (เชิดศักดิ์, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.5 ฤทธิ์เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ (Learning enhancement)

การทดลองให้สารสกัดอะซิโตน-น้ำ (1:1) ของใบแปะก๊วยในขนาด 50 มก./กก. ในหนูขาว พบว่าหนูสามารถเรียนรู้ได้เร็วขึ้นเมื่อให้สารสกัดก่อนการทดสอบ ส่วนสารสกัดเอทธานอล 95% ในขนาด 100 มก./กก. ให้แก่หนูถีบจักร พบว่าหนูสามารถเรียนรู้ได้เร็วขึ้นและสามารถจดจำสิ่งที่เรียนรู้ได้ (เชิดศักดิ์, 2545)

2.2.2.6 ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเพอรอกไซด์ (Lipid peroxide formation inhibition)

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทธานอล 30% ของใบแปะก๊วยกับเซลล์เลี้ยงของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแดงที่ไปยังปอด พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างลิปิดเพอรอกไซด์ซึ่งเหนี่ยวนำด้วย tert-butylperoxide ได้ (เชิดศักดิ์, 2545)

2.2.2.7 ฤทธิ์ช่วยให้ความจำดีขึ้น (Memory enhancement effect)

สารสกัด น้ำ-แอลกอฮอล์ในขนาด 40 มก./กก. เมื่อฉีดเข้าช่องท้องของหนูถีบจักร ช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำของสัตว์ทดลอง นอกจากนี้การให้สารสกัดเอทธานอล 100% ในขนาด 120-240 มก./วัน แก่ผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบว่าแปะก๊วยมีผลต่อ cognitive function ของผู้ป่วยทำให้การรับรู้ดีขึ้น เมื่อให้สารสกัดเอทธานอล 30% ในขนาด 320 มก./คน แก่ผู้ป่วยสูงอายุ 18 คน ซึ่งมีอาการความจำเสื่อมเนื่องมาจากความชรา พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถช่วยให้ความจำของผู้ป่วยดีขึ้น (เชิดศักดิ์, 2545)

2.2.2.8 ฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Vasoconstrictor activity)

สารสกัดใบแปะก๊วย 30% เอทธานอล เมื่อให้รับประทานในขนาด 320 มก./คน ร่วมกับสารสกัดโสมในอัตราส่วน 3:5 (แปะก๊วย 3 ส่วนต่อโสม 5 ส่วน) พบว่ามีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว โดยวัดจากความดันโลหิต 1 ชั่วโมงหลังจากให้ยา (เชิดศักดิ์, 2545)

2.2.2.9 ฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vasodilator activity)

เมื่อให้สารสกัดใบแปะก๊วยด้วย 30%เอทธานอลทางหลอดเลือดดำอย่างช้าๆ ในขนาด 25 มล./คนแก่ผู้ป่วย 15 คนซึ่งมีแผล (lesion) ที่เส้นเลือดแดงนอกกะโหลกศีรษะ แล้วทำการวัดการไหลเวียนของเลือดที่ผิวหนังที่ส่วนมือและเท้า พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (เชิดศักดิ์, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

2.2.2.10 ฤทธิ์เพิ่มการมองเห็น (Visual improvement)

การให้สารสกัด 90%เอทธานอล ทางปากแก่ผู้ป่วยที่มีอาการ senile macular degeneration ซึ่งอาจทำให้ตาบอดได้นั้น พบว่าสามารถทำให้การมองเห็นระยะยาว และระยะมองเห็น (visual field) ของผู้ป่วยดีขึ้น นอกจากนี้การให้สารสกัดแปะก๊วยแก่ผู้ป่วยเบาหวานที่มีอาการเสื่อมของจอตาระยะเริ่มแรกเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าผู้ป่วยสามารถมองเห็นได้ดีขึ้น (เชิดศักดิ์, 2545)

2.2.2.11 ฤทธิ์ยับยั้งการเสื่อมของสมอง (Antidementia activity)

การให้สารสกัดใบแปะก๊วยด้วย 30%เอทธานอล (LI 1370) ทางปากในขนาด 150 มก./วัน ในผู้ป่วยอายุ 57-76 ปี ซึ่งมีอาการทางสมอง จำนวน 50 คน พบว่าอาการทางสมองของผู้ป่วยดีขึ้นหลังจากให้ยา 3 สัปดาห์ และอาการโดยรวมดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนหลังจากให้ยาติดต่อกัน 6 สัปดาห์

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากใบแปะก๊วยมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย สารสกัดใบแปะก๊วยที่นำมาใช้ในการผลิตยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีจำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่จะเป็นสารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญคือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ร้อยละ 24 และสารกลุ่มเทอร์ปีนร้อยละ 6 (เชิดศักดิ์, 2545)

สารสกัดใบแปะก๊วยที่อยู่ใน monograph ในเภสัชตำรับของชาวเยอรมัน และได้รับการยอมรับจากคณะกรรมการด้านยาสมุนไพรของประเทศเยอรมนี ได้แก่ สารสกัดอะซีโตน-น้ำจากใบแปะก๊วยเนื่องจากสารสกัดนี้ผ่านการศึกษาวิจัยทางคลินิก ต่อมาในปี 1997 คณะกรรมการฯ ได้กำหนดไว้ใน monograph ของสารสกัดใบแปะก๊วย ให้มีปริมาณของ ginkgolic acid ได้สูงสุด 5 ppm สารสกัดใบแปะก๊วยใน monograph ดังกล่าว มีชื่อว่า Ginkgo biloba leaf extract มีสัดส่วนของใบต่อสารสกัด 50:1 โดยน้ำหนัก สารสกัดนี้มี glycoside-flavonone 22-27% เทอร์ปีนแลคโตน 5-7% (ได้แก่ ginkgolides A, B และ C ประมาณ 2.8-3.4% และbilobalide ประมาณ 2.6-3.2%) และ ginkgolic acid ต่ำกว่า 5 ppm สารสกัดดังกล่าวมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาดังนี้คือเพิ่มความต้านทานการขาดออกซิเจนโดยเฉพาะในเนื้อเยื่อสมอง ยับยั้งอาการบาดเจ็บที่ทำให้เกิดอาการสมองบวม ลดอาการบวมที่จอตา (retina) เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ เพิ่มความดันโลหิต ยับยั้งกลไกการแข็งตัวของเลือดโดยยับยั้ง PAF (platelet activating factor) ยับยั้งอนุมูลออกซิเจนที่เป็นพิษ (ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่แสดงคุณสมบัตินี้) ปกป้องเส้นประสาท (Neuroprotective effect) ค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LD_{50} ในหนู (mouse) เมื่อให้ทางปากเท่ากับ 7,725 มก./กก.นน.ตัว และเมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำเท่ากับ 1,100 มก./กก.นน.ตัว ไม่พบผลที่ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ (mutagen) หรือทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) และไม่เป็นพิษต่อระบบอวัยวะสืบพันธุ์ (เชิดศักดิ์, 2545)

2.3 ข้อมูลในสัตว์ทดลอง (Preclinic evidence)

สารสกัดจากใบแปะก๊วยที่มี bilobalide เมื่อรับประทานหรือฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) ยับยั้งอาการบวมของสมองในสัตว์ทดลองต่างๆ ที่ถูกกระตุ้นให้สมองบวมด้วย triethyl zinc chloride ความต้านทานต่อภาวะการขาดออกซิเจนของสมองจะเพิ่มขึ้น สารสกัดที่มี ginkgo-type lactone และ flavonol glycoside ใช้รักษาอาการสมองทำงานผิดปกติ และรักษาอาการไหลเวียนของโลหิตแดงที่ส่วนปลายผิดปกติ (เชิดศักดิ์, 2545)

2.4 ข้อมูลทางคลินิกและขนาดที่ใช้ต่อวัน

สารสกัดจากใบแปะก๊วยสามารถที่จะช่วยรักษาโรคเส้นเลือดแดงส่วนปลายอุดตัน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ก้าวเดินลำบาก รักษาอาการสมองเสื่อมสมรรถภาพ (dementia) ที่มีอาการดังนี้คือ สูญเสียความจำ ขาดสมาธิ อารมณ์ซึมเศร้า งุนงง มีเสียงในหู (tinnitus) และปวดหัว ให้ตรวจดูก่อนว่าสาเหตุของโรคไม่ได้ต้องการการรักษาเฉพาะเจาะจง แต่อาจจะมีผลข้างเคียงทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้ทำงานผิดปกติ ปวดหัวและแพ้ แต่ไม่พบได้น้อยมาก ส่วนขนาดที่จะต่อวันสำหรับสารสกัดแห้ง 120-240 มก. แบ่งให้วันละ 2-3 ครั้ง สำหรับรักษาอาการ dementia ให้ยาติดต่อกัน 8 อาทิตย์ แต่ไม่เกิน 3 เดือนสารสกัดแห้ง 120-160 มก. แบ่งให้วันละ 2-3 ครั้ง สำหรับรักษาอาการเส้นเลือดแดงส่วนปลายอุดตัน และอาการงุนงง มีเสียงในหู ให้ยาติดต่อกัน 6-8 อาทิตย์ การให้ยานานกว่านี้ไม่มีประโยชน์ต่อการรักษา (เชิดศักดิ์, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Qing Lang และ C.M. Wai (1999) ได้ศึกษาถึงผลของ pH ที่มีต่อปริมาณของสารสกัด Ginkgolide และ Bilobalide ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction พบว่า pH 5 เป็น pH ที่ให้ปริมาณสารสกัดหรือ %Recover สูงที่สุดเมื่อเทียบกับ pH อื่นๆ

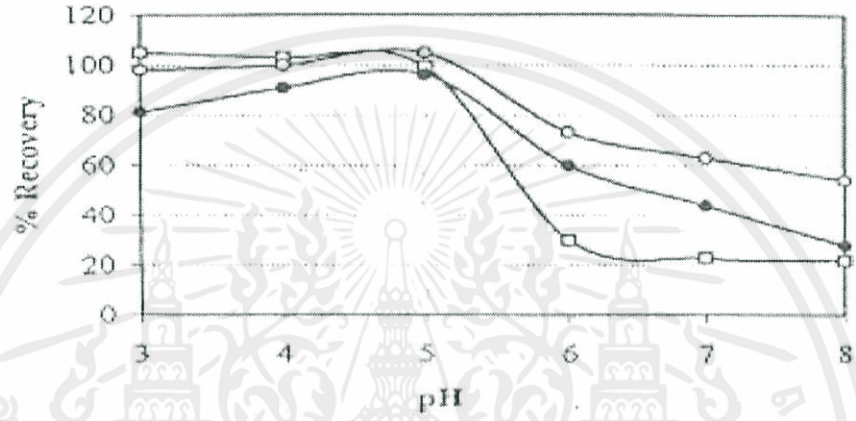


Figure 2. pH effects on liquid/liquid extraction recoveries of (○) ginkgolide A (100 μg), (●) ginkgolide B (100 μg), and (□) bilobalide (150 μg).

ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และ %Recovery (Qing Lang and C.M. Wai.1999)

M.-J. Dubber,I. Kanfer (2006) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์หา Terpene trilactone ใน *Ginkgo biloba* โดยใช้เทคนิค HPLC-ELSD โดยใช้ Phenomenex Luna Column (5μm) C18 column และใช้ขนาดเป็น 250 mm x 2.00 mm อุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 45°C ส่วน Mobile phaseใช้ Methanol/Water สัดส่วน 70:30 ใน 6 นาทีแรกหลังจากนั้นใช้สัดส่วน 30:70 ตลอดการวิเคราะห์โดยใช้อัตราการไหล (Flow rate) เป็น 350 μl/min ซึ่งวิธีนี้จะมีขีดจำกัดของการวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์อยู่ที่ 31.25 และ 62.50 ng

Cui Tang, Xiuli Wei และ Chunhua Yin (2003) ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์ Ginkgolide และ Bilobalide ในสารสกัดใบแปะก๊วย (Ginkgo biloba leave extract) ด้วย RP-HPLC (ELS Detection) โดยสารตัวอย่างที่ใช้ฉีดเตรียมได้โดยการสกัดด้วย Ethyl acetate แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย Aluminum Oxide Column แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ C-18 และใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Methanol-Water (33:67 v/v) เป็นสารละลายชะ(Mobile phase) และใช้ ELSD Condition ดังนี้ อุณหภูมิของ nebulizer เป็น 40°C และ nebulizer gas ที่ความดัน 3.5 bar ซึ่งวิธีนี้ให้ % recovery ระหว่าง 98.3-102.1%

Pushpinder Kaur (2009) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ Terpene trilactones ด้วย Rapid Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic method โดยใช้ Evaporative Light Scattering Detection เป็น Detector (RP-HPLC-ELSD) วิธีนี้จะหาปริมาณของ ginkgolide A (GA), ginkgolide B (GB), ginkgolide C (GC), ginkgolide J (GJ) และ bilobalide (BB) ได้ภายในเวลา 8 นาที โดยใช้ Zorbax RP-C18 เป็นคอลัมน์ และ Mobile phase ที่ใช้คือ methanol-water-tetrahydrofuran ส่วนอุณหภูมิของ drift tube ตั้งไว้ที่ 90 °C และ nitrogen flow rate ตั้งไว้ที่ 1.5 standard liter/min (SLM)

Teris A. van Beek (2002) ได้ทำการวิเคราะห์ทางเคมีและการควบคุมคุณภาพของสารสกัดใบแปะก๊วย โดยสารประกอบที่สำคัญในใบแปะก๊วยคือ Terpene trilactones ซึ่งได้แก่ ginkgolides A, B, C, J และ bilobalide โดย Teris A. van Beek ได้ทำการวิเคราะห์ Terpene trilactones ด้วย Thin-layer Chromatography (TLC) และ HPLC โดย detector ที่ใช้ได้แก่ RI, ELSD, MS และ GC-FID

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ในโครงงานพิเศษนี้จะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน โดยการทดลองตอนที่ 1 คือการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลายอินทรีย์ 19 ชั่วโมงและการทดลองตอนที่ 2 คือการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลายบัฟเฟอร์ น้ำ และ Ethanol 85.4 % แล้วนำไปวิเคราะห์ผลต่อโดยใช้เทคนิค HPLC (ELS Detector)

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Evaporative Light Scattering Detectors ยี่ห้อ Varian รุ่น Prostar และ Alltech
2. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) บริษัท Metrohm swiss made รุ่น 827 pH Lab ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
3. เตาแผ่นความร้อน (Hot Plate)
4. กรวยแยก (Separating Funnel)
5. ชุดกรองลดความดัน (Buchner Funnel & Flask)
6. กระบอกตวง (Cylinder) witeg GERMANY DIFFICO
7. บีกเกอร์ (Beaker) SCHOTT DURAN
8. ขวดฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ (Vial & Caps)
9. Cellulose membrane filter 0.45 μm
10. กระดาษกรอง (Filter paper) Whatman filter paper no.2
11. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flasks)
12. ขวดดูแรน (Laboratory Bottle) DURAN
13. เดซิคเคเตอร์ (Desiccators)
14. ปิเปต (Pipette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ตัวอย่างและสารเคมี

1. ผงใบแปะก๊วยแห้ง เวชพงศ์โอสถ (ฮกอันตึ๊ง) จำกัด
2. สารสกัดใบแปะก๊วยชนิดเม็ด HERBAL ONE
3. Absolute Ethanol (AR Grade)
4. Dichloromethane
5. Ultrapure water
6. Methanol (HPLC Grade)
7. Methanol (AR Grade)
8. Acetone
9. Isopropanol
10. Ethyl acetate
11. Hydrochloric acid
12. Sodium hydroxide
13. Potassium hydroxide
14. Anhydrous sodium sulphate
15. Anhydrous sodium sulphate
16. Sodium chloride
17. Sodium acetate
18. Acetic acid
19. Trisodium citrate
20. Dipotassium monohydrogen phosphate
21. Monopotassium dihydrogen phosphate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทดลองตอนที่ 1 การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในสารละลายอินทรีย์ 19 ชั่วโมง

1. ชั่งผงใบแปะก๊วยแห้ง 30 g ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 mL 6 ใบ
2. ตวงสารละลายอินทรีย์ Ethanol, Methanol (AR Grade), Isopropanol, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Acetone อย่างละ 300 mL โดยใช้กระบอกตวงขนาด 500 mL
3. เทสารละลายอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดลงในบีกเกอร์ใบที่ 1-6 ที่มีผงใบแปะก๊วยตามลำดับ
4. ใช้แท่งแก้วคนสารคนให้สารให้เข้ากันจากนั้นใช้กระจกนาฬิกาปิดไว้แล้วแช่ทิ้งไว้ 19 ชั่วโมง
5. นำมากรองลดความดันโดยใช้กระดาษกรอง What man เบอร์ 2 เพื่อกำจัดผงใบแปะก๊วยแห้ง
6. นำสารที่กรองได้ (Filtrate) มาทำการระเหยสารละลายอินทรีย์ในตู้ดูดควัน(Hood) ที่ 60 องศาเซลเซียส จนไม่มีสารละลายอินทรีย์เหลืออยู่ จะได้สารสกัดที่มีลักษณะเหมือนน้ำมัน มีสีเขียวเข้มจนเกือบดำ
7. จากนั้นรอให้บีกเกอร์เย็นแล้วนำไปชั่ง จดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (น้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักของสารสกัดรวมกับน้ำหนักของบีกเกอร์ ต้องนำน้ำหนักของบีกเกอร์เปล่ามาหักลบออก ก็จะได้น้ำหนักสารสกัด)
8. นำสารตัวอย่างที่ได้ในบีกเกอร์ถ่ายลงในขวด Vial แล้วนำมาเก็บไว้ในเดซิคเคเตอร์จนกว่าจะใช้งาน
9. นำสารตัวอย่างจากขวด Vial มาทำการเตรียมเป็นสารละลายเพื่อนำไปฉีด HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.5

3.3.2 การทดลองตอนที่ 2 การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน บัฟเฟอร์ น้ำ และ Ethanol 85.4%

1. ชั่งใบแปะก๊วย 30 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 mL 5 ใบ
2. ตวง บัฟเฟอร์ pH 5, pH 6, pH 7, Ethanol 85.4 % ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.3.3/3.3.4 และน้ำอย่างละ 300 mL โดยใช้กระบอกตวงขนาด 500 mL
3. เทสารจากกระบอกตวงลงในบีกเกอร์ที่ชั่งผงใบแปะก๊วยแห้งมาแล้วจากนั้นใช้แท่งแก้วคนสารให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. จากนั้นนำไปต้มโดยใช้ Hot Plate นาน 10 นาที (ทำใน Hood)
5. รอให้เย็นแล้วนำไปกรองแบบลดความดัน
6. นำส่วนที่กรองได้ (Filtrate) มาปรับ pH เป็น 5 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH
7. เติม NaCl จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% (v/v) ใช้แท่งแก้วคนสารให้เข้ากัน
8. นำไปสกัดในกรวยแยกด้วย Dichloromethane ไขชั้นล่าง (ชั้นของ Dichloromethane) เก็บชั้นนี้ไว้ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกรอบ
9. เทชั้นของ Dichloromethane รวมกันแล้วเติม anh.Na_2SO_4 เพื่อดูดน้ำออกจนแห้ง
10. กรองผ่านกระดาษกรอง what man เบอร์ 2 เพื่อเอา anh.Na_2SO_4 ออก
11. ระเหย Dichloromethane ทิ้งโดยใช้ Hot Plate และ Water bath (ทำใน Hood) ระเหยจนได้สารสกัดที่แห้ง
12. นำบีกเกอร์ไปชั่งน้ำหนักแล้วจดบันทึกน้ำหนักที่ได้ (น้ำหนักที่ได้นี้เป็นน้ำหนักของสารสกัดรวมกับน้ำหนักของบีกเกอร์ ต้องนำน้ำหนักของบีกเกอร์เปล่ามาหักลบออก ก็จะได้น้ำหนักสารสกัด)
13. ถ่ายสารสกัดจากบีกเกอร์ลงในขวด Vial แล้วทำไปเก็บไว้ในเดซิคเคเตอร์จนใช้งาน
14. นำสารตัวอย่างจากขวด Vial มาทำการเตรียมเป็นสารละลายเพื่อนำไปฉีด HPLC ตามวิธีในข้อ 3.3.5

3.3.3 การเตรียมสารละลาย Ethanol 85.4 % (คำนวณโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$)

1. ตวง Absolute Ethanol (AR Grade) โดยใช้กระบอกตวงมา 215 mL และเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
2. ตวง Absolute Ethanol (AR Grade) โดยใช้ขวดวัดปริมาตรมา 86 mL แล้วเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.3.4 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

ก. เตรียมสารละลาย Acetate buffer pH 5 (CH_3COOH / CH_3COONa)

ชั่งผง CH_3COONa 1.296 g ละลายในน้ำ 250 mL จากนั้นเติมกรด CH_3COOH 0.31 mL ละลายอย่างสมบูรณ์จากนั้นวัดค่า pH ด้วย pH meter (ปรับ pH เพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หากยังไม่ได้ pH 5 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH) แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 300 mL ด้วยน้ำกลั่น

ข. *เตรียมสารละลาย Citrate buffer pH 6*

ชั่งผง Trisodium citrate ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) 4.412 g ละลายในน้ำ 270 mL ละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดค่า pH ด้วย pH meter แล้วปรับ pH ให้เป็น 6 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH แล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 300 mL ด้วยน้ำกลั่น

ค. *เตรียมสารละลาย Phosphate buffer pH 7 (KH_2PO_4 / K_2HPO_4)*

ชั่งผง KH_2PO_4 0.858 g และ K_2HPO_4 1.516 g ละลายในน้ำ 250 mL ละลายอย่างสมบูรณ์ จากนั้นวัดค่า pH ด้วย pH meter แล้วปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M KOH แล้วค่อยปรับปริมาตรให้เป็น 300 mL ด้วยน้ำกลั่น

ง. *การเตรียมสารละลาย 1 M NaOH*

ชั่งผง NaOH 10 g ละลายในน้ำกลั่น 200 mL เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

จ. *การเตรียมสารละลาย 1 M KOH*

ชั่งผง KOH 5.61 g ละลายในน้ำกลั่น 80 mL เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ฉ. *การเตรียมสารละลาย 1 M HCl*

ปิเปต 37% HCl (conc.HCl) มา 20.8 mL ลงน้ำ 200 mL เทลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.3.5 การเตรียมสารเพื่อฉีด HPLC (ใช้เตรียมทั้งสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง)

1. ชั่งสารสกัดมา 0.15 g ละลายใน 2 mL Ethanol 50% (เตรียมจาก Absolute Ethanol)
2. ใช้แท่งแก้วคนสารให้เข้ากันจากนั้นนำไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน
3. ค่อยๆกรองแล้วถ่ายสารที่กรองแล้วลงในขวด Vial สำหรับฉีด HPLC

* หมายเหตุ ขวด Vial จะต้องกลั้วด้วย Methanol (HPLC Grade) แล้วทิ้งไว้ให้แห้งก่อนที่จะเตรียมสารเพื่อฉีด HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC

Column	Mobile phase	Detector
Phenomenex Luna (5µm) C18 Dimensions 250 mm x 4.6 mm และ Temperature 45 °C	Methanol/Water30:70 (v/v) สำหรับ 6 นาทีแรก หลังจากนั้นใช้สัดส่วน 70:30 ตลอดการวิเคราะห์	ELS Detector Gas flow และ Drift tube temperature ตั้งที่ 1.5 l/min และ 117.5°C ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 ผลการทดลองตอนที่ 1 การแช่ผงใบแปะก๊วยในสารละลายอินทรีย์ 19 ชั่วโมง

จากวิธีการทดลองในข้อที่ 3.2.1 โดยการแช่ผงใบแปะก๊วย ในสารละลายอินทรีย์ 6 ชนิดเป็นเวลา 19 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

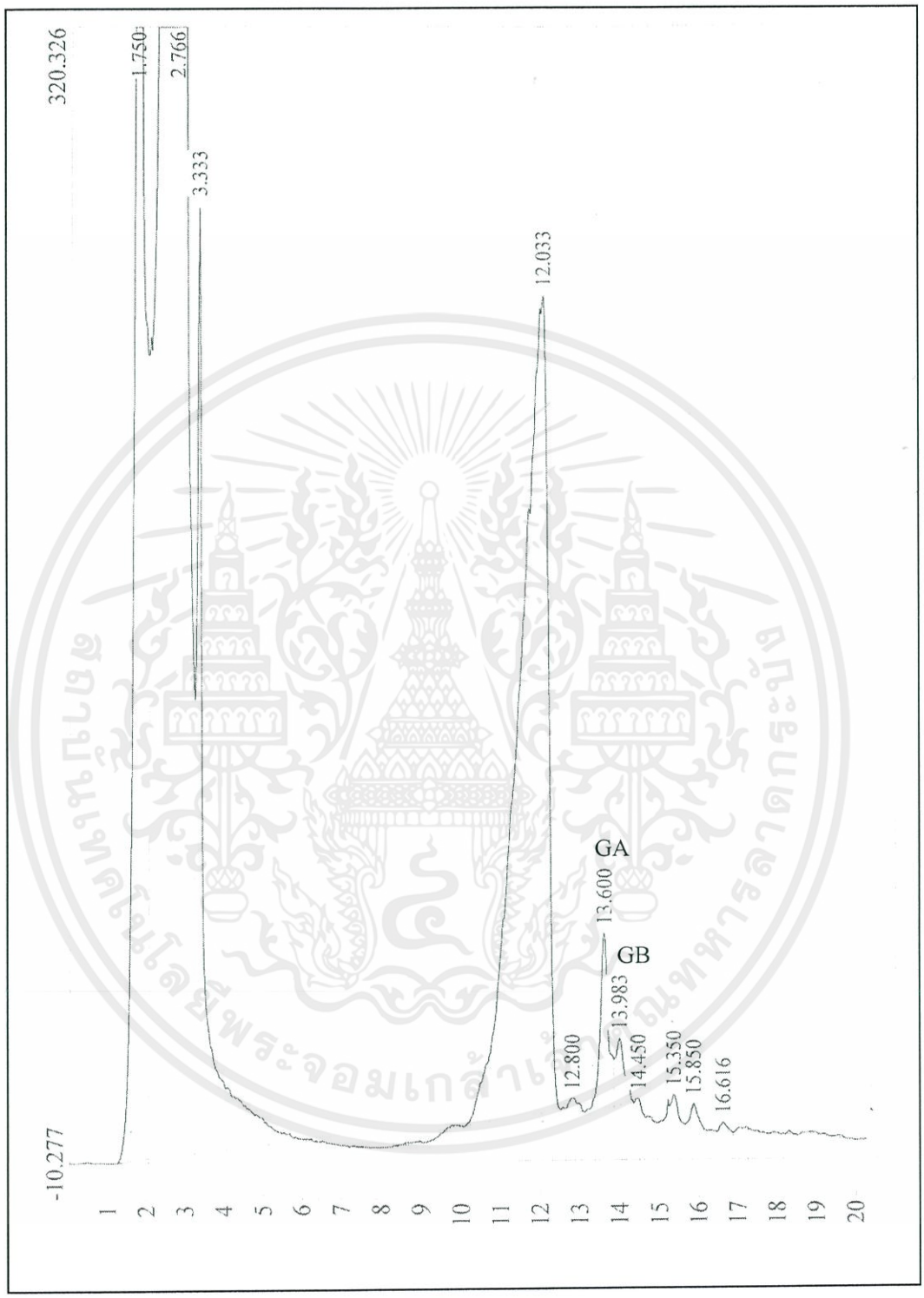
ตารางที่ 3 ตารางแสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธี ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

วิธีการสกัด	น้ำหนักใบแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)
1. Methanol	30.0	6.8986
2. Ethanol	30.0	5.4240
3. Isopropanol	30.0	2.9685
4. Dichloromethane	30.0	2.4046
5. Ethyl acetate	30.0	2.5598
6. Acetone	30.0	2.8456

ตารางที่ 4 ตารางแสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram

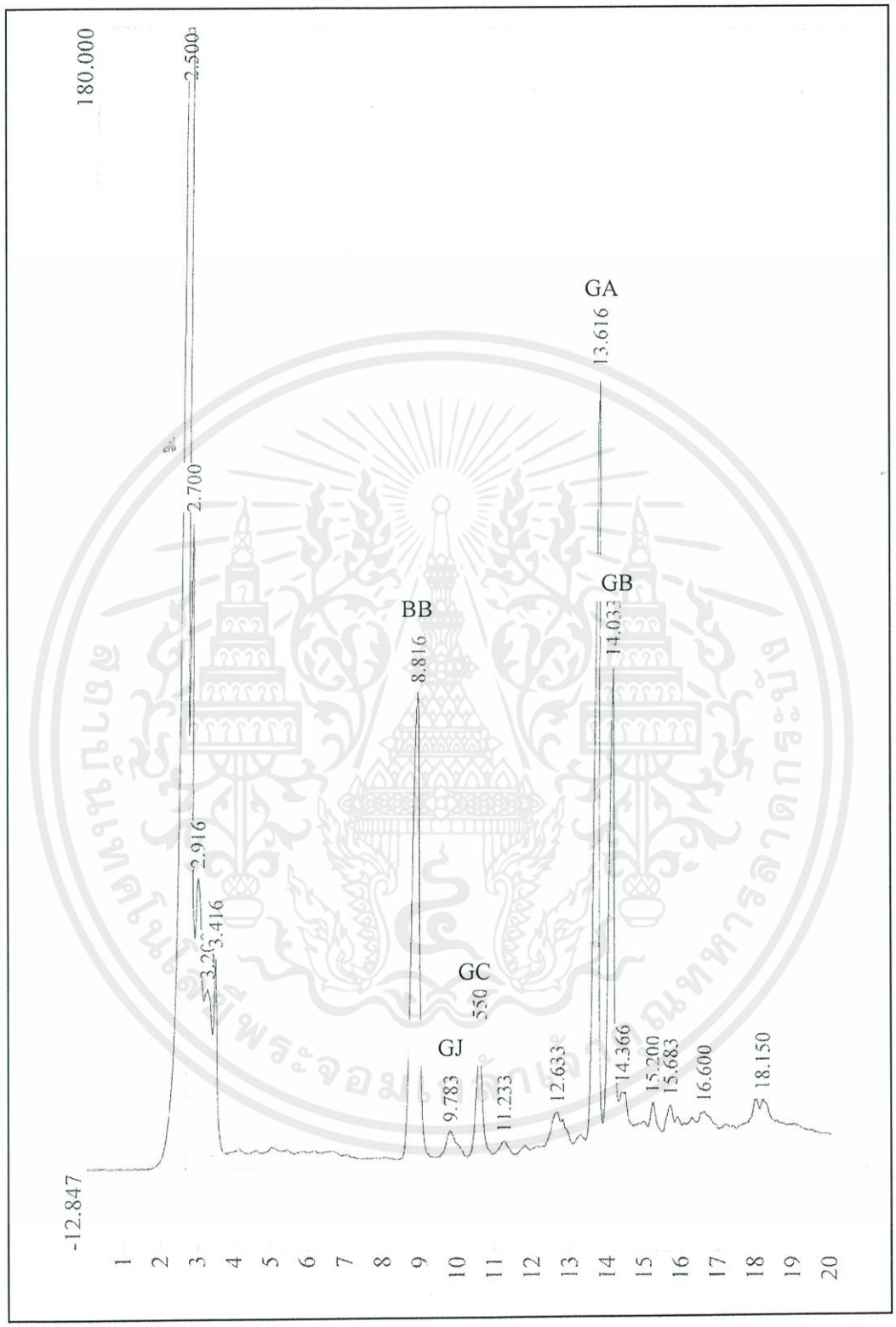
วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Methanol	3812.15	823.4135	1566.076	6683.658	5571.355
2. Ethanol	3082.894	721.929	985.181	3310.121	4596.899
3. Isopropanol	1224.402	56.794	245.243	1040.245	1387.713
4. Dichloromethane	402.527	13.762	10.768	570.4435	232.56
5. Ethyl acetate	1077.193	80.488	201.87	1015.269	645.1405
6. Acetone	704.968	14.431	110.4415	594.043	447.526

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



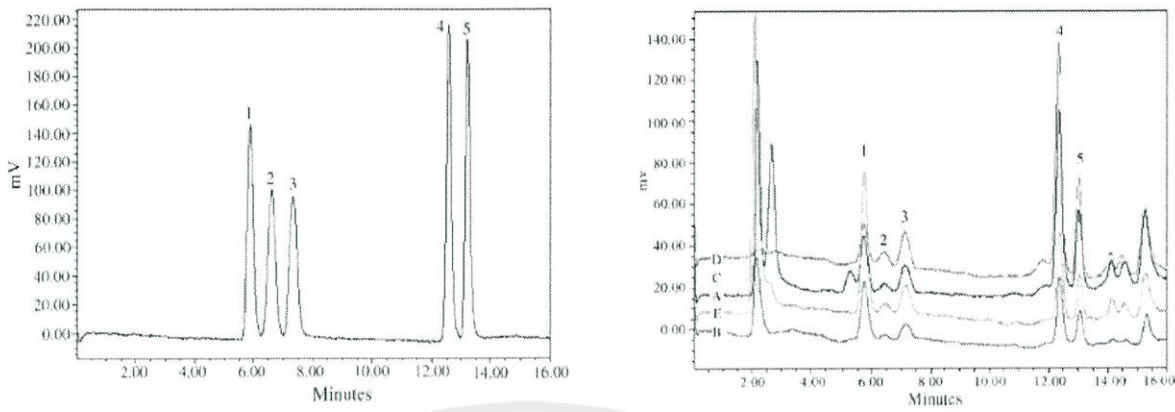
ภาพที่ 4 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ในสารสกัดมาตรฐาน HERBAL ONE (Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm x 4.6 mm, flow rate of 1.5 l/min, ELS Detector)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

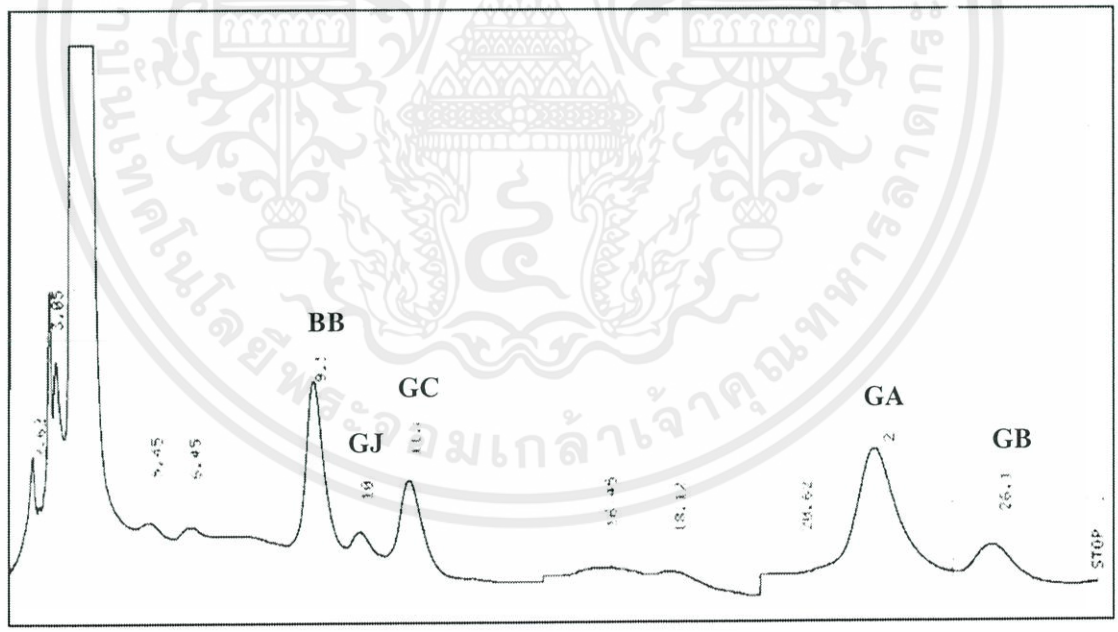
ภาพที่ 5 HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones ที่สกัดโดย Ethyl acetate (Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm x 4.6 mm, flow rate of 1.5 l/min, ELS Detector)



A B

ภาพที่ 6 **A**: HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน Bilobalide และ Ginkgolide A, B, C, J

B: HPLC-ELSD chromatogram ของสารตัวอย่าง peak 1: BB, peak 2: GJ, peak 3: GC, peak 4: GA, peak 5: GB (M.-J. Dubber and I. Kanfer, 2006)(Phenomenex Luna Column ขนาด 250 mm x 2.0 mm, flow rate of 0.35 ml/min, ELS Detector)



ภาพที่ 7 HPLC Chromatogram ของ Terpenoids ในสารสกัดมาตรฐาน (เชิดศักดิ์, 2545)

(μBondapack C18 (Waters asocc.) column, flow rate of 1 ml/min, RI Detector)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

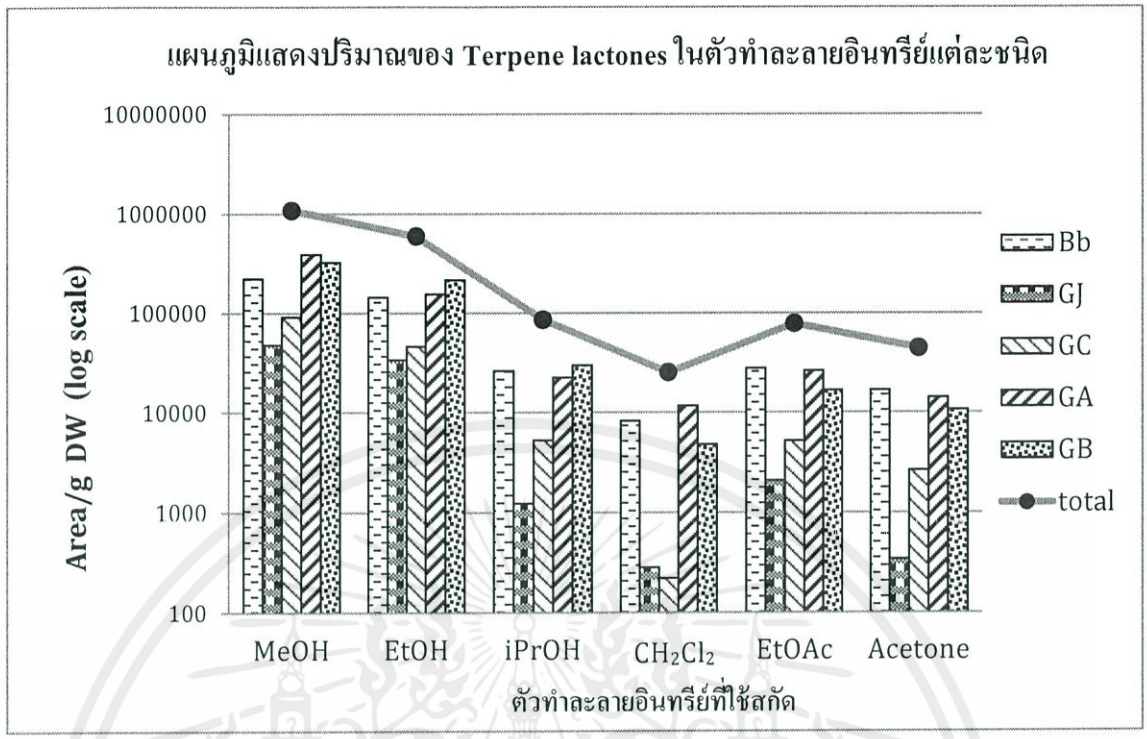
จากภาพ HPLC Chromatogram (ภาพที่ 4-7) แสดงให้เห็นถึง Retention time (RT) ของ Terpene lactones ซึ่งได้แก่ BB 8.8 min, GJ 9.7 min, GC 10.5 min, GA 13.6 min และ GB 14 min จาก HPLC Chromatogram ของสารตัวอย่าง จะได้พื้นที่ใต้กราฟตามตารางที่ 4 นำพื้นที่ใต้กราฟ (Area) และข้อมูลในตารางที่ 3 มาคำนวณ Area/g DW (วิธีการคำนวณดูในภาคผนวก) ได้ค่าดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ตารางแสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpenoids

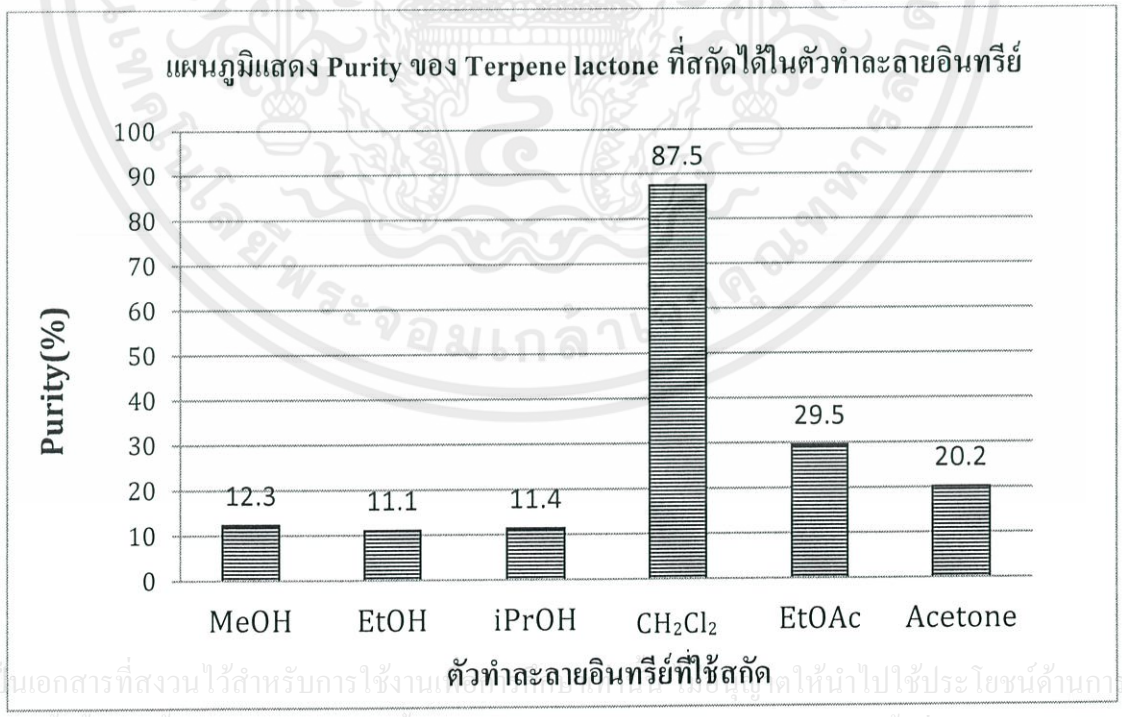
วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB	Total Terpenoids
1. Methanol (MeOH)	223341.8	48241.19	91751.41	391574.4	326408.1	1,081,316.85
2. Ethanol (EtOH)	144775.9	33902.54	46265.12	155446.7	215875.2	596,265.44
3. Isopropanol (iPrOH)	26449.15	1226.846	5297.663	22471.05	29976.94	85,421.65
4. Dichloromethane (CH_2Cl_2)	8272.79	282.8385	221.3054	11723.83	4779.605	25,280.37
5. Ethyl acetate (EtOAc)	27866.21	2082.167	5222.232	26264.28	16689.32	78,124.21
6. Acetone	16822.28	344.3594	2635.407	14175.34	10679.08	44,656.46

จากตารางที่ 5 นำมาสร้างแผนภูมิรูปแท่งแสดงปริมาณของ Total Terpennoids ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยให้ Area/g DW เป็นแกน Y และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดเป็นแกน X ดังแสดงในภาพที่ 8 และนำค่า %Area (แสดงในภาคผนวก) มาสร้างเป็นแผนภูมิรูปแท่งดังภาพที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 9 แผนภูมิแสดง Purity ของ Terpene lactones ที่สกัดได้ในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด

จากภาพที่ 8 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ Total Terpenoids ที่ได้จากการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด จะเห็นว่า ปริมาณของ Total Terpenoids เป็นดังนี้ การแช่ใน Methanol > แช่ใน Ethanol > แช่ใน Isopropanol > แช่ใน Ethyl acetate > แช่ใน Acetone > แช่ใน Dichloromethane และเมื่อมองภาพรวมของ Ginkgolide และ Bilobalide พบว่า ในตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด สามารถสกัด BB, GA และ GB ออกมาได้ในปริมาณที่สูง ส่วนGJ และGC ถูกสกัดออกมาในปริมาณที่น้อย แต่ถ้าพิจารณาเพียงแค่ปริมาณของ GA และ GB เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีววิทยาและเภสัชวิทยาดีที่สุด จะเห็นว่า Methanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สกัด GA และ GB ออกมาได้ในปริมาณที่มากที่สุดจึงเป็นตัวทำละลายที่สกัด GA และ GB ได้ดีที่สุด ส่วนเรื่องของ Purity สามารถพิจารณาได้จากภาพที่ 9 จากแผนภูมิจะเห็นว่า Dichloromethane จะมี Purity สูงที่สุด รองลงมาคือ Ethyl acetate, Acetone, Methanol, Ethanol และ Isopropanol ตามลำดับ เพราะฉะนั้นจากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า Methanol จะสามารถสกัด Terpene lactones ออกมาได้ในปริมาณที่มากที่สุด และ Ethanol ก็สามารถสกัด Terpene lactones ได้มากเป็นลำดับสองรองลงมา แต่เมื่อคำนึงถึงปัจจัยเรื่องความเป็นพิษของ Methanol เข้ามาร่วมด้วยรวมถึงเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิในภาพที่ 9 จะเห็นว่า Methanol และ Ethanol มีความบริสุทธิ์ (Purity) เพียง 12.3% และ 11.1% ตามลำดับ ในขณะที่ Dichloromethane มีค่าความ Purity สูงที่สุดถึง 87.5% (ดูวิธีการคำนวณ Purity ในภาคผนวก) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Dichloromethane สามารถที่จะกำจัด impurity ออกไปได้ดีที่สุด ดังนั้นในการทดลองตอนที่ 2 จึงใช้ Dichloromethane เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในขั้นตอนการทำ liquid-liquid extraction

4.1.2 ผลการทดลองตอนที่ 2 การต้มผงใบแปะก๊วยในสารละลายบัฟเฟอร์, น้ำ และ Ethanol 85.4 %

จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2.2 โดยการต้มผงใบแปะก๊วยในน้ำ, Ethanol 85.4% และบัฟเฟอร์ (pH 5, pH 6 และ pH 7) ได้ผลการทดลองเป็นดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ตารางแสดงน้ำหนักสารสกัดที่ได้ในแต่ละวิธีของการทดลองตอนที่ 2

วิธีการสกัด	น้ำหนักใบแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)
7. น้ำ	30.0	0.0945
8. Ethanol 85.4%	30.0	1.1814
9. Buffer pH 5	30.0	0.0790
10. Buffer pH 6	30.0	0.0836
11. Buffer pH 7	30.0	0.0745

ตารางที่ 7 ตารางแสดงข้อมูลดิบของพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram

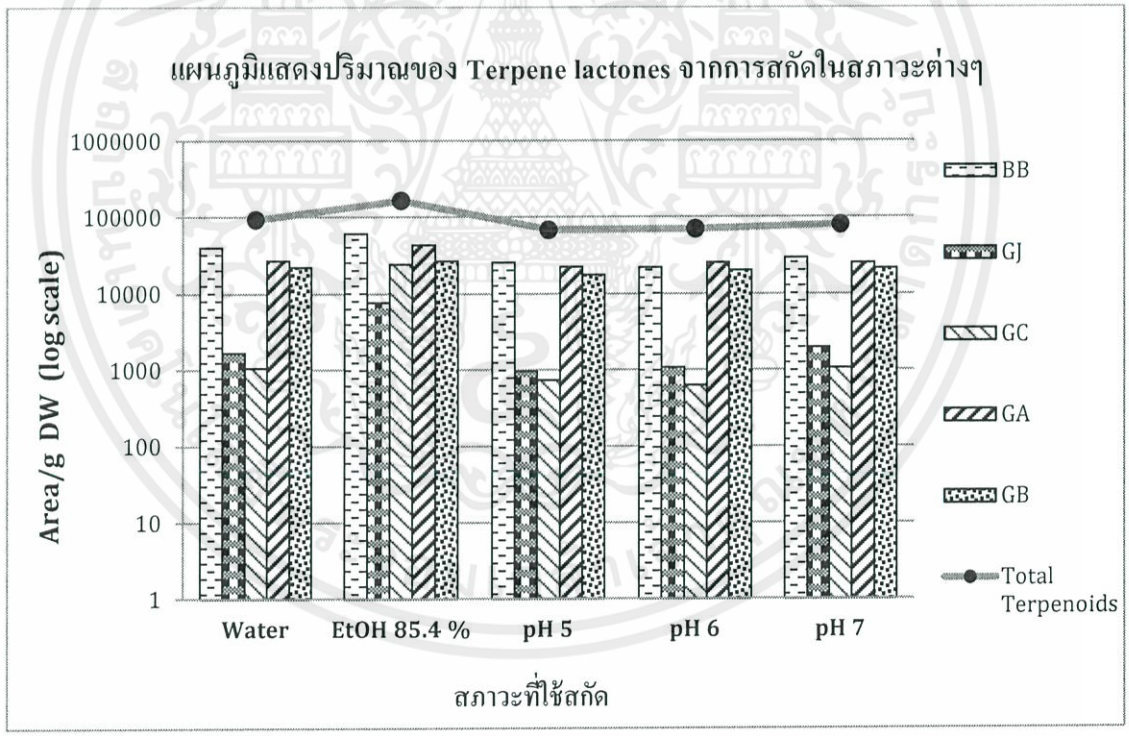
วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB
7. น้ำ	60244.0225	2512.407	1599.363	40595.108	33546.307
8. Ethanol 85.4%	5897.3085	741.167	2339.988	4198.8855	2595.967
9. Buffer pH 5	38733.746	1444.725	1095.968	33833.493	26497.7965
10. Buffer pH 6	32976.7535	1601.916	939.377	38381.012	30372.89
11. Buffer pH 7	44351.429	2967.466	1588.166	37920.011	32205.495

เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วย HPLC จะได้ HPLC Chromatogram (แสดงไว้ในภาคผนวก) และได้พื้นที่ใต้กราฟ (Area) ซึ่งแสดงในตารางที่ 7 จากนั้นนำข้อมูลจากตารางที่ 6 และ 7 ไปคำนวณค่า Area/g DW ส่วนการคำนวณค่าความบริสุทธิ์ (Purity) จะคำนวณจากค่า %Area (ดังภาคผนวก) จากนั้นนำค่า Area/g DW ในตารางที่ 8 และค่าความบริสุทธิ์ (Purity) ไปสร้างเป็นแผนภูมิรูปแท่งจะได้แผนภูมิดังแสดงในภาพที่ 10 และ 11 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

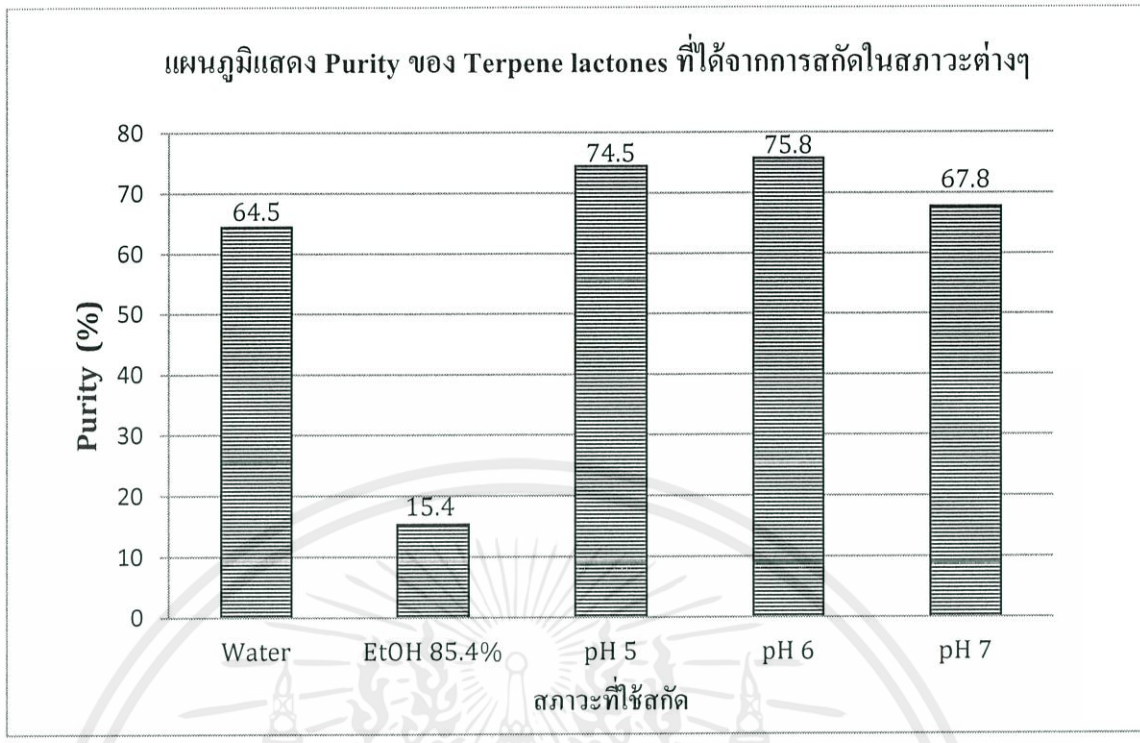
ตารางที่ 8 ตารางแสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpenoids

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB	Total Terpenoids
7. น้ำ	40162.6816	1674.9400	1066.2420	27063.4053	22364.2047	92,331.47
8. EtOH 85.4 %	61114.7391	7680.8306	24249.6651	43513.7134	26902.4159	163,461.36
9. Buffer pH 5	25822.4973	963.1500	730.6453	22555.6620	17665.1977	67,737.15
10. Buffer pH 6	21984.5023	1067.9440	626.2513	25587.3413	20248.5933	69,514.63
11. Buffer pH 7	29567.6193	1978.3107	1058.7773	25280.0073	21470.3300	79,355.04



ภาพที่ 10 แผนภูมิแสดงปริมาณของ Terpene lactones จากการสกัดในสภาวะต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดง Purity ของ Terpene lactones จากการสกัดในสภาวะต่างๆ

4.2 อภิปรายผล

ประเด็นที่ 1 ปริมาณของ Terpene lactones ที่สกัดได้

จากผลการทดลองตอนที่ 1 การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเวลา 19 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 8 จะเห็นว่า การสกัดด้วยการแช่ใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุด รวมถึงเมื่อพิจารณาปริมาณของ Terpene lactones แต่ละชนิดที่สกัดได้ ยังพบว่า การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol เป็นวิธีการสกัดที่ให้ปริมาณ BB, GJ, GC, GA และ GB มากที่สุด

จากผลการทดลองตอนที่ 2 การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในน้ำ, Ethanol 85.4%, Buffer pH 5, Buffer pH 6 และ Buffer pH 7 เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 11 จะเห็นว่า การสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4% จะให้ปริมาณ Terpene lactones มากที่สุด รวมถึงเมื่อพิจารณาเพียงแค่ปริมาณของ Terpene lactones แต่ละชนิด พบว่า วิธีการสกัดด้วยการต้มใน Ethanol 85.4% เป็นวิธีที่ให้ปริมาณของ BB, GJ, GC, GA และ GB ในปริมาณที่มากที่สุด แต่ถ้าหากพิจารณาเพียงแค่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ pH 5 – pH 7 จะพบว่า การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ pH 7 (Phosphate buffer) จะให้ปริมาณ Terpene lactones มากที่สุด

จากวิธีการสกัดทั้งหมดทั้ง 11 วิธี (การทดลองตอนที่ 1 มี 6 วิธี และการทดลองตอนที่ 2 มี 5 วิธี) เมื่อนำค่า Total Terpeniods จากวิธีการสกัดทั้งหมดมาเปรียบเทียบกันจะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ตารางเปรียบเทียบปริมาณของ Terpene lactones จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ

ตอนที่	ลำดับที่	วิธีการสกัด	Total terpenoids (Area/g DW)	Purity (%)
1	1	แช่ใน Methanol	1,081,316.85	12.3
	2	แช่ใน Ethanol	596,265.44	11.1
	3	แช่ใน Isopropanol	85,421.65	11.4
	4	แช่ใน dichloromethane	25,280.37	87.5
	5	แช่ใน Ethyl acetate	78,124.21	29.5
	6	แช่ใน Acetone	44,656.46	20.2
2	7	ต้มในน้ำ	92,331.47	64.5
	8	ต้มใน Ethanol 85.4%	163,461.36	15.4
	9	ต้มใน Buffer pH 5	67,737.15	74.5
	10	ต้มใน Buffer pH 6	69,514.63	75.8
	11	ต้มใน Buffer pH 7	79,355.04	67.8

จากตารางที่ 9 จึงสามารถสรุปได้ว่า ในการทดลองตอนที่ 1 การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol เป็นวิธีการสกัดที่ให้ปริมาณของ Terpene lactones ออกมามากที่สุดจากวิธีการสกัดทั้งหมด 6 วิธี และในการทดลองตอนที่ 2 การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งด้วย Ethanol 85.4% จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุดจากวิธีการสกัดทั้งหมด 5 วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเด็นที่ 2 ความบริสุทธิ์ (Purity)

เมื่อพิจารณาตารางที่ 9 จะเห็นว่า วิธีการสกัดด้วยการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol แม้จะให้ปริมาณของ Total Terpenoids มากที่สุดแต่มีความบริสุทธิ์ (Purity) เพียง 12.3% และในทำนองเดียวกันวิธีการสกัดด้วยการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol แม้จะให้ปริมาณของ Total Terpenoids มากเป็นอันดับสองรองลงมาแต่ก็มีความบริสุทธิ์ (Purity) เพียง 11.1% เท่านั้น

นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาตารางที่ 9 ยังพบอีกว่า วิธีการสกัดจากตอนที่ 1 ด้วยการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Dichloromethane นั้นแม้จะให้ปริมาณของ Terpene lactones ออกมาในปริมาณที่น้อยที่สุดแต่จะเห็นว่ามีความบริสุทธิ์ (Purity) มากที่สุดถึง 87.5% ดังนั้นในการทดลองตอนที่ 2 จึงได้มีการนำเอา Dichloromethane มาใช้ในการทำ liquid-liquid extraction เพื่อกำจัด impurity โดยจะเห็นได้ว่าในการทดลองตอนที่ 2 Terpene lactones ที่สกัดได้จะมีความบริสุทธิ์ที่สูงขึ้น เช่น การต้มใน Buffer pH 6 มีความบริสุทธิ์ (Purity) 75.8% หรือ การต้มใน Buffer pH 5 มีความบริสุทธิ์ (purity) 74.5% เป็นต้น

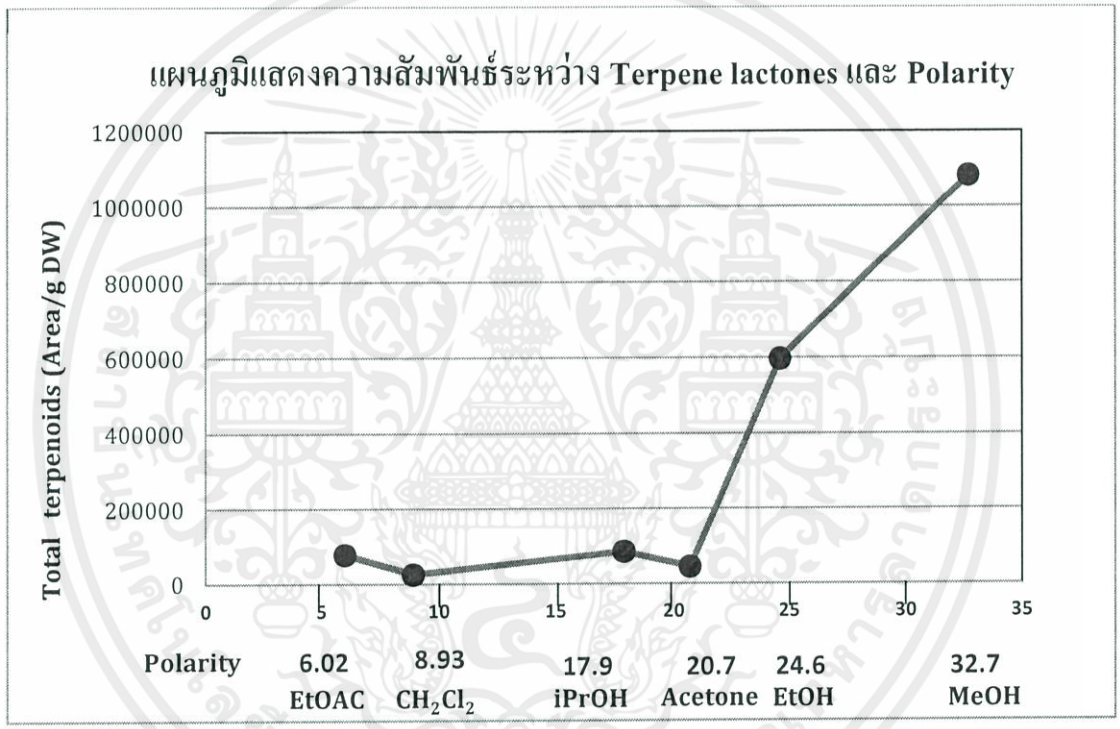
ประเด็นที่ 3 ความมีขั้ว (Polarity)

ในการทดลองตอนที่ 2 การสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4% วิธีการสกัดนี้เกิดขึ้นเนื่องจากในการทดลองตอนที่ 1 การสกัดด้วยการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุดแต่เนื่องจากว่า Methanol เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษโดยเฉพาะไอของ Methanolและเพราะต้องการที่จะทราบว่า การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากขึ้นจากวิธีการแช่หรือไม่ ดังนั้นจึงทำการต้มใน Ethanol 85.4% แทน เนื่องจากความมีขั้ว (Polarity) ใกล้เคียงกันกับความมีขั้วของ Methanol (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก) และจากผลการทดลองพบว่า การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากกว่าวิธีการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4%

จากการทดลองตอนที่ 1 ได้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดในการสกัดสารจากใบแปะก๊วยได้แก่ Methanol, Ethanol, Isopropanol, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Acetone ตามหลักการของการสกัดคือสารที่เราต้องการสกัด (ในที่นี้คือ Terpene lactones) จะละลายออกมาอยู่ในตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินทรีย์ จากนั้นก็นำไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกก็จะได้สารสกัดที่ต้องการออกมา โดยสารสกัดที่ต้องการจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์มากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับความมีขั้ว (Polarity) ของสารสกัดและตัวทำละลายอินทรีย์ สารสกัดจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีก็ต่อเมื่อมีความมีขั้ว (Polarity) ใกล้เคียงกันกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดนั้นๆ ซึ่งจากผลการทดลองสามารถที่จะวิเคราะห์ความมีขั้ว (Polarity) ของ Terpene lactones ได้โดยนำค่าความมีขั้ว (Polarity) และ Total Terpenoids มาสร้างเป็นแผนภูมิ X-Y ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Total Terpenoids และ Polarity ของตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดที่ใช้ในการทดลองตอนที่ 1

จากภาพที่ 12 จะเห็นว่า Methanol จะให้ปริมาณของ Total Terpenoids มากที่สุด รองลงมาคือ Ethanol ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Terpene lactones จะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วสูง (High Polarity) เพราะฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า Terpene lactones จะละลายได้น้อยใน Ethyl acetate, Dichloromethane และ Isopropanol ละลายได้ปานกลางใน Ethanol แต่จะละลายได้ดีที่สุดใน Methanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ หรือแสวงหาผลกำไรในทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจากทั้ง 3 ประเด็นที่กล่าวมา จะเห็นว่า แม้ว่าการแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งใน Methanol จะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุดแต่เพราะมีความบริสุทธิ์ต่ำเพียง 12.3% เท่านั้นดังนั้นจากการทดลองตอนที่ 1 จึงเลือก Dichloromethane ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงถึง 87.5% ไปทำ liquid-liquid extraction ในการทดลองตอนที่ 2 และเมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองในตอนที่ 2 ก็พบว่าวิธีการสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในน้ำจะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากรองลงมาจากการสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4% และสารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงถึง 64.5% ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่าการสกัดด้วยการต้มใน Ethanol 85.4% ถึง 49.1% (การสกัดด้วยการต้มใน Ethanol 85.4% ให้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์เพียง 15.4%) ดังนั้นจึงสามารถที่จะสรุปได้ว่า การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในน้ำเป็นวิธีการสกัด Terpene lactones จากใบแปะก๊วยที่เหมาะสมที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยในการทดลองตอนที่ 1 การแช่ผงใบแปะก๊วยในตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดเป็นเวลา 19 ชั่วโมง ตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิดที่ใช้ ได้แก่ Methanol, Ethanol, Isopropanol, Dichloromethane, Ethyl acetate และ Acetone โดยเมื่อได้สารสกัดแล้วนำมาทำการตรวจสอบปริมาณของเทอร์ปีนแลคโตนด้วยเครื่อง HPLC ในแต่ละวิธี พบว่า วิธีการสกัดด้วยการแช่ใน Methanol, Ethanol, Isopropanol, Dichloromethane, Ethyl acetate และAcetone จะให้พื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงถึงปริมาณรวมของเทอร์ปีนอยด์เป็น 1,081,316.85, 596,265.44, 85,421.65, 25,280.37, 78,124.21 และ 44,656.46 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ เมื่อเรียงลำดับวิธีการสกัดที่ให้ปริมาณรวมของเทอร์ปีนอยด์จากมากไปหาน้อยจะได้ว่า วิธีการสกัดด้วยการแช่ใน Methanol, Ethanol, Isopropanol, Ethyl acetate, Acetone และ Dichloromethane แต่เนื่องจากว่า Dichloromethane มีความบริสุทธิ์ (Purity) มากที่สุดถึง 87.5% จึงถูกเลือกนำไปใช้ในการทดลองตอนที่ 2 เพื่อใช้กำจัด impurity ก่อนที่จะนำไประเหยแห้งแล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วย HPLC ต่อไป

จากวิธีการสกัดสารจากใบแปะก๊วยในการทดลองตอนที่ 2 การต้มผงใบแปะก๊วยในบัฟเฟอร์, pH 5 - pH 7, Ethanol 85.4% และน้ำ การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์จะทำให้ Ginkgolide ละลายออกมาอยู่ในชั้นน้ำได้ดีขึ้น ส่วนสารพวกที่เป็น impurity ที่ไม่มีขั้วและมีขั้วอ่อนๆชนิดอื่นจะไม่ละลายลงในชั้นน้ำ ต่อมานำส่วนที่เป็นน้ำทั้งสองส่วนมาปรับ pH ให้เป็น 5.0 เพื่อจะทำให้สารพวกเทอร์ปีนอยด์เหล่านี้อยู่ในรูป protonated form ซึ่งทำให้สามารถถูกสกัดออกมาได้โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Qing Lang and C.M. Wai, 1999) ส่วนพวก impurity อื่นๆที่อยู่ในสภาพ ionic หรือ hydrophilic จะยังคงละลายอยู่ในชั้นน้ำโดยจะไม่ถูกสกัดออกมาโดยตัวทำละลายอินทรีย์ ในการทดลองนี้ได้ทดลองใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ Dichloromethane โดยเมื่อได้สารสกัดแล้วนำมาทำการตรวจสอบปริมาณของเทอร์ปีนอยด์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าวิธีสกัดสารโดยใช้ Acetate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

buffer(pH 5), Citrate buffer (pH 6), Phosphate buffer (pH 7), Ethanol 85.4% และน้ำ จะให้พื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงถึงปริมาณรวมของเทอร์ปีนอยด์เป็น 67,737.15, 69,514.63, 79,355.04, 163,461.36 และ 92,331.47 ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัมตามลำดับ เมื่อเรียงลำดับของวิธีในการสกัดที่ให้ปริมาณรวมของเทอร์ปีนอยด์จากมากไปหาน้อยจะได้ว่า การต้มใน Ethanol 85.4%, น้ำ, Phosphate buffer (pH 7), Citrate buffer (pH 6) และ Acetate buffer (pH 5) ส่วนเรื่องความบริสุทธิ์ (Purity) การสกัดด้วยการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ pH 6 จะให้ความบริสุทธิ์มากที่สุดคือ 75.8% เพราะฉะนั้นถ้าหากพิจารณาถึงเรื่องของผลของ pH ที่มีต่อการสกัด Terpene lactones จากบัฟเฟอร์ในช่วง pH 5 ถึง pH 7 พบว่า pH 7 เป็นพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด Terpene lactones จากใบแปะก๊วย เพราะให้ปริมาณของ Terpene lactones มากที่สุดเมื่อเทียบกับการต้มในบัฟเฟอร์ pH 5 และ pH 6 และยังให้ความบริสุทธิ์สูงถึง 64.5 % อีกด้วย

เพราะฉะนั้นจากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่า วิธีที่เหมาะสมที่สุดของการสกัด Terpene lactones จากใบแปะก๊วยคือ การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในน้ำ ซึ่งหากจะต้องนำไปผลิตจริงก็สามารถทำได้โดยการนำผงใบแปะก๊วยแห้งมาต้มในน้ำประมาณ 10 นาที จากนั้นนำไปกรองแบบลดความดันโดยเอาเฉพาะส่วนที่กรองได้ (filtrate) แล้วนำส่วนที่กรองได้ (filtrate) ไปปรับ pH ให้เป็น 5 จากนั้นนำไปทำ liquid-liquid extraction ด้วย Dichloromethane ไขเอาเฉพาะชั้นของ Dichloromethane แล้วนำไประเหยแห้ง ก็จะได้ สารสกัดจากใบแปะก๊วย หรือ Terpene lactones ที่มีความบริสุทธิ์สูงตามที่ต้องการ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสกัดกลุ่มเทอร์ปีนอยด์อันได้แก่ BB, GJ, GC, GA และ GB ด้วย HPLC นั้น โดยปกติแล้วต้องนำสารมาตรฐานแต่ละตัวที่ทราบน้ำหนักแน่นอนมาฉีดเข้า HPLC เพื่อให้ทราบ retention time ของสารแต่ละตัว และทราบปริมาณสารที่แน่นอนเมื่อดูจากพื้นที่ใต้ peak แต่โครงงานพิเศษนี้ได้รับเงินสนับสนุนที่ไม่ครอบคลุมจึงไม่สามารถซื้อสารมาตรฐานแต่ละชนิดมาใช้ในการทดลองได้ ทำให้ไม่สามารถหาปริมาณที่แน่นอนของสารแต่ละชนิดจาก HPLC Chromatogram ได้จึงทำการทดลองได้เพียงเปรียบเทียบว่าวิธีใดสกัดสารได้มากกว่ากัน และสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้บอกได้เพียงว่าที่ retention time ใดให้สารตัวใดออกมาเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำเอกสารนี้ไปเผยแพร่ต่อในรูปแบบอิเล็กทรอนิกส์ หรือรูปแบบอื่นๆ

ในการทดลองตอนที่ 1 ควรที่จะเพิ่มวิธีการสกัดอีก 1 วิธี คือการแช่ในน้ำ เพื่อที่จะได้ใช้เปรียบเทียบกับการทดลองตอนที่ 2 การต้มผงใบแปะก๊วยในน้ำจะทำให้ทราบว่า การให้ความร้อนมีผลต่อวิธีการสกัดด้วยน้ำหรือไม่ แต่เนื่องจากโครงงานพิเศษนี้ได้รับเงินสนันสนุนเพียงเล็กน้อย รวมถึงยังขาดเครื่องมือวิเคราะห์ HPLC-ELS Detector จึงต้องส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือซึ่งมีค่าวิเคราะห์ค่อนข้างสูง จึงไม่สามารถที่จะเพิ่มขั้นตอนการทดลองเข้าไปอีกได้

สำหรับการต้มผงใบแปะก๊วยแห้งใน Ethanol 85.4% หรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ควรที่จะทำการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยการ Reflux ผงใบแปะก๊วยแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์โดยวิธีนี้เราจะไม่สูญเสียตัวทำละลายอินทรีย์และ Terpene lactones ไปในระหว่างการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์. 2545. "การสกัดสารพวก Terpene lactones และ Flavonoids จากใบแปะก๊วย." โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอมอร โสมนะพันธุ์, วีณา จิรัจฉริยากูล. 2542. **"แปะก๊วย สมุนไพรจีนรักษาความเสื่อม."** จุลสารข้อมูลสมุนไพร: หน้า 3-11

Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, Christen Y, Poirier J, Quirion R. 2000. **The Ginkgobiloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced bybeta-amyloid**. Eur J Neurosci; 12(6):1882–1890.

Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. 2000. **The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protectsand rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvementof its flavonoid constituents and protein kinase C.** J Neurochem; 74(6):2268–2277.

Dubey AK, Shankar PR, Upadhyaya D, Deshpande VY. 2004. **Ginkgo biloba–an appraisal**. Kathmandu Univ Med J (KUMJ); 2(3):225–229.

Houghton P. 1994. **Herbal products. 2**. Ginkgo.The Pharmaceutical Journal.

Krieglstein J, Ausmeier F, El-Abhar H, Lippert K, Welsch M, Rupalla K, Henrich-Noack P. 1990. **Neuroprotectjive effects of *Ginkg o biloba* constituents**. Eur. J. Pharm Sci :39–48

M.-J. Dubber,I. Kanfer. 2006. **Determination of terpene trilactone in Ginkgo biloba solid oral dosage forms using HPLC with evaporative light scattering detection**. The Pharmaceutical and Biomedical Analysis Journal.41:135-140

Po-Chuen Chan,Qingsu Xia and Peter P. Fu. 2007. ***Ginkgo Biloba* Leave Extract Biological, Medicinal, and Toxicological Effects**. Environmental Science and Health Part C. 25:211–244

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม (ต่อ)

Winter E. 1991. **Effects of an extract of Ginkgo biloba on learning and memory in mice.** Pharmacol. Biochem. Behav. 38(1):109–114.

Super ego. 2556. ใบแปะก๊วย... ยาสมุนไพรอายุวัฒนะ. [online]. Available : www.ego.co.th/2006/health02.php (เมื่อวันที่ 21 สิงหาคม)

Thai herbal products Co.,Ltd. 2556. แปะก๊วย (Ginkgo). [online]. Avalible : http://www.thaiherbinfo.com/knowledge-herb.php?id_herb=19 (เมื่อวันที่ 21 สิงหาคม)

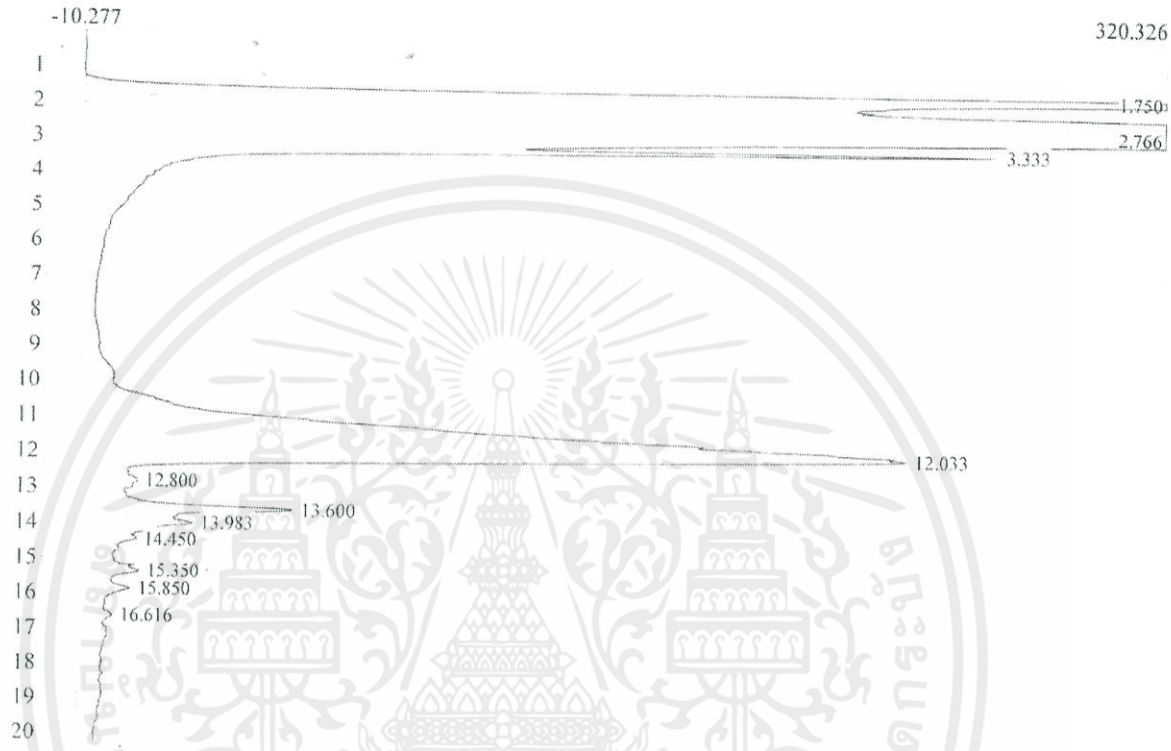
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ภาพ 1ก แสดง HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones จากการทดลองตอนที่ 1 การแช่ผงใบแปะก๊วยแห้งในตัวทำละลายอินทรีย์ (แสดงในหน้า 44-53)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

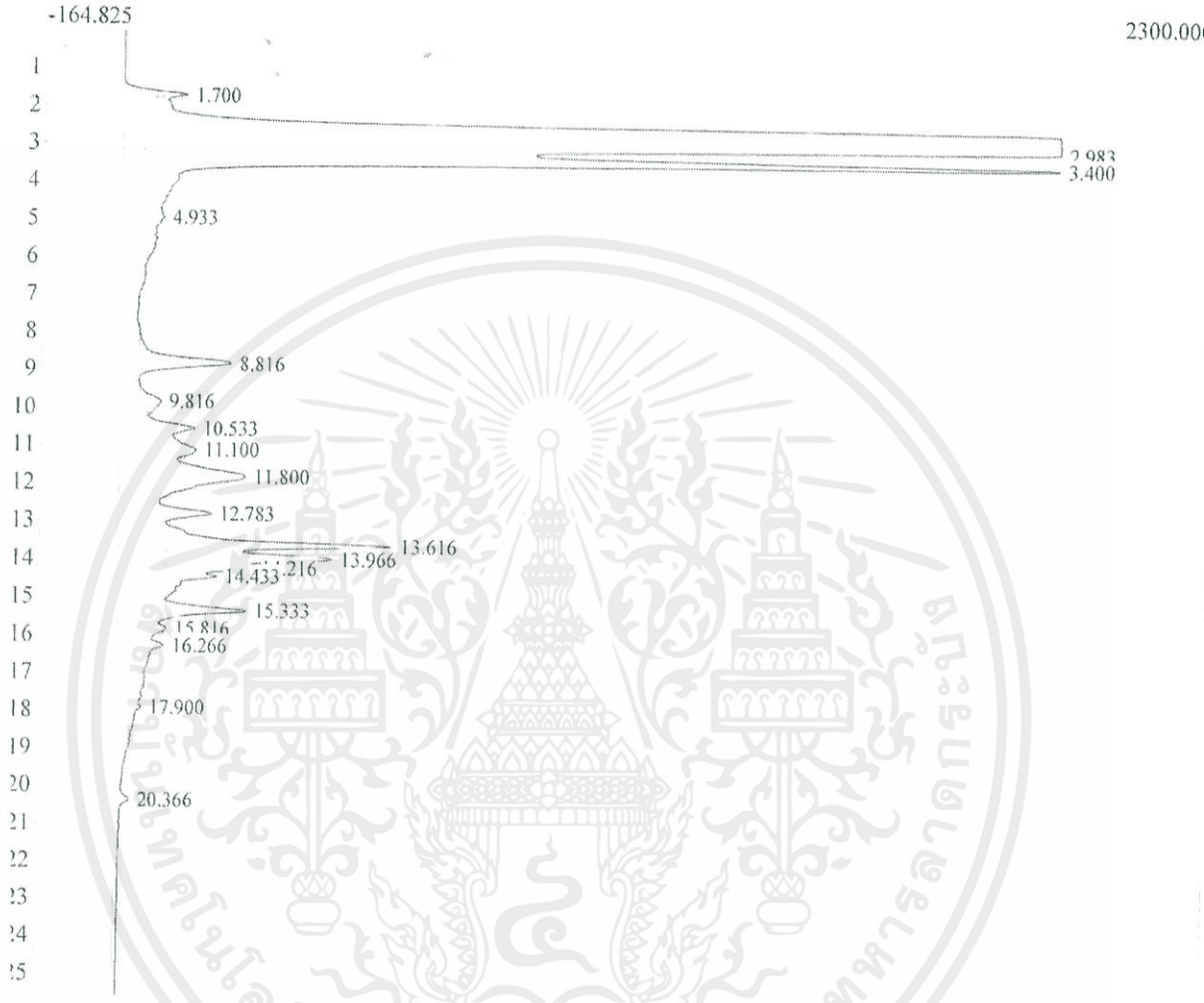
Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 08/15/2013 13:20:16
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 15-08-56-Ginkgolide10.chr ()
Sample: Std 50 uL_2



Component	Retention	Area	Area %
	1.750	8971.2935	10.0469
	2.766	62999.6180	70.5531
	3.333	4135.3960	4.6312
	12.033	11838.9965	13.2585
	12.800	64.1730	0.0719
	13.600	718.2580	0.8044
	13.983	299.4500	0.3354
	14.450	25.4165	0.0285
	15.350	128.4070	0.1438
	15.850	80.3300	0.0900
	16.616	32.5470	0.0364
		89293.8855	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 08/15/2013 11:45:54
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 15-08-56-Ginkgolide07.chr ()
Sample: MeOH 50 uL



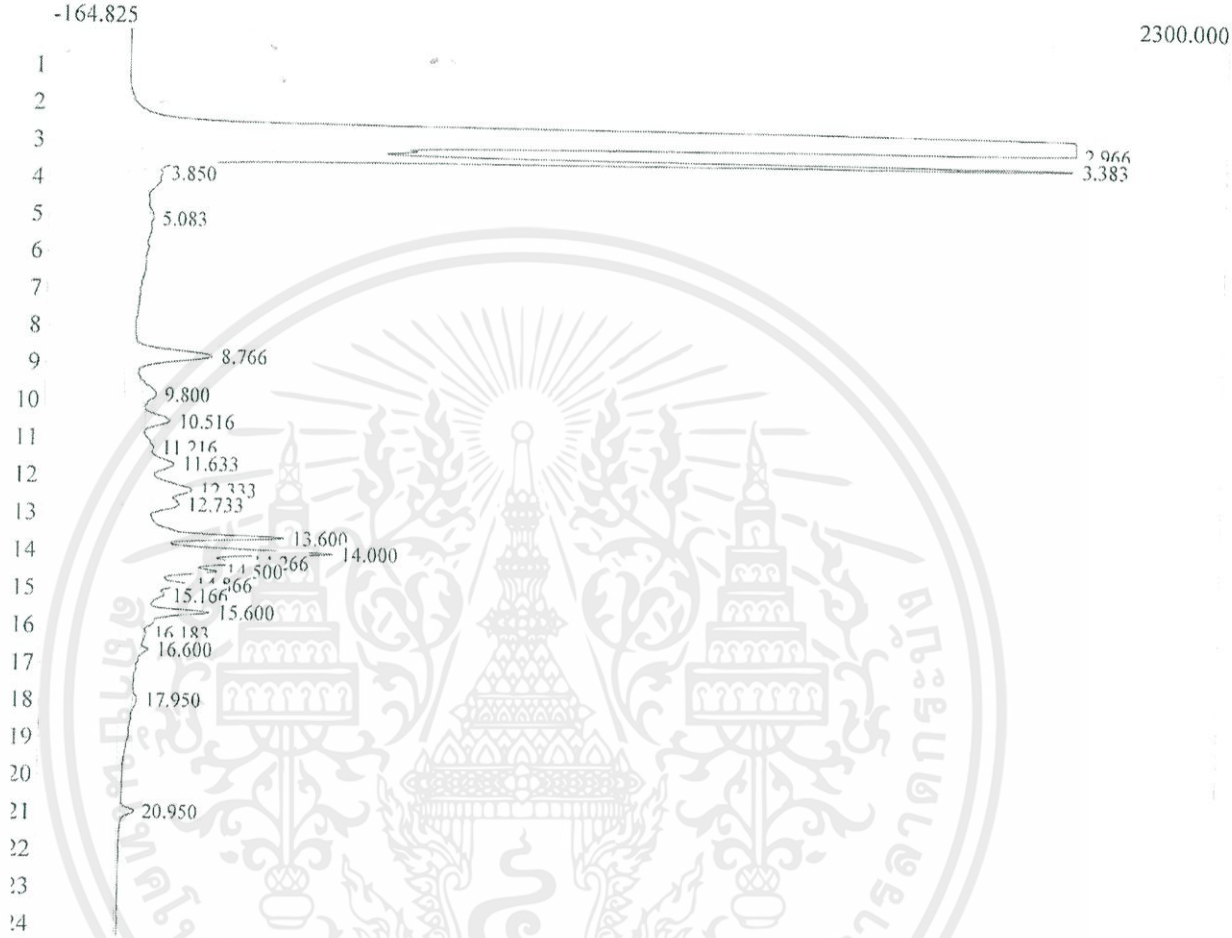
Component	Retention	Area	Area %
	1.700	1685.8720	1.1228
	2.983	81072.6500	53.9968
	3.400	31191.8725	20.7747
	4.933	234.0860	0.1559
	8.816	3812.1500	2.5390
	9.816	823.4135	0.5484
	10.533	1566.0755	1.0431
	11.100	2585.1345	1.7218
	11.800	6263.1210	4.1714
	12.783	1371.1240	0.9132
	13.616	6683.6580	4.4515
	13.966	5571.3550	3.7107
	14.216	2166.2050	1.4428
	14.433	1692.8490	1.1275
	15.333	2453.8250	1.6343
	15.816	281.0200	0.1872

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16.266	387.8380	0.2583
17.900	53.2465	0.0355
20.366	248.0180	0.1652
	150143.5135	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Analysis date: 08/15/2013 12:18:31
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 15-08-56-Ginkgolide08.chr ()
Sample: EtOH 50 uL



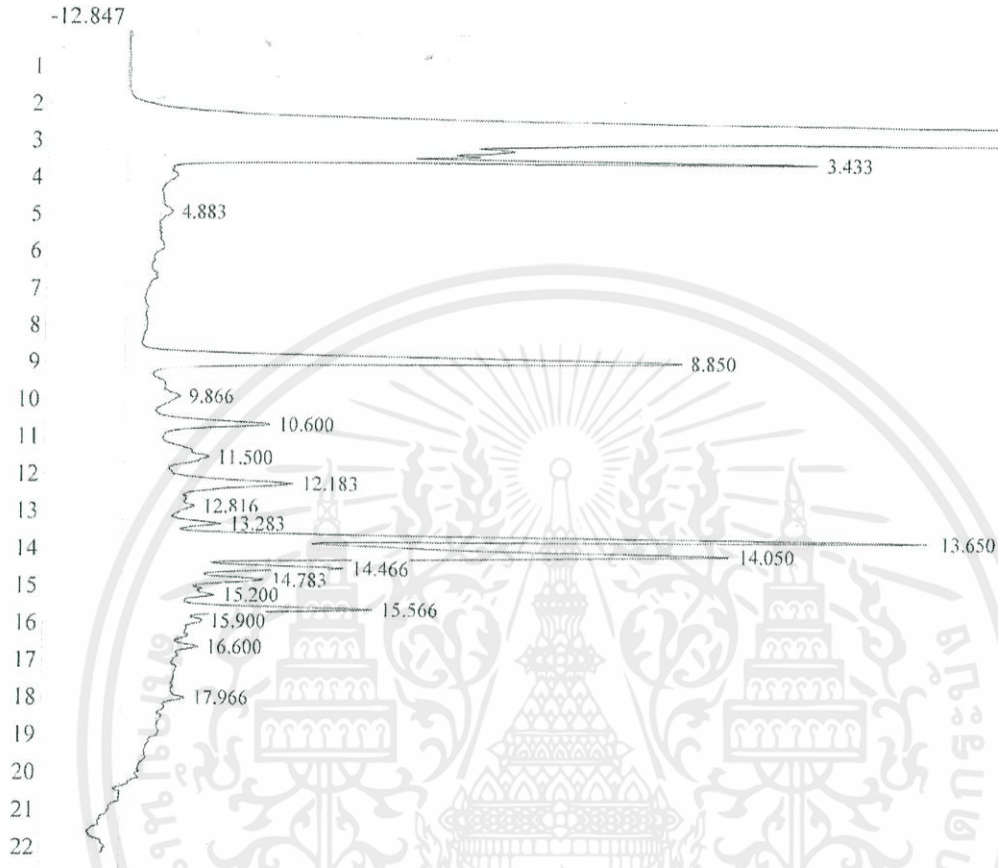
Component	Retention	Area	Area %
	2.966	70125.7620	61.1295
	3.383	18982.5750	16.5474
	3.850	993.5840	0.8661
	5.083	151.9950	0.1325
	8.766	3082.8940	2.6874
	9.800	721.9290	0.6293
	10.516	985.1810	0.8588
	11.216	198.4440	0.1730
	11.633	870.8235	0.7591
	12.333	1749.9525	1.5255
	12.733	1079.0855	0.9407
	13.600	3310.1210	2.8855
	14.000	4596.8990	4.0072
	14.266	2409.1925	2.1001
	14.500	1666.0580	1.4523
	14.866	1016.2070	0.8858
	15.166	336.0070	0.2929
	15.600	1540.6310	1.3430

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16.183	72.2045	0.0629
16.600	183.9580	0.1604
17.950	227.9190	0.1987
20.950	415.2490	0.3620
	114716.6715	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

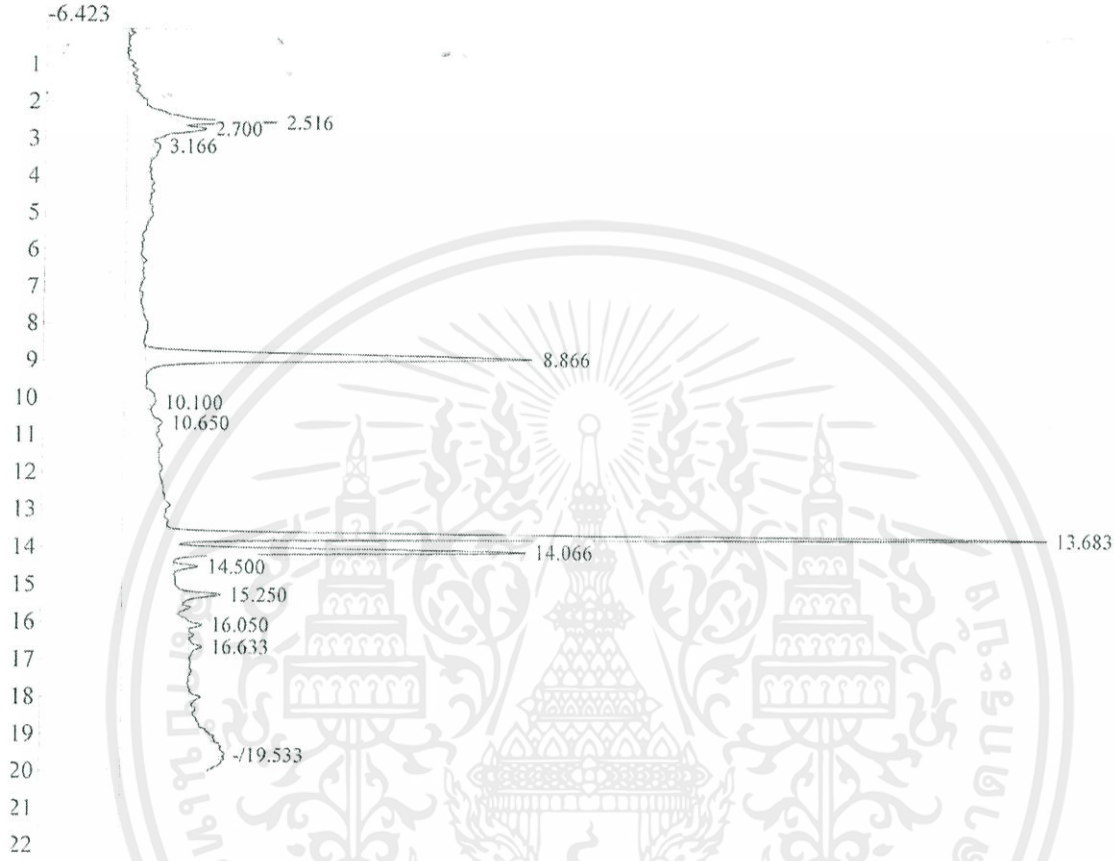
Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 08/15/2013 13:47:28
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 15-08-56-Ginkgolide11.chr ()
Sample: i PrOH 50 uL



Component	Retention	Area	Area %
	2.516	8036.9270	23.0949
	2.716	20860.3120	59.9441
	3.433	698.3920	2.0069
	4.883	37.7910	0.1086
	8.850	1224.4020	3.5184
	9.866	56.7940	0.1632
	10.600	245.2430	0.7047
	11.500	159.8545	0.4594
	12.183	276.6095	0.7949
	12.816	26.1845	0.0752
	13.283	66.6120	0.1914
	13.650	1040.2450	2.9892
	14.050	1387.7130	3.9877
	14.466	178.4390	0.5128
	14.783	96.0715	0.2761
	15.200	40.1640	0.1154
	15.566	267.3000	0.7681
	15.900	20.8260	0.0598
	16.600	45.8180	0.1317
	17.966	33.8820	0.0974

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

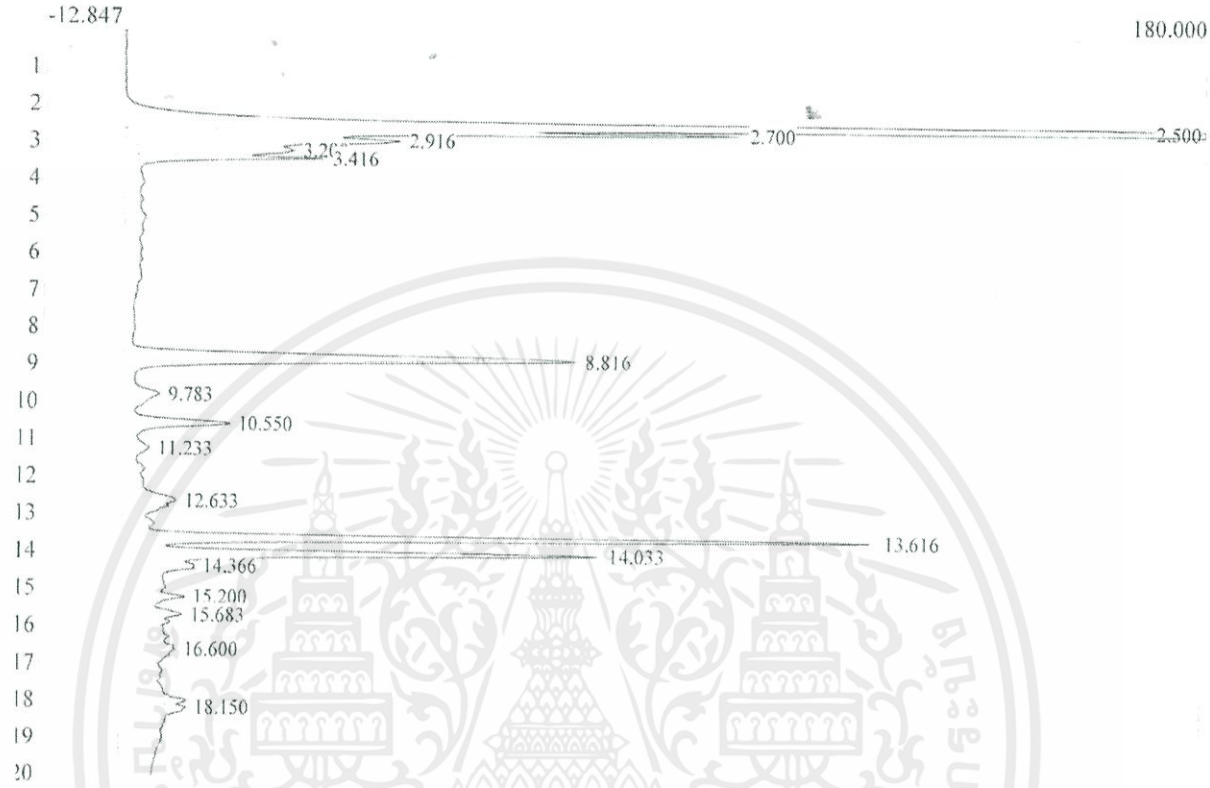
Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 08/15/2013 14:15:33
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 15-08-56-Ginkgolide12.chr ()
Sample: CH2Cl2 50 uL



Component	Retention	Area	Area %
	2.516	54.3320	3.8646
	2.700	19.3950	1.3795
	3.166	14.3110	1.0179
	8.866	402.5270	28.6312
	10.100	13.7620	0.9789
	10.650	10.7680	0.7659
	13.683	570.4435	40.5748
	14.066	232.5600	16.5417
	14.500	14.7420	1.0486
	15.250	33.2255	2.3633
	16.050	14.0140	0.9968
	16.633	11.6195	0.8265
		1391.6995	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

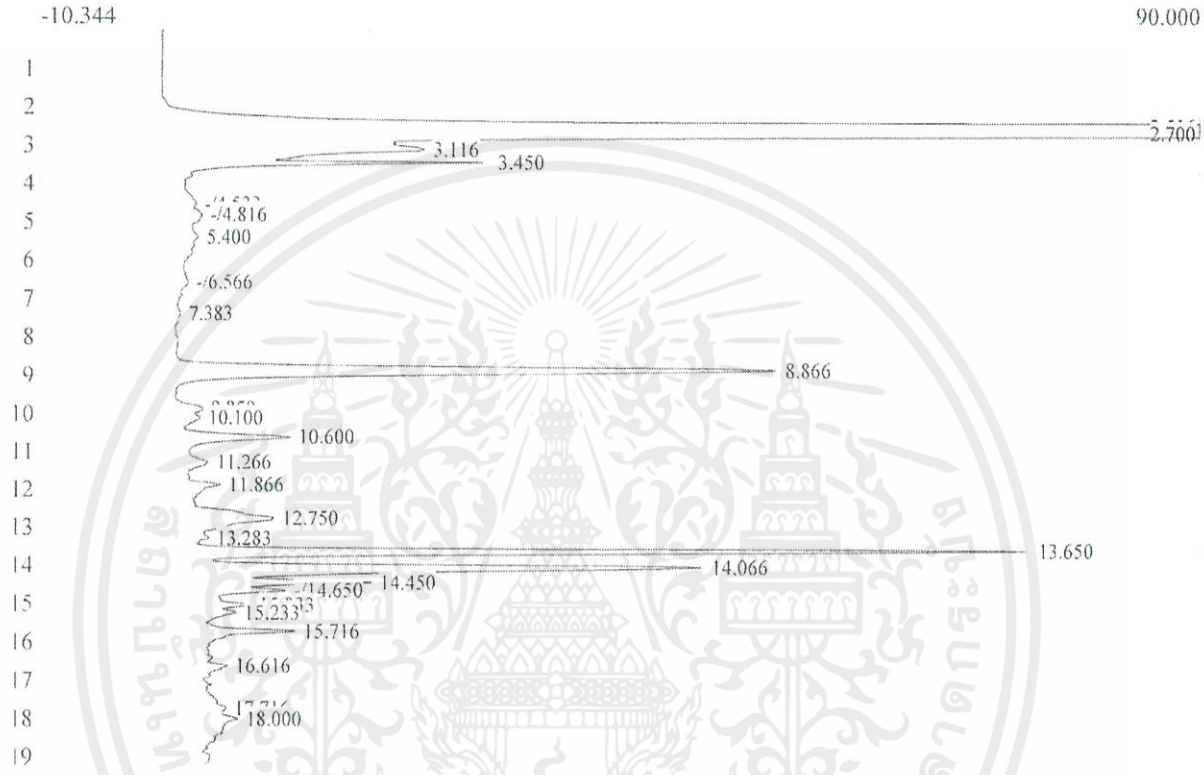
Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 08/15/2013 15:08:21
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 15-08-56-Ginkgolide14.chr ()
Sample: EtOAc 50 uL



Component	Retention	Area	Area %
	2.500	4850.8020	47.4049
	2.700	764.7395	7.4735
	2.916	592.2580	5.7879
	3.200	371.7810	3.6333
	3.416	241.3070	2.3582
	8.816	1077.1930	10.5270
	9.783	80.4880	0.7866
	10.550	201.8700	1.9728
	11.233	31.7795	0.3106
	12.633	136.6970	1.3359
	13.616	1015.2690	9.9218
	14.033	645.1405	6.3047
	14.366	34.4190	0.3364
	15.200	38.0340	0.3717
	15.683	33.5830	0.3282
	16.600	39.9415	0.3903
	18.150	77.3980	0.7564
		10232.7000	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 08/15/2013 15:34:28
Column: Luna C18.250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 15-08-56-Ginkgolide15.chr ()
Sample: Acetone 50 uL
Comments: ELSD : temp90C
N2 2.2 L/min
Impactor Off
Mobile phase flowrate 1.0ml/min



Component	Retention	Area	Area %
	2.516	3375.8455	36.3563
	2.700	2936.0010	31.6194
	3.116	391.5580	4.2169
	3.450	201.8350	2.1737
	5.400	5.3330	0.0574
	7.383	6.5425	0.0705
	8.866	704.9680	7.5922
	9.850	14.4310	0.1554
	10.100	8.4510	0.0910
	10.600	110.4415	1.1894
	11.266	24.0580	0.2591
	11.866	33.7780	0.3638
	12.750	135.0225	1.4541
	13.283	6.3920	0.0688
	13.650	594.0430	6.3976
	14.066	447.5260	4.8196
	14.450	71.2925	0.7678
	15.033	17.5080	0.1886
	15.233	15.8700	0.1709
	15.716	78.2740	0.8430

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

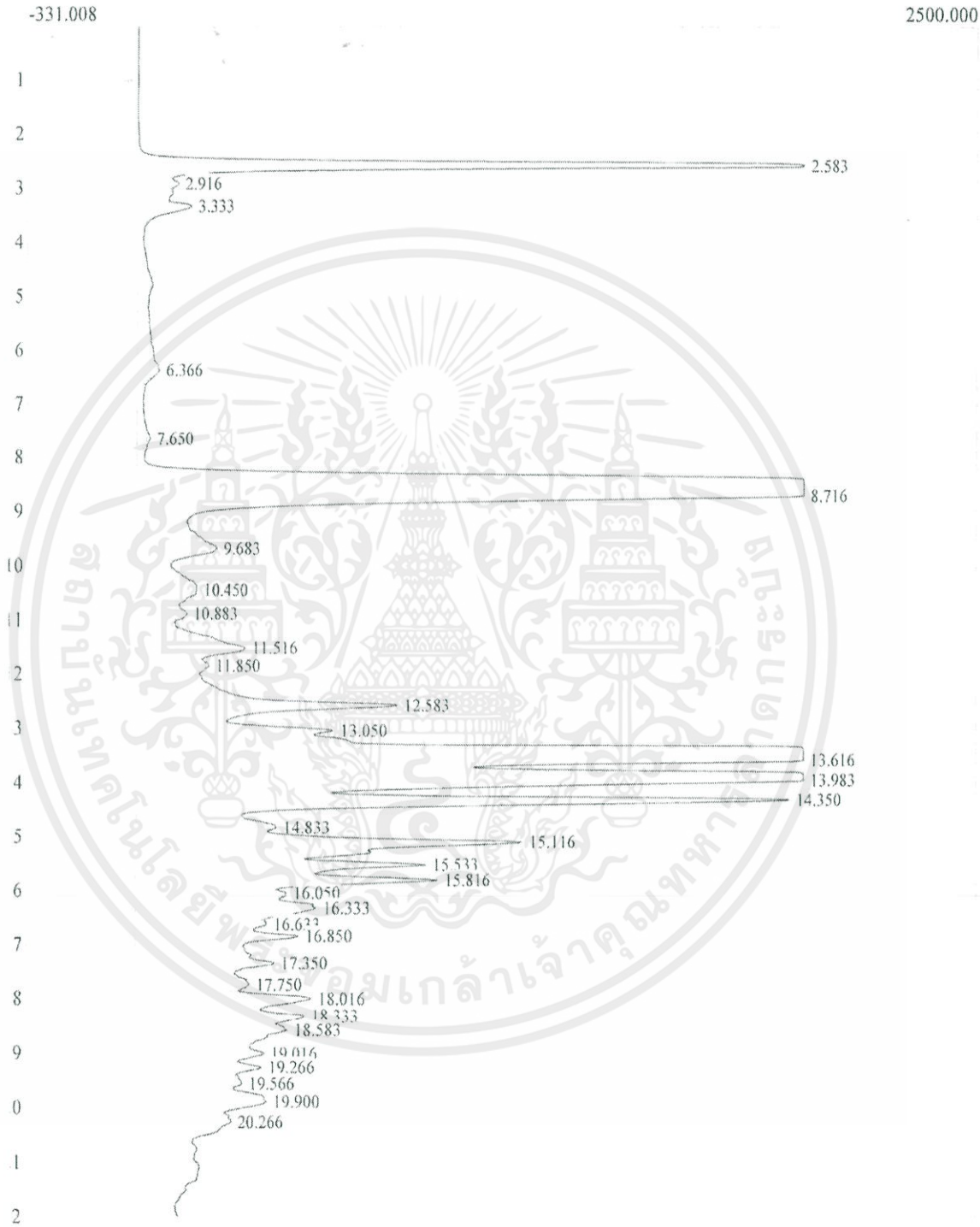
16.616	23.5440	0.2536
17.716	8.7900	0.0947
18.000	14.3460	0.1545
	9225.8505	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพ 2ก แสดง HPLC Chromatogram ของ Terpene lactones จากการทดลองตอนที่ 2 การต้มผงใบแปะก๊วยแห้งในบัฟเฟอร์ น้ำ และ Ethanol 85.4% (แสดงในหน้า 55-64)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 09/17/2013 12:02:29
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 17-09-56-Ginkgolide05.chr ()
Sample: Water , 50 uL

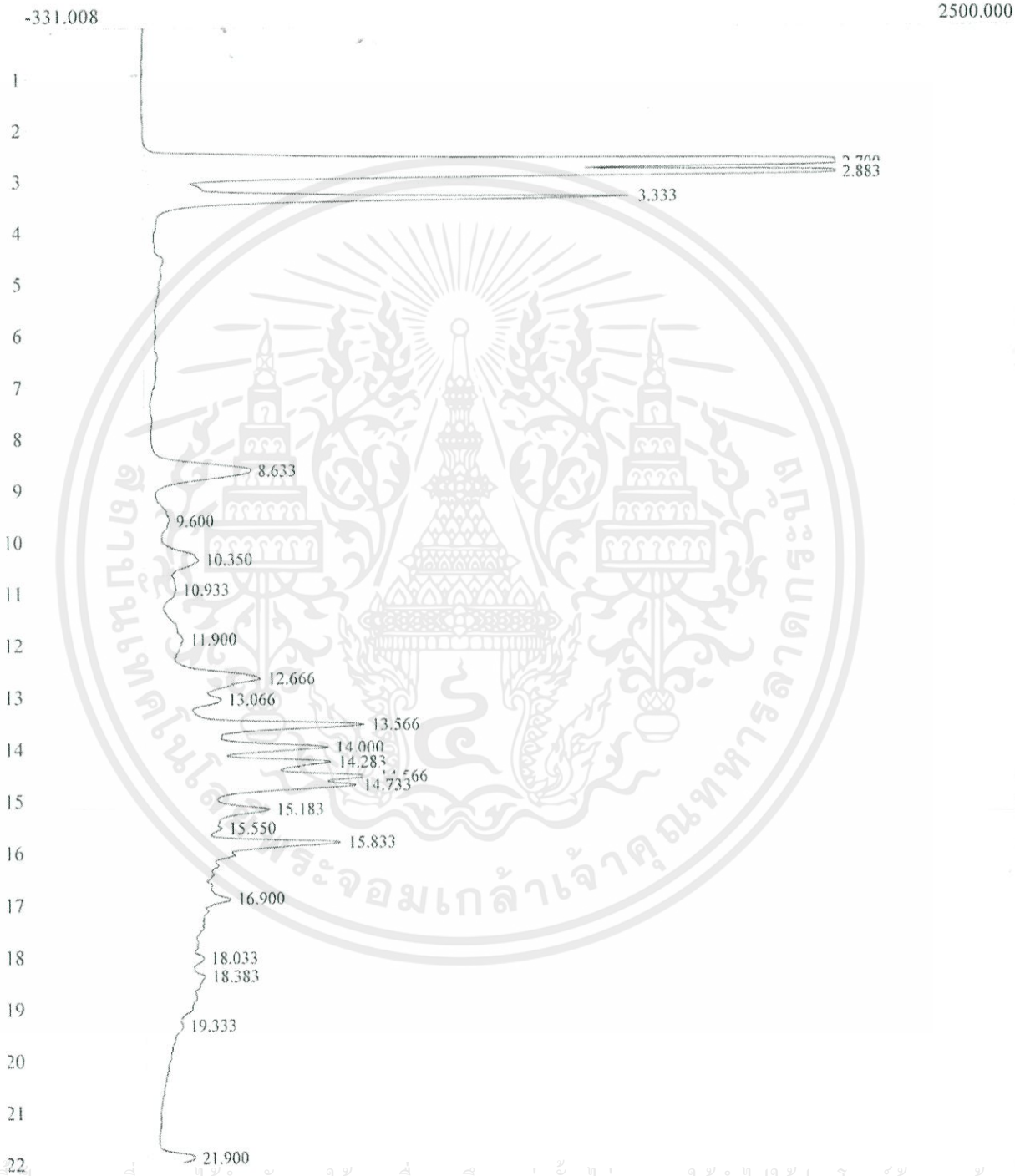


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Component	Retention	Area	Area %
	2.583	17929.5680	8.3468
	2.916	192.1010	0.0894
	3.333	928.5315	0.4323
	6.366	150.7110	0.0702
	7.650	145.7290	0.0678
	8.716	60244.0225	28.0456
	9.683	2512.4070	1.1696
	10.450	1599.3630	0.7446
	10.883	345.0070	0.1606
	11.516	3364.7560	1.5664
	11.850	444.5420	0.2069
	12.583	6479.4530	3.0164
	13.050	2505.6700	1.1665
	13.616	40595.1080	18.8984
	13.983	33546.3070	15.6169
	14.350	17108.6000	7.9646
	14.833	521.0780	0.2426
	15.116	8434.9505	3.9268
	15.533	2298.1910	1.0699
	15.816	3129.6700	1.4570
	16.050	160.7210	0.0748
	16.333	1696.0470	0.7896
	16.633	166.1120	0.0773
	16.850	1025.1280	0.4772
	17.350	1117.0515	0.5200
	17.750	653.3465	0.3042
	18.016	2215.6355	1.0315
	18.333	779.5775	0.3629
	18.583	550.5900	0.2563
	19.016	495.5470	0.2307
	19.266	521.1455	0.2426
	19.566	212.9430	0.0991
	19.900	1803.1255	0.8394
	20.266	934.3640	0.4350
		214807.0995	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 09/17/2013 11:32:42
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 17-09-56-Ginkgolide04.CHR ()
Sample: Ethanol , 50 uL

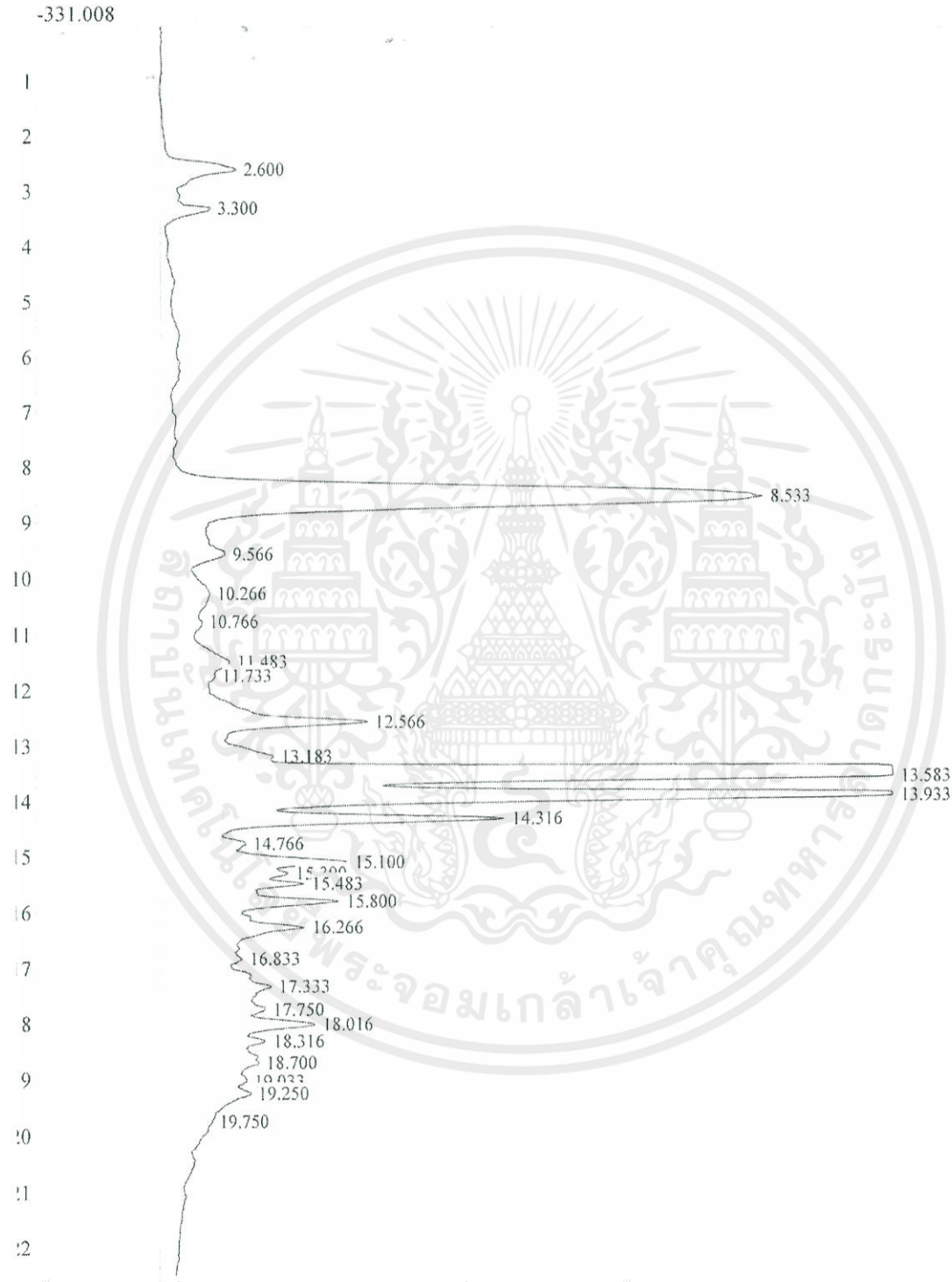


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Component	Retention	Area	Area %
	2.700	26696.6400	26.0116
	2.883	19328.4000	18.8324
	3.333	13260.5430	12.9203
	8.633	5897.3085	5.7460
	9.600	741.1670	0.7221
	10.350	2339.9880	2.2799
	10.933	1021.8925	0.9957
	11.900	1165.0010	1.1351
	12.666	4354.2140	4.2425
	13.066	1230.0970	1.1985
	13.566	4198.8855	4.0911
	14.000	2595.9670	2.5294
	14.283	3172.1940	3.0908
	14.566	4117.4040	4.0118
	14.733	3869.2520	3.7700
	15.183	1755.3460	1.7103
	15.550	196.2375	0.1912
	15.833	4591.4620	4.4736
	16.900	1016.4330	0.9904
	18.033	288.8750	0.2815
	18.383	415.5450	0.4049
	19.333	153.2210	0.1493
	21.900	227.4415	0.2216
		102633.5145	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 09/17/2013 10:04:20
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 17-09-56-Ginkgolide01.CHR ()
Sample: pH 5, 50 uL

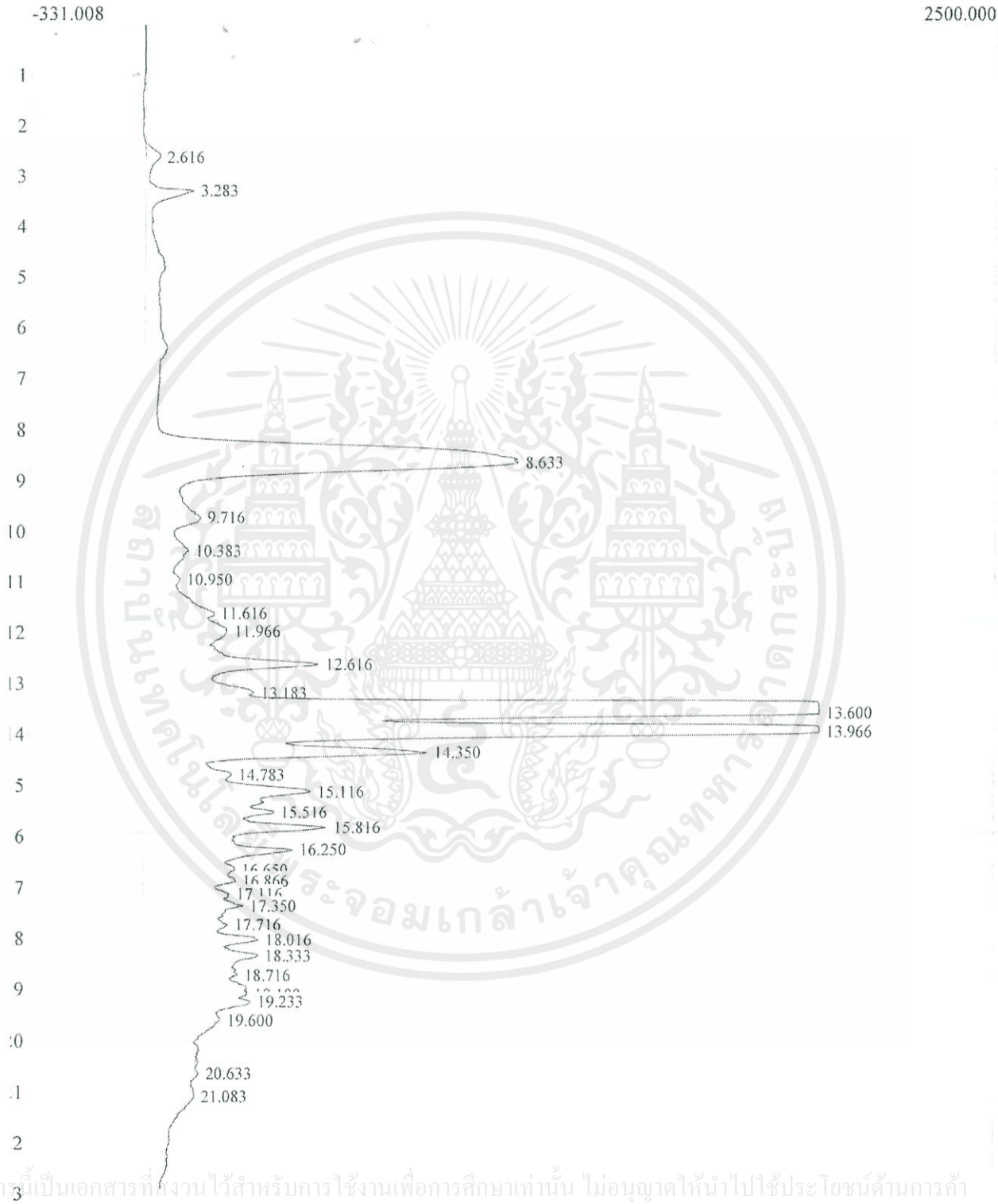


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Component	Retention	Area	Area %
	2.600	3013.8585	2.2098
	3.300	1150.8385	0.8438
	8.533	38733.7460	28.3998
	9.566	1444.7250	1.0593
	10.266	1095.9680	0.8036
	10.766	159.4920	0.1169
	11.483	1621.4500	1.1889
	11.733	232.9295	0.1708
	12.566	5586.7210	4.0962
	13.183	1551.3630	1.1375
	13.583	33833.4930	24.8069
	13.933	26497.7965	19.4284
	14.316	8083.8160	5.9271
	14.766	382.2140	0.2802
	15.100	2392.9940	1.7546
	15.300	507.6125	0.3722
	15.483	626.4870	0.4593
	15.800	2031.8480	1.4898
	16.266	2087.9060	1.5309
	16.833	132.3550	0.0970
	17.333	1071.1590	0.7854
	17.750	299.0615	0.2193
	18.016	1854.0480	1.3594
	18.316	456.9560	0.3350
	18.700	626.0750	0.4590
	19.033	165.4660	0.1213
	19.250	605.5520	0.4440
	19.750	141.2940	0.1036
		136387.2250	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 09/17/2013 10:33:27
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 17-09-56-Ginkgolide02.chr ()
Sample: pH 6, 50 uL

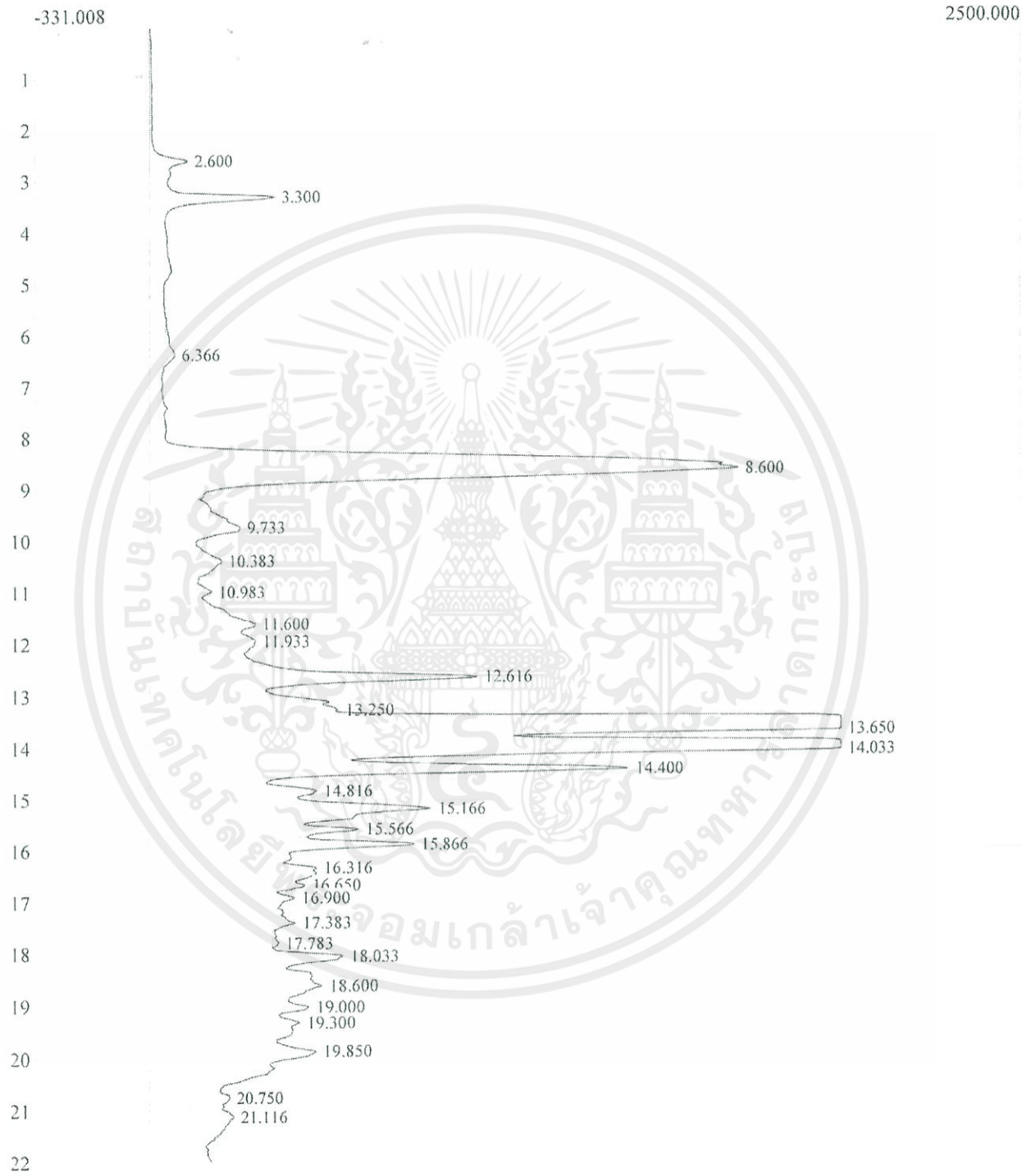


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Component	Retention	Area	Area %
	2.616	855.4000	0.6217
	3.283	1521.5960	1.1059
	8.633	32976.7535	23.9679
	9.716	1601.9160	1.1643
	10.383	939.3770	0.6828
	10.950	142.6380	0.1037
	11.616	1042.8660	0.7580
	11.966	1564.0065	1.1367
	12.616	3853.9370	2.8011
	13.183	1195.3770	0.8688
	13.600	38381.0120	27.8958
	13.966	30372.8900	22.0754
	14.350	7881.6910	5.7285
	14.783	395.3750	0.2874
	15.116	3011.9980	2.1892
	15.516	545.0290	0.3961
	15.816	2242.6585	1.6300
	16.250	1811.4945	1.3166
	16.650	220.0775	0.1600
	16.866	328.2920	0.2386
	17.116	344.5040	0.2504
	17.350	844.9945	0.6142
	17.716	230.6100	0.1676
	18.016	1023.4840	0.7439
	18.333	905.7170	0.6583
	18.716	182.0320	0.1323
	19.100	1199.1185	0.8715
	19.233	992.6240	0.7215
	19.600	574.4760	0.4175
	20.633	108.1820	0.0786
	21.083	296.8990	0.2158
		137587.0255	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lab name: HPLC-ELSD
Analysis date: 09/17/2013 11:02:41
Column: Luna C18,250 X4.0mm
Carrier: 70 %MeOH in H2O
Data file: 17-09-56-Ginkgolide03.chr ()
Sample: pH 7 , 50 uL



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Component	Retention	Area	Area %
	2.600	574.0750	0.3268
	3.300	3127.5700	1.7806
	6.366	846.4380	0.4819
	8.600	44351.4290	25.2501
	9.733	2967.4660	1.6894
	10.383	1588.1660	0.9042
	10.983	298.9500	0.1702
	11.600	1753.7730	0.9985
	11.933	1012.1310	0.5762
	12.616	7396.6720	4.2111
	13.250	2821.0980	1.6061
	13.650	37920.0110	21.5886
	14.033	32205.4950	18.3352
	14.400	12019.1510	6.8427
	14.816	1280.8200	0.7292
	15.166	5821.3980	3.3142
	15.566	1092.1810	0.6218
	15.866	2979.0670	1.6960
	16.316	1594.2670	0.9076
	16.650	587.7600	0.3346
	16.900	380.3330	0.2165
	17.383	631.9885	0.3598
	17.783	220.4820	0.1255
	18.033	2277.6380	1.2967
	18.600	2400.0475	1.3664
	19.000	618.8140	0.3523
	19.300	1054.7935	0.6005
	19.850	3838.4600	2.1853
	20.750	486.7100	0.2771
	21.116	1501.0060	0.8546
		175648.1905	100.0000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1ข. วิธีการคำนวณปริมาณรวมของ Terpene lactones ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) ของการทดลองตอนที่ 1

ตารางที่ 1.1ข แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Methanol	3812.15	823.4135	1566.076	6683.658	5571.355
2. Ethanol	3082.894	721.929	985.181	3310.121	4596.899
3. Isopropanol	1224.402	56.794	245.243	1040.245	1387.713
4. Dichloromethane	402.527	13.762	10.768	570.4435	232.56
5. Ethyl acetate	1077.193	80.488	201.87	1015.269	645.1405
6. Acetone	704.968	14.431	110.4415	594.043	447.526

ตารางที่ 1.2ข แสดงข้อมูลดิบน้ำหนักของสารสกัดทั้งหมดที่สกัดได้

น้ำหนัก สารสกัดทั้งหมด (g)	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Methanol	6.8986	6.8986	6.8986	6.8986	6.8986
2. Ethanol	5.4240	5.4240	5.4240	5.4240	5.4240
3. Isopropanol	2.5598	2.5598	2.5598	2.5598	2.5598
4. Dichloromethane	2.4046	2.4046	2.4046	2.4046	2.4046
5. Ethyl acetate	2.9685	2.9685	2.9685	2.9685	2.9685
6. Acetone	2.8456	2.8456	2.8456	2.8456	2.8456

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1.3ข แสดงน้ำหนักสารสกัดใน 50% Ethanol 2 mL (การเตรียมสารเพื่อฉีด HPLC)

น้ำหนักสารสกัดใน 50%Ethanol 2 mL (g)	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Methanol	0.157	0.157	0.157	0.157	0.157
2. Ethanol	0.154	0.154	0.154	0.154	0.154
3. Isopropanol	0.158	0.158	0.158	0.158	0.158
4. Dichloromethane	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156
5. Ethyl acetate	0.153	0.153	0.153	0.153	0.153
6. Acetone	0.159	0.159	0.159	0.159	0.159

ตารางที่ 1.4ข แสดงปริมาณของสารสกัด Terpene lactones จาก 50 µL

ปริมาณสารสกัด (g)	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Methanol	0.003925	0.003925	0.003925	0.003925	0.003925
2. Ethanol	0.00385	0.00385	0.00385	0.00385	0.00385
3. Isopropanol	0.00395	0.00395	0.00395	0.00395	0.00395
4. Dichloromethane	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039	0.0039
5. Ethyl acetate	0.003825	0.003825	0.003825	0.003825	0.003825
6. Acetone	0.003975	0.003975	0.003975	0.003975	0.003975

ตัวอย่างการคำนวณ

1. Methanol ปริมาณสารสกัด $= \frac{0.157\ g \times 50\ \mu L}{2\ mL} \times \frac{1\ mL}{1000\ \mu L} = 0.003925$ g

2. Ethanol ปริมาณสารสกัด $= \frac{0.154\ g \times 50\ \mu L}{2\ mL} \times \frac{1\ mL}{1000\ \mu L} = 0.00385$ g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1.5ข แสดงน้ำหนักแห้ง (1 g) ในสารสกัด 50 µL (เทียบกับน้ำหนักผงแปะก๊วยเริ่มต้น 30 g)

น้ำหนักแห้ง (g)	BB	GJ	GC	GA	GB
1. Methanol	0.017069	0.017069	0.017069	0.017069	0.017069
2. Ethanol	0.021294	0.021294	0.021294	0.021294	0.021294
3. Isopropanol	0.046293	0.046293	0.046293	0.046293	0.046293
4. Dichloromethane	0.048657	0.048657	0.048657	0.048657	0.048657
5. Ethyl acetate	0.038656	0.038656	0.038656	0.038656	0.038656
6. Acetone	0.041907	0.041907	0.041907	0.041907	0.041907

ตัวอย่างการคำนวณ

1. Methanol $\quad น้ำหนักแห้ง = \frac{0.003925 \times 30}{6.8986} = 0.017069\ g$

2. Ethanol $\quad น้ำหนักแห้ง = \frac{0.00385 \times 30}{5.424} = 0.021294\ g$

ตารางที่ 1.6ข ตารางแสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpenoids

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB	Total Terpenoids
1. Methanol	223341.8	48241.19	91751.41	391574.4	326408.1	1,081,316.85
2. Ethanol	144775.9	33902.54	46265.12	155446.7	215875.2	596,265.44
3. Isopropanol	26449.15	1226.846	5297.663	22471.05	29976.94	85,421.65
4. Dichloromethane	8272.79	282.8385	221.3054	11723.83	4779.605	25,280.37
5. Ethyl acetate	27866.21	2082.167	5222.232	26264.28	16689.32	78,124.21
6. Acetone	16822.28	344.3594	2635.407	14175.34	10679.08	44,656.46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณ

1. Methanol (BB) $\text{Area/g DW} = \frac{Area}{Dry\ weight} = \frac{3812.15}{0.017069} = 223341.8\ \text{g}$

* GJ, GC, GA, GB ก็คำนวณแบบเดียวกัน

2. Methanol (BB) $\text{Area/g DW} = \frac{Area}{Dry\ weight} = \frac{3082.894}{0.021294} = 144775.9\ g$

** GJ, GC, GA, GB ก็คำนวณแบบเดียวกัน

2ข. วิธีการคำนวณปริมาณรวมของ Terpene lactones ต่อน้ำหนักใบแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) ของการทดลองตอนที่ 2

ตารางที่ 2.1ข แสดงข้อมูลดิบพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละ Peak จาก HPLC Chromatogram

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB
7. น้ำ	60244.0225	2512.407	1599.363	40595.108	33546.307
8. Ethanol 85.4%	5897.3085	741.167	2339.988	4198.8855	2595.967
9. Buffer pH 5	38733.746	1444.725	1095.968	33833.493	26497.7965
10. Buffer pH 6	32976.7535	1601.916	939.377	38381.012	30372.89
11. Buffer pH 7	44351.429	2967.466	1588.166	37920.011	32205.495

ตารางที่ 2.2ข แสดงข้อมูลดิบน้ำหนักของสารสกัดทั้งหมดที่สกัดได้

น้ำหนัก สารสกัดทั้งหมด (g)	BB	GJ	GC	GA	GB
7. น้ำ	0.0945	0.0945	0.0945	0.0945	0.0945
8. Ethanol 85.4%	1.1814	1.1814	1.1814	1.1814	1.1814
9. Buffer pH 5	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079
10. Buffer pH 6	0.0836	0.0836	0.0836	0.0836	0.0836
11. Buffer pH 7	0.0745	0.0745	0.0745	0.0745	0.0745

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3ข แสดงน้ำหนักสารสกัดใน 50% Ethanol 1 mL (การเตรียมสารเพื่อฉีด HPLC)

น้ำหนักสารสกัดใน 50%Ethanol mL (g)	BB	GJ	GC	GA	GB
7. น้ำ	0.0945	0.0945	0.0945	0.0945	0.0945
8. Ethanol 85.4%	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076
9. Buffer pH 5	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079
10. Buffer pH 6	0.0836	0.0836	0.0836	0.0836	0.0836
11. Buffer pH 7	0.0745	0.0745	0.0745	0.0745	0.0745

ตารางที่ 2.4ข แสดงปริมาณของสารสกัด Terpene lactones จาก 50 µL

ปริมาณสารสกัด (g)	BB	GJ	GC	GA	GB
7. น้ำ	0.004725	0.004725	0.004725	0.004725	0.004725
8. Ethanol 85.4%	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038	0.0038
9. Buffer pH 5	0.00395	0.00395	0.00395	0.00395	0.00395
10. Buffer pH 6	0.00418	0.00418	0.00418	0.00418	0.00418
11. Buffer pH 7	0.003725	0.003725	0.003725	0.003725	0.003725

ตัวอย่างการคำนวณ

1. Buffer pH 5 ปริมาณสารสกัด $= \frac{0.079\ g \times 50\ \mu L}{1\ mL} \times \frac{1\ mL}{1000\ \mu L} = 0.00395$ g

2. Buffer pH 6 ปริมาณสารสกัด $= \frac{0.0836\ g \times 50\ \mu L}{1\ mL} \times \frac{1\ mL}{1000\ \mu L} = 0.00418$ g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5ข แสดงน้ำหนักแห้ง (1 g) ในสารสกัด 50 µL (เทียบกับน้ำหนักผงแปะก๊วยเริ่มต้น 30 g)

น้ำหนักแห้ง (g)	BB	GJ	GC	GA	GB
7. Buffer pH 5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
8. Buffer pH 6	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
9. Buffer pH 7	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
10.Ethanol 85.4%	0.096496	0.096496	0.096496	0.096496	0.096496
11.น้ำ	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

ตัวอย่างการคำนวณ

1. Buffer pH 5 $\text{น้ำหนักแห้ง} = \frac{0.00395 \times 30}{0.079} = 1.5\ \text{g}$

2. Buffer pH 6 $\text{น้ำหนักแห้ง} = \frac{0.00418 \times 30}{0.0836} = 1.5\ \text{g}$

ตารางที่ 2.6ข ตารางแสดงพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละ Peak เมื่อคำนวณต่อน้ำหนักใบแปะก๊วยแห้ง 1 กรัม (Area/g DW) จาก HPLC Chromatogram ของ Terpenoids

วิธีการสกัด	BB	GJ	GC	GA	GB	Total Terpenoids
7. น้ำ	40162.6816	1674.9400	1066.2420	27063.4053	22364.2047	92,331.47
8. EtOH 85.4 %	61114.7391	7680.8306	24249.6651	43513.7134	26902.4159	163,461.36
9. Buffer pH 5	25822.4973	963.1500	730.6453	22555.6620	17665.1977	67,737.15
10. Buffer pH 6	21984.5023	1067.9440	626.2513	25587.3413	20248.5933	69,514.63
11. Buffer pH 7	29567.6193	1978.3107	1058.7773	25280.0073	21470.3300	79,355.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณ

1. Buffer pH 5 (BB) Area/g DW $= \frac{Area}{Dry\ weight} = \frac{38733.746}{1.5} = 25822.4973$ g

2. Buffer pH 6 (BB) Area / g DW $= \frac{Area}{Dry\ weight} = \frac{32976.7535}{1.5} = 21984.50233$ g

** GJ, GC, GA, GB ก็คำนวณแบบเดียวกัน

3ข. วิธีการคำนวณค่าความบริสุทธิ์ (Purity) ของการทดลองตอนที่ 1

ตารางที่ 3ข แสดง %Area ของแต่ละ Peak จากการทดลองตอนที่ 1

% Area	BB	GJ	GC	GA	GB	Total %Area
1. Methanol	2.539	0.5484	1.0431	4.4515	3.7107	12.3
2. Ethanol	2.6874	0.6293	0.8588	2.8855	4.0072	11.1
3. Isopropanol	3.5184	0.1632	0.7047	2.9892	3.9877	11.4
4. Dichloromethane	28.6312	0.9789	0.7659	40.5748	16.5417	87.5
5. Ethyl acetate	10.527	0.7866	1.9728	9.9218	6.3047	29.5
6. Acetone	7.5922	0.1554	1.1894	6.3976	4.8196	20.2

ตัวอย่างการคำนวณ

1. %Area ของ Ethanol

$$\%\ Area = 2.6874 + 0.6293 + 0.8588 + 2.8855 + 4.0072 = 11.1\%$$

2. %Area ของ Methanol

$$\%\ Area = 2.539 + 0.5484 + 1.0431 + 4.4515 + 3.7107 = 12.3\%$$

* หมายเหตุ %Area เทียบได้เป็นค่าความบริสุทธิ์ (Purity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4ข. วิธีการคำนวณค่าความบริสุทธิ์ (Purity) ของการทดลองตอนที่ 2

ตารางที่ 4ข แสดง %Area ของแต่ละ Peak จากการทดลองตอนที่ 2

% Area	BB	GJ	GC	GA	GB	Total %Area
7. น้ำ	28.0456	1.1696	0.7446	18.8984	15.6169	64.5
8. EtOH 85.4 %	5.746	0.7221	2.2799	4.0911	2.5294	15.4
9. Buffer pII 5	28.3998	1.0593	0.8036	24.8069	19.4284	74.5
10. Buffer pH 6	23.9679	1.1643	0.6828	27.8958	22.0754	75.8
11. Buffer pH 7	25.2501	1.6894	0.9042	21.5886	18.3352	67.8

ตัวอย่างการคำนวณ

1. %Area ของ Buffer pH 5

$$\%\,Area = 28.3998 + 1.0593 + 0.8036 + 24.8069 + 19.4284 = 74.5\%$$

2. %Area ของ Buffer pH 6

$$\%\,Area = 23.9679 + 1.1643 + 0.6828 + 27.8958 + 22.0754 = 75.8\%$$

* หมายเหตุ %Area เทียบได้เป็นค่าความบริสุทธิ์ (Purity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการคำนวณค่าความมีขั้ว (Polarity)

การคำนวณความมีขั้วของ Methanol เพื่อเทียบไปเป็น Ethanol

เมื่อความมีขั้วของ Methanol = 32.7, Ethanol = 24.6, Water = 80.1

จากสูตร

$$Polarity = \frac{(Percent1 \times Polarity1) + (Percent2 \times Polarity2)}{100}$$

$$Polarity\ MeOH = \frac{[A \times 24.6] + [(100 - A) \times 80.1]}{100}$$

$$3270 = 24.6A + [8010 - 80.1A]$$

$$80.1A - 24.6A = 8010 - 3270$$

$$55.5A = 4740$$

$$A = \frac{4740}{55.5} = 85.4\ \%$$

ดังนั้น Methanol จะมีความมีขั้วเท่ากับ Ethanol 85.4%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้