การทดสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมี การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของชุมเห็ดเทศ

พอตา ชัยกิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กันยายน 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ พอตา ชัยกิจ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ดร.เนาวรัตน์ กองคำ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น)

..... กรรมการ
(ดร.เบญจวรรณ ชิวปรีชา)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 30 เดือน กันยายน พ.ศ.2559

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา เสนอแนะแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือเมื่อเกิดปัญหา ให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ทางด้านเคมี ทั้งในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการทางด้านเคมี เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้า มีเจตคติทางวิทยาศาสตร์ และสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการทำงานวิจัยรวมถึงสามารถถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์เหล่านี้ไปสู่นักเรียนได้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ปริยา ปะบุญเรือง อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และ นางสาวปาลิตา เอี่ยมหมดจด นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ช่วยให้ความรู้ และอำนวยความสะดวกในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ขอขอบพระคุณ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ผู้ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษา และการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสมพงศ์ ชัยกิจ คุณแม่ปลื้ม ชัยกิจ และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จ มาจนถึงทุกวันนี้

พอตา ชัยกิจ

57920929: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: ชุมเห็ดเทศ/ การตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษทางเคมี/ การต้านอนุมูลอิสระ/ การต้านแบคทีเรีย

พอตา ชัยกิจ: การทดสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของชุมเห็ดเทศ (PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *SENNA ALATA* (L.) ROXB.)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จงกลณี จงอร่ามเรือง, Ph.D. 68 หน้า. ปี พ.ศ. 2559.

ชุมเห็ดเทศ (*Senna alata* (L.) Roxb.) พืชในวงศ์ Fabaceae เป็นพรรณไม้พื้นเมืองของอเมริกาเขตร้อน สามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสำคัญทางพฤกษเคมี การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจากส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศ ได้แก่ ใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล สกัดโดยใช้เอทิลอะซิเตด และเมทานอล ทำให้ได้สารสกัดหยาบจำนวน 8 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่า ชุมเห็ดเทศมีสาระสำคัญทางพฤษเคมีหลายชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตอร์รอยด์ และคาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ แต่ไม่มีการตรวจพบอัลคาลอยด์ในทุกส่วนที่ทำการทดสอบ และเมื่อทดสอบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH พบว่า สารสกัดหยาบทั้ง 8 ตัวอย่าง มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion เทียบกับสารมาตรฐาน chloramphenicol พบว่า สารสกัดหยาบจากชุมเห็ดเทศทั้ง 8 ตัวอย่าง สามารถต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* และมีเพียงสารสกัดเมทานอลจากดอกของชุมเห็ดเทศเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยที่ยา chloramphenicol ไม่สามารถต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ไม่มีสารสกัดใดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli*

57920929: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: *SENNA ALATA* (L.) ROXB./ PHYTOCHEMICAL SCREENING/ ANTIOXIDANT/ ANTIBACTERIAL

POTA CHAIYAKIT: PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF *SENNA ALATA* (L.) ROXB.
ADVISORY COMMITTEE: JONGKOLNEE JONGARAMRUONG, Ph.D. 68 P. 2016.

Senna alata (L.) Roxb. is in the family of Fabaceae. It is a native plant of tropical america and can be found in any part of Thailand. The study purpose involved in phytochemical screening antioxidant and antibacterial activities. Four parts of this plants (leaves, barks, stems and flowers) were extracted by using ethylacetate and methanol to get eight crude extracts. Phytochemical screening in the *Senna alata* (L.) Roxb. crude extracts found typically flavonoids, anthaquinones, coumarins, saponins, tannins, terpenoids, steroids and cardiac glycosides, but not being detectable alkaloids. The eight crude extracts showed antioxidant activity by the DPPH assay. Moreover, the eight crude extracts displayed antibacterial activity using disc diffusion method compares with the standard chloramphenicol against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Only the methanol extract from the flowers was active against *Pseudomonas aeruginosa*. However, all the eight crude extracts were not active against *Escherichia coli*.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

ชุมเห็ดเทศ (Senna alata (L.) Roxb.) 6

การเตรียมตัวอย่างพืช (preparation of plant material) 7

การสกัด (extraction) 8

การทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration) 12

เทคนิคโครมาโทกราฟี (chromatography) 12

การตรวจสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening) 14

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) 20

การกำจัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (destruction and inhibition of microorganism) 22

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 23

3 วิธีดำเนินการวิจัย 27

เครื่องมือ และสารเคมี 27

วิธีการวิจัย 28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย	35
สารสกัดจากส่วน ใบ เปลือก ดอก และผลของชุมเห็ดเทศ	35
การตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น	36
ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารละลาย DPPH โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)	37
การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย	38
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	40
ข้อเสนอแนะ	41
บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก	46
ภาคผนวก ข	50
ภาคผนวก ค	55
ภาคผนวก ง	61
ภาคผนวก จ	63
ประวัติย่อของผู้วิจัย	68

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4-1 ลักษณะและปริมาณที่สกัดได้ (Yield) จากส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศ 35

4-2 ผลการตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีจากสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศ 36

4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 37

4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ 39

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ชุมเห็ดเทศ	5
2-2	ส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศ (ก) ใบ (ข) ดอก (ค) ผล	6
2-3	มาเซอเรชัน (maceration)	9
2-4	เพอร์โคเลชั่น (percolation)	9
2-5	การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction)	10
2-6	โครงสร้าง caffeine	15
2-7	โครงสร้าง flavonoid skeleton	15
2-8	โครงสร้าง anthaquinones skeleton	16
2-9	โครงสร้าง coumarin	17
2-10	โครงสร้าง hecogenin	17
2-11	โครงสร้าง tannic acid	18
2-12	โครงสร้าง myrcene	18
2-13	โครงสร้าง carotol	18
2-14	โครงสร้าง cyclopentanoperhydrophenanthrene nucleus	19
2-15	โครงสร้าง cardenolide	19
2-16	โครงสร้าง bufadienolide	19
2-17	โครงสร้าง alarone (1)	23
2-18	โครงสร้าง aloeemodin (2)	24
2-19	โครงสร้าง adenine (3)	25
2-20	โครงสร้าง kaempferol-3-O-gentiobioside (4)	25
2-21	โครงสร้าง 3,5,7,4¬-tetrahydroxy flavones (5)	26
3-1	แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย	28
3-2	ส่วนต่าง ๆ ของพืชหลังจากตากแห้งแล้ว (ก) ใบ (ข) เปลือกลำต้น (ค) ดอก (ง) ผล	29
3-3	การปั่นชุมเห็ดเทศ	30
3-4	การสกัดสารด้วยเอทิลอะซิเตด (ก) ใบ (ข) เปลือกลำต้น (ค) ดอก (ง) ผล	31
3-5	การสกัดสารด้วยเมทานอล (ก) ใบ (ข) เปลือกลำต้น (ค) ดอก (ง) ผล	32

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-1	ตัวอย่างการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Bacillus subtilis ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตด ทั้ง 4 ส่วนของชุมเห็ดเทศ	38
ก-1	ต้นชุมเห็ดเทศ	47
ก-2	ต้นชุมเห็ดเทศ	47
ก-3	ใบชุมเห็ดเทศ (หน้าใบ-หลังใบ)	48
ก-4	เปลือกลำต้นชุมเห็ดเทศ	48
ก-5	ดอกชุมเห็ดเทศ	49
ก-6	ผลชุมเห็ดเทศ	49
ข-1	การสกัดสารจากใบด้วยเอทิลอะซิเตด	51
ข-2	การสกัดสารจากเปลือกลำต้นด้วยเอทิลอะซิเตด	51
ข-3	การสกัดสารจากดอกด้วยเอทิลอะซิเตด	52
ข-4	การสกัดสารจากผลด้วยเอทิลอะซิเตด	52
ข-5	การสกัดสารจากใบด้วยเมทานอล	53
ข-6	การสกัดสารจากเปลือกลำต้นด้วยเมทานอล	53
ข-7	การสกัดสารจากดอกด้วยเมทานอล	54
ข-8	การสกัดสารจากผลด้วยเมทานอล	54
ค-1	การตรวจสอบสารอัลคาลอยด์	56
ค-2	การตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์	56
ค-3	การตรวจสอบสารแอนทราควิโนน	57
ค-4	การตรวจสอบสารคูมาริน	57
ค-5	การตรวจสอบสารซาโปนิน	58
ค-6	การตรวจสอบสารแทนนิน	58
ค-7	การตรวจสอบสารเทอร์พีนอยด์	59
ค-8	การตรวจสอบสารสเตอรอยด์	59
ค-9	การตรวจสอบสารคาร์ดิแอก กลัยโคไซด์	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ง-1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด
โดยใช้ เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 3: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ 62

ง-2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมทานอล
โดยใช้ เฮกเซน: เอทิลอะซิเตด เท่ากับ 5: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ 62

จ-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Bacillus subtilis ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด 64

จ-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Bacillus subtilis ของสารสกัดจากเมทานอล 64

จ-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylococcus aureus ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด 65

จ-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylococcus aureus ของสารสกัดจากเมทานอล 65

จ-5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Escherichia coli ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด 66

จ-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Escherichia coli ของสารสกัดจากเมทานอล 66

จ-7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด 67

จ-8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ของสารสกัดจากเมทานอล 67

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็ก มีหลากหลายสายพันธุ์ สามารถแพร่กระจายอยู่ทั่วไป ทั้งบนบก ในอากาศหรือในน้ำ มนุษย์สามารถรับเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง ทั้งการหายใจ การกินอาหารหรือดื่มน้ำ รวมถึงการติดเชื้อแบคทีเรียผ่านทางผิวหนังหรือบริเวณบาดแผล ซึ่งแบคทีเรียหลายชนิดทำให้เกิดโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดส่งผลให้เยื่อบุหัวใจอักเสบ หรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ทำให้เกิดการอักเสบในระบบทางเดินปัสสาวะ ก่อโรคในไต และท้องเสีย (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2555) จะเห็นได้ว่าโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากแบคทีเรียมีความหลากหลายและรุนแรง ในปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดเพื่อใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก อันเนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม โดยเชื้อดื้อยาจะทนต่อยาที่เคยยับยั้งเชื้อได้ ทำให้การรักษาด้วยยาตัวเดิม ไม่ได้ผล ต้องใช้ยาที่แรงขึ้นในการรักษา ทางออกของปัญหาการดื้อยานี้สามารถแก้ไขได้โดยการ นำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งพืช แต่ละชนิดจะมีประโยชน์ในการรักษาโรคได้แตกต่างกัน เนื่องจากพืชมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกันออกไป เช่น เปลือกมังคุดมีรสฝาดใช้เป็นยาแก้ท้องเสียเพราะมีสารแทนนิน ฝักคูณมีกลิ่นและรสเฉพาะสามารถนำมาใช้เป็นยาระบายได้เพราะมีสารแอนทราควิโนน (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544) ดังนั้น ก่อนจะนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษา ควรศึกษา รายละเอียดเกี่ยวกับกลุ่มสารสำคัญในพืชเพื่อเป็นประโยชน์ในการนำพืชต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ ได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ในพืช ผัก และผลไม้หลาย ๆ ชนิดยังประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์นั้นอาจรับเข้ามาจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ เช่น ฝุ่นควัน บุหรี่ ความร้อน แสงแดด หรือเกิดจากร่างกายสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาเอง ส่งผลทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง หัวใจและหลอดเลือด แก่ก่อนวัย

จากการรายงานในปัจจุบันพบว่ามีการนำสารสกัดจากชุมเห็ดเทศมาใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เช่น การศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพร 13 ชนิด เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบของสิว พบว่า ชุมเห็ดเทศ สาบเสือ มังคุด ส้มแขก และเสลดพังพอน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดี (Chomnawang, Surassmo, Nukoolkarn, & Gritsanapan, 2005) จะเห็นได้ว่าชุมเห็ดเทศเป็นพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยไม่ก่อให้เกิดผลกระทบในด้านการดื้อยา นอกจากนี้มีงานวิจัยที่ได้ทำการแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Bioassay-guided isolation พบว่า ใบ ดอก และฝักของชุมเห็ดเทศมีสารต้านอนุมูลอิสระ ชุมเห็ดเทศเป็นพืชที่มีสารสำคัญทางพฤกษเคมีที่หลากหลาย ได้แก่ ฟลาโวนอยด์แอนทราควิโนน (โชติอนันต์และคณะ, 2551) เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกาเขตร้อน ที่สามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เจริญเติบโตได้ง่าย ชอบแสงแดดจัด ต้องการความชื้นสูง (อุดมการ อินทุใส และปาริชาติ ทะนานแก้ว, 2549)

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น การต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจาก 4 ส่วนของต้นชุมเห็ดเทศ คือ ใบ เปลือกลำต้น ดอก และผล ผลการศึกษาที่ได้นำมาใช้เป็นแนวทางในการนำชุมเห็ดเทศมาเป็นส่วนผสมของยายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อลดปัญหาการดื้อยา รวมถึงใช้เป็นส่วนผสมของยาหรือผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังเป็นการนำสมุนไพรพื้นบ้านที่มีในท้องถิ่นมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารจากชุมเห็ดเทศ
2. เพื่อศึกษาสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้นในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก และผลของชุมเห็ดเทศ
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก และผลของชุมเห็ดเทศ
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก และผลของชุมเห็ดเทศ

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ใช้ชุมเห็ดเทศ จากส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล ที่เก็บมาจากตำบลระโนด อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา วันที่ 6 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้วิธี disc diffusion
3. สกัดสารใช้วิธีการแช่แบบไล่ขั้ว โดยแช่ในเอทิลอะซิเตด จากนั้นนำกากที่ได้ไปทำการสกัดต่อด้วยเมทานอล
4. ทดสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้นทั้งหมด 9 ชนิดได้แก่ อัลคาลอยด์ คูมาริน ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ คาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ และสเตอร์รอยด์
5. ทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารละลาย DPPH ซึ่งแยกสารโดยใช้เทคนิคโครมาโทรกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทำให้ทราบตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการสกัดสารจากชุมเห็ดเทศ
2. ทำให้ทราบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้นในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล ของชุมเห็ดเทศ
3. ทำให้ทราบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล ของชุมเห็ดเทศ
4. ทำให้ทราบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล ของชุมเห็ดเทศ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. สารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น หมายถึง สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งทำการทดสอบทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แอนทราควิโนน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอร์รอยด์ และคาร์ดิแอก กลัยโคไซด์

2. ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย หมายถึง ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้วิธี disc diffusion

3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดชุมเห็ดเทศ หมายถึง สมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical) ของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาประกอบการดำเนินการตามลำดับ ดังนี้

1. ชุมเห็ดเทศ (*Senna alata* (L.) Roxb.)
2. การเตรียมตัวอย่างพืช (preparation of plant material)
3. การสกัด (extraction)
4. การทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration)
5. เทคนิคโครมาโทกราฟี (chromatography)
6. การตรวจสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening)
7. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)
8. การกำจัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (destruction and inhibition of microorganism)
9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภาพที่ 2-1 ชุมเห็ดเทศ

ชุมเห็ดเทศ (*Senna alata* (L.) Roxb.)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Senna alata* (L.) Roxb.

วงศ์ Fabaceae (Leguminosae)

วงศ์ย่อย Caesalpinioideae

ชื่อพ้อง *Cassia alata* L., *C. bracteata* L. f., *Herpetica alata* (L.) Raf.

(คณะกรรมการคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย, 2552)

ชุมเห็ดเทศมีชื่อเรียกแต่ละท้องถิ่นแตกต่างกันไป เช่น ลับมืนหลวง หมากกะลิงเทศ ขี้คาก (ภาคเหนือ) ชุมเห็ดเทศ (ภาคกลาง ภาคใต้) ชุมเห็ดใหญ่ ตะสีพอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) (อุดมการ อินทุใส และปาริชาติ ทะนานแก้ว, 2549) เป็นไม้พุ่ม สูง 1-5 เมตร ใบประกอบแบบขนนกปลายคู่ ใบย่อยรูปไข่ขอบขนานมีความกว้าง 3-7 เซนติเมตร ยาว 5-15 เซนติเมตร ช่อดอกสีเหลืองออกตามปลายกิ่งหรือตามซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ยาว 20-50 เซนติเมตร มีใบประดับสีเหลืองรูปไข่ ประกบหุ้มดอกขณะตูม ร่วงง่าย มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ สีเหลืองแกมส้ม มีกลีบดอก 5 กลีบสีเหลือง ผลเป็นฝักรูปสี่เหลี่ยมยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร มีครีบตามความยาวฝัก เมื่อแก่สีน้ำตาลดำมีเมล็ดจำนวนมาก ค่อนข้างแบน เปลือกแข็ง (คณะกรรมการคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย, 2552) เป็นพรรณไม้พื้นเมืองของอเมริกาเขตร้อน ขึ้นง่ายและชอบแสงแดดจัด ต้องการความชื้นสูง ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดจากฝักแก่ (อุดมการ อินทุใส และปาริชาติ ทะนานแก้ว, 2549)

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 2-2 ส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศ (ก) ใบ (ข) ดอก (ค) ผล

ชุมเห็ดเทศมีสารกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinones) ซึ่งอยู่ในรูปอะไกลโคนเสรี (free aglycones) เช่น เรอิน (rhein) อะโลอิโมดิน (aloe-emodin) ฟิสซิโอน (physcione) และไอโซคริโซฟานอล (isochrysophanol) นอกจากนี้ยังมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เช่น แคมป์ฟีรอล (kaempferol) (คณะกรรมการคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย, 2552)

รสและสรรพคุณในตำรายาทั่วไป

ใบ รสเบื่อเอียน ทาแก้กลากเกลื้อน โรคผิวหนัง ฝี และแผลพุพอง

ดอก รสเอียน เป็นยาระบาย ถ่ายพยาธิลำไส้

ฝักและเมล็ด รสเบื่อเอียน เป็นยาระบาย ขับพยาธิตัวตืด พยาธิไส้เดือน

ต้น รสเบื่อเอียน ใช้ขับพยาธิในท้อง

ราก รสเบื่อเอียน แก้กระษัยเส้น รักษามูกเลือด ขับปัสสาวะ (โชติอนันต์ อินทุใสตระกูล, กุลกัลยา ชัยจรีนนท์, จิรวิชญ์ ฐิติโชติอนันต์ และวัฒกะ ชาวสวน, 2551)

การเตรียมตัวอย่างพืช (preparation of plant material)

การเตรียมตัวอย่างพืชต้องคำนึงถึงสิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ได้แก่ การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง เพื่อให้ได้ชื่อพฤกษศาสตร์และได้ตัวอย่างที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นปน เพราะทำให้ได้สารแปลกปลอม และผลการวิจัยที่ผิดพลาดได้ นอกจากนี้ต้องคำนึงถึงความแตกต่างของสารสำคัญในพืช เพราะการเก็บพืชแต่ละครั้ง สารสำคัญในพืชอาจแตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิด ดังนั้น ควรบันทึกเวลาและสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะมีวิธีการเตรียมดังนี้

1. การทำสมุนไพรให้แห้ง

การทำสมุนไพรให้แห้งโดยคงคุณภาพของสมุนไพรควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญสลายตัวได้ การทำให้แห้งอาจจะทำได้โดย

1.1 air drying การทำให้แห้งตามธรรมชาติ อาจเป็นการทำให้แห้งในที่ร่ม (shade drying) หรือตากแดด (sun drying)

1.2 artificial heat การทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากพลังงานอื่น ได้แก่ การใช้ตู้อบ ซึ่งสามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของอากาศ และควบคุมอุณหภูมิได้แน่นอน

2. การแตกย่อยเนื้อเยื่อ

การแตกย่อยเนื้อเยื่อเป็นการทำให้เนื้อเยื่อของพืชมีขนาดเล็กลง ตัวทำละลายจะแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ได้ดี และสกัดสารสำคัญออกมาได้มาก ทำได้หลายวิธี คือ

2.1 mechanical method อาศัยหลักการบดด้วยโกร่ง ด้วยเครื่องมือที่เหมาะสมได้แก่

2.1.1 hammer mill คือการบดด้วยหัวค้อนที่หมุนได้ ขนาดขึ้นอยู่กับขนาดของแร่ง (grind) วิธีนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ cellulose ทำให้ reducing group เป็นอิสระ สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ นอกจากนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

2.1.2 knife mills การทำงานคล้ายกับ hammer mill ต่างกันที่เป็นใบมีดแทนหัวค้อน ใบมีดหมุนได้ทั้งแนวราบและแนวดิ่ง เหมาะสำหรับบดใบ เปลือก และราก

2.1.3 teeth mill มีแผ่นฟัน 2 แผ่น แผ่นหนึ่งอยู่กับที่ อีกแผ่นหนึ่งหมุนมาสีกันพอดีทำให้บดเป็นผง เหมาะสำหรับบดเมล็ดแข็ง ๆ หรือสมุนไพรที่สับมาแล้ว

2.1.4 การหั่น (slicing) ใช้มีดหรือเครื่องบดเนื้อ เหมาะกับสมุนไพรสด

2.2 enzymatic disintegration คือการย่อยเนื้อเยื่อ โดยใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น เอนไซม์สำหรับย่อย pectin และ cellulose

2.3 chemical disintegration การแตกย่อยเนื้อเยื่อโดยใช้สารเคมี ได้แก่ ใช้สาร dimethylformamide ทำให้ chlorella แตก (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

การสกัด (extraction)

1. การเลือกน้ำยาสกัด

น้ำยาในการสกัดสมุนไพรควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

1.1 น้ำยาสกัดมีความสามารถในการละลายสารที่สำคัญได้มากที่สุด แต่ไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่น ๆ ได้น้อย

1.2 คงตัว หาง่าย ราคาถูก และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

1.3 ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

1.4 สภาพสมุนไพรที่ทำการสกัด เช่น เมล็ด มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วก่อน แล้วนำกากที่เหลือไปสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

2. วิธีการสกัด

2.1 มาเซอเรชัน (maceration) วิธีการหมักสมุนไพรกับน้ำยาสกัดจนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและน้ำยาสกัดสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในสมุนไพรออกมาได้ ควรทำในภาชนะที่มีฝาปิด หมักเป็นเวลา 7 วัน หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด วิธีนี้เหมาะกับพืชที่มีเนื้อเยื่อไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย และเป็นวิธีที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะกับสารสกัดที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีนี้มักไม่

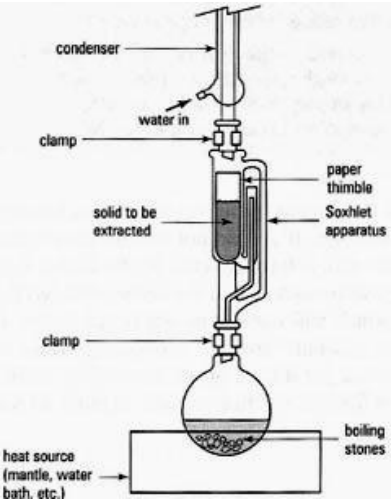
สมบูรณ์เพราะเมื่อสมุนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพรและน้ำยาสกัดที่ใช้ ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง

ภาพที่ 2-3 มาเซอเรชัน (maceration)

2.2 เพอร์โคเลชั่น (percolation) วิธีการสกัดโดยการปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้า ๆ พร้อมกับละลายองค์ประกอบออกจากผงสมุนไพร โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่าเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดที่สมบูรณ์ และไม่ต้องใช้ความร้อนแต่มีข้อเสีย คือเปลืองน้ำยาสกัด และใช้เวลานาน

ภาพที่ 2-4 เพอร์โคเลชั่น (percolation) (อ้างอิงจาก https://en.wikipedia.org
วันที่ค้นข้อมูล 1 เมษายน 2559)

2.3 การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) วิธีนี้ต้องใช้ความร้อน และใช้ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor) ซึ่งเป็นระบบปิด เมื่อตัวทำละลายได้รับความร้อนจะระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (extracting chamber) สูงถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะ ตัวทำละลายจะผ่านผงสมุนไพรซ้ำ ๆ ไปเรื่อย ๆ จนองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดอย่างสมบูรณ์ วิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน ใช้น้ำยาสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง แต่ข้อเสีย คือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน



ภาพที่ 2-5 การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction)

(อ้างอิงจาก http://www.eplantscience.com วันที่ค้นข้อมูล 1 เมษายน 2559)

2.4 การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) มีหลายวิธี ดังนี้

2.4.1 การกลั่น (distillation) มี 2 วิธี คือ การกลั่นโดยใช้น้ำ (water distillation) และการกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (steam distillation)

2.4.2 การบีบหรือการอัด (expression) ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้กับวิธีกลั่นไม่ได้ เนื่องจากอาจถูกทำลายด้วยความร้อน เช่น น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

2.4.3 วิธีเอ็นฟอยเรนซ์ (enfleurage) ใช้กับน้ำมันหอมระเหยของดอกไม้ต่าง ๆ เป็นวิธีที่เก็บความหอมได้ดี ใช้ไขมันเป็นตัวดูดซับ โดยนำตัวดูดซับมาแผ่เป็นแผ่นบาง ๆ แล้วนำ

กลีบดอกไม้ มาวางเรียงบนตัวดูดซับนาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนกลีบดอกไม้ใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ หลังจากนั้น เอาตัวดูดซับมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยออกด้วยแอลกอฮอล์

2.4.4 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (extraction with solvent) ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส มีต้นทุนการผลิตสูงกว่าการกลั่น

3. การเลือกวิธีการสกัด

วิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่

3.1 ธรรมชาติของสมุนไพร พิจารณาจาก

3.1.1 ลักษณะและโครงสร้างของเนื้อเยื่อ หากมีลักษณะอ่อนนุ่ม อาจใช้วิธีมาเซอเรชัน (maceration) แต่หากมีเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเหนียว ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน (percolation) หรือการสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction)

3.1.2 ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่าย นิยมใช้วิธีมาเซอเรชัน (maceration) แต่ถ้าละลายได้น้อยควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน (percolation) หรือการสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction)

3.1.3 ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าหากเป็นสารที่สลายตัว เมื่อโดนความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชัน (maceration) หรือเพอร์โคเลชัน (percolation)

3.2 คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด หากต้องการสารที่ไม่สำคัญมาก มีคุณค่าต่อการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รสของยา อาจใช้วิธีง่าย ๆ ที่ไม่ยุ่งยาก ลงทุนน้อย

3.3 ความต้องการที่จะให้ได้สารสกัดที่สมบูรณ์หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเจือจาง การใช้วิธีมาเซอเรชัน (maceration) ก็เพียงพอแล้ว ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้น ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน (percolation) หรือการสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

การทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration)

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้ยังเจือจางไม่สะดวกต่อการนำไปแยกส่วน และไม่มีประสิทธิภาพ ต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อน สามารถทำได้หลายวิธี คือ

1. free evaporation

free evaporation คือ การระเหยให้แห้งโดยใช้หม้ออังไอน้ำ หรือ hot plate อาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

2. distillation in vacuo

distillation in vacuo คือ การระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันโดยใช้ vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า rotary evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ขวดกลั่น (distillation flask) เครื่องควบแน่น (condenser) และขวดรับสาร (receiving flask)

3. freezing

freezing นิยมใช้กับสารสกัดด้วยน้ำ วิธีที่เหมาะสม คือ วิธีแช่แข็งโดยใช้ lyophilizer หรือ freeze dryer วิธีนี้เหมาะกับสารที่สลายตัวได้ง่ายด้วยความร้อน

4. ultrafiltration

ultrafiltration คือการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้เมมเบรน (membrane) นิยมใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000 (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

เทคนิคโครมาโทกราฟี (chromatography)

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นวิธีการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันที่นิยมอย่างแพร่หลาย อาศัยความต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) เฟสเคลื่อนที่ทำหน้าที่ในการพาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ องค์ประกอบในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านเข้าและออกระหว่างเฟสทั้งสอง และมีการหน่วงเหนี่ยว (retention)ในเฟสอยู่กับที่ซึ่งขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีขององค์ประกอบแต่ละชนิดที่อยู่ในสารตัวอย่าง ทำให้องค์ประกอบหรือสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ในอัตราที่แตกต่างกัน เกิดการแยกสารขึ้น การแยกองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากสมุนไพรโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีมี ดังนี้

1. เปเปอร์โครมาโทกราฟี (paper chromatography)

เปเปอร์โครมาโทกราฟี (paper chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ไม่ซับซ้อน ทำได้โดยจัดหากระดาษกรองเพื่อใช้เป็นซัพพอร์เทอร์ (supporter) นำสารตัวอย่างที่จะทำการแยกไปละลายในตัวทำละลายที่ระเหยได้ จากนั้นนำไปแต้ม (spot) ลงบนกระดาษกรอง การแยกจะเกิดขึ้นภายในภาชนะที่ทำด้วยแก้ว และมีฝาปิดมิดชิด วางกระดาษไว้ในลักษณะที่สอดคล้องกับการไหลของตัวทำละลาย โดยการเอาด้านที่ใส่สารละลายตัวอย่างจุ่มในระบบตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ไปตามแนวของกระดาษพร้อมกับพาองค์ประกอบในสารละลายตัวอย่าง ให้เคลื่อนที่ไปด้วย จึงทำให้เกิดการแยก จากนั้นสารที่ถูกแยกออกจากกันจะถูกตรวจหาโดยวิธีต่าง ๆ หรือนำมาหาค่า R_f (retardation factor or relative front) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$R_f = \text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่} / \text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}$$

ค่า R_f ใช้เป็นเครื่องบ่งบอกว่าเป็นสารนั้นหรือไม่ โดยเปรียบเทียบค่า R_f ของสารตัวอย่างที่แยกได้กับค่า R_f ของสารมาตรฐาน ในเทคนิคนี้การจะควบคุมสภาวะการทดลองให้เหมือนกันทุกครั้งนั้นทำได้ยาก ดังนั้นควรแต้มทั้งสารตัวอย่างและสารมาตรฐานไปบนกระดาษแผ่นเดียวกัน และมีขนาดของจุดเท่ากัน จากนั้นจึงนำไปแยก นอกจากนี้สามารถหาความเข้มข้นของสารได้ เช่น ทำปฏิกิริยา การเกิดสีกับน้ำยาตรวจสอบแล้ววัดพื้นที่ของจุดสารตัวอย่างเทียบกับจุดสารมาตรฐาน หรือทำการตรวจวัดพื้นที่ของจุดโดยใช้แพลนนิมิเตอร์ (planimeter)

2. ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC)

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography, TLC) เป็นเทคนิคที่ใช้เฟสอยู่กับที่หรือแอดซอร์เบนท์ แผ่บนแผ่นรองรับหรือซัพพอร์เทอร์ซึ่งทำด้วยแก้วหรืออะลูมิเนียมเมื่อหยดสารละลายตัวอย่างลงบนแอดซอร์เบนท์แล้ว จึงนำแผ่น TLC ใส่ในภาชนะซึ่งบรรจุเฟสเคลื่อนที่หรือระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่ซึ่งเรียกว่าดีวีลอปเมนท์ (development) จะทำให้เกิดการแยกสารต่าง ๆ ออกจากกัน หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ไปตรวจสอบว่าสารที่แยกได้เป็นสารกลุ่มใด โดยการใช้น้ำยาตรวจสอบแบบต่าง ๆ ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ด้วยเทคนิคนี้ทำโดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานจากสี และค่า R_f ของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐาน ทำให้สามารถตรวจเอกลักษณ์ (identify) สารได้ ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเปรียบเทียบขนาดและความเข้ม ของจุดสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน การหาปริมาณสารโดยวัดความเข้มของจุดด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน การหาปริมาณด้วยวิธีอีลูชัน (elution) โดยสกัดสารออกจากแผ่น TLC แล้วนำไปหาปริมาณด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (spectrophotometer)

3. ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (high pressure thin-layer chromatography, HPTLC)

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง (high pressure thin-layer chromatography, HPTLC) เป็นวิธีที่พัฒนามาจาก TLC โดยใช้แอดซอร์เบนท์ที่มีขนาดอนุภาคเล็กลง (2-7 ไมโครเมตร) และมีความแตกต่างของอนุภาคน้อยมาก ทำให้ HPTLC มีความรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำและมีความไวมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีเครื่องเดนซิโตมิเตอร์เป็นองค์ประกอบทำหน้าที่เป็นเครื่องวัดจึงใช้มากในการ หาปริมาณสารจากพืชสมุนไพร

4. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography, CC)

คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography, CC) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกสาร เฟสเคลื่อนที่จะพาสารเคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วปลายเปิด กลไกที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพรด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วนใหญ่เป็นการดูดซับ ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือตัวทำละลายไม่มีขั้ว (non-polar solvent) เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน โทลูอีน คลอโรฟอร์ม และสามารถใช้สารละลายเดี่ยว ๆ ในการชะล้างสารสำคัญออกจากคอลัมน์ เพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของสารโดยเติมตัวทำละลายตัวที่สองไปยังเฟสเคลื่อนที่ซึ่งมักจะมีขั้วมากกว่าตัวทำละลายตัวแรก (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

การตรวจสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening)

พฤกษเคมี (Phytochemistry) เป็นวิชาที่ศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่พบในพืช มีขอบเขตเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญจากพืช การแยกสารให้บริสุทธิ์ การหาสูตรโครงสร้างและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารเคมีที่แยกได้จากพืช และกระบวนการสลายตัวของสารเคมีในพืช เป็นต้น กลุ่มสารที่สำคัญในพืชมีอยู่เป็นจำนวนมาก สามารถแบ่งกลุ่มตามสารตั้งต้นของสารเหล่านี้ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

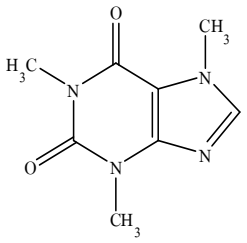
สารปฐมภูมิ (primary metabolites) พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด เป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมที่จำเป็น (essential metabolism) ของเซลล์ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ไขมัน (lipids) โปรตีน (protein) และเอนไซม์ (enzymes)

สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน แต่ยังคงเกี่ยวข้องในวงจรเมทาบอลิซึมพื้นฐานในเซลล์ที่มีชีวิต แบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้เป็น อัลคาลอยด์ (alkaloids) สารกลุ่มฟีนอลิก

(phenolic compounds) เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์ (terpenoids and steroids)

1. อัลคาลอยด์ (alkaloids)

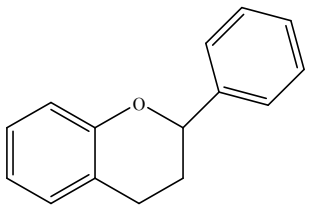
อัลคาลอยด์เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่พบมากในพืชชั้นสูง โมเลกุลของอัลคาลอยด์จะพบไนโตรเจนอยู่ 1 อะตอมหรืออาจจะพบมากกว่า 1 อะตอม มีประโยชน์ในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ แก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้ ยาลดความดัน ตลอดจนยาที่ควบคุมการเต้นของหัวใจ ตัวอย่างสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ ได้แก่ morphine, caffeine



ภาพที่ 2-6 โครงสร้าง caffeine

2. ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

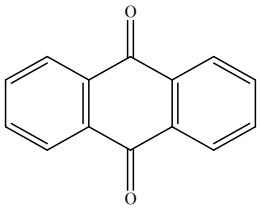
ฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบพอลิฟีนอล พบมากในธรรมชาติ มักพบเป็นเม็ดสี (pigments) ในส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยเฉพาะในดอกไม้ ในธรรมชาติจะพบฟลาโวนอยด์ทั้งในรูปอิสระ และ ในรูปกลัยโคไซด์ มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น C_6 - C_3 - C_6 ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย pyran ring จับกับ 3 carbon chain และ benzene ring ฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น rutin ใช้รักษา โรคเส้นเลือดฝอยเปราะ quercetin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านไวรัส



ภาพที่ 2-7 โครงสร้าง flavonoid skeleton

3. แอนทราควิโนน (anthaquinones)

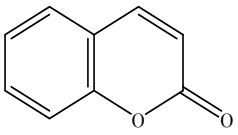
แอนทราควิโนน เป็นสารควิโนนที่พบมากที่สุด พบได้ทั้งในรูปเสรีและกลัยโคไซด์ มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 3-ring system นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบาย และยาถ่ายอย่างกว้างขวางโดยออกฤทธิ์เป็น stimulant cathartics นอกจากนี้ใช้เป็นสีย้อม และยารักษาเชื้อราที่ผิวหนัง



ภาพที่ 2-8 โครงสร้าง anthaquinones skeleton

4. คูมาริน (coumarins)

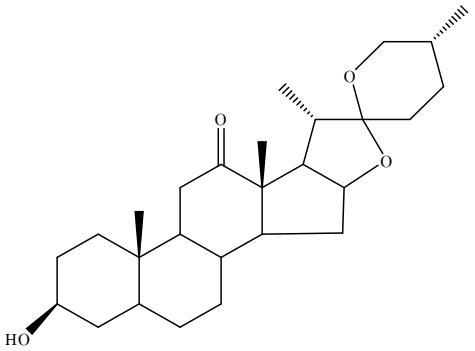
สารกลุ่มคูมาริน เป็นแลคโทนของ *o*-hydroxy cinnamic acid พบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปกลัยโคไซด์ สารที่ใช้ประโยชน์ทางยามักจะอยู่ในรูปของ aglycone อิสระ แต่อนุพันธ์ของ hydroxylated coumarins มักอยู่ในรูปของกลัยโคไซด์ สารกลุ่มคูมาริน ใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น santonin อดีตเป็นยาขับพยาธิ แต่ปัจจุบันไม่ใช้แล้วเพราะมีพิษ ส่วน aesculin ใช้เป็นยาบำรุงเลือด



ภาพที่ 2-9 โครงสร้าง coumarin

5. ซาโปนิน (saponins)

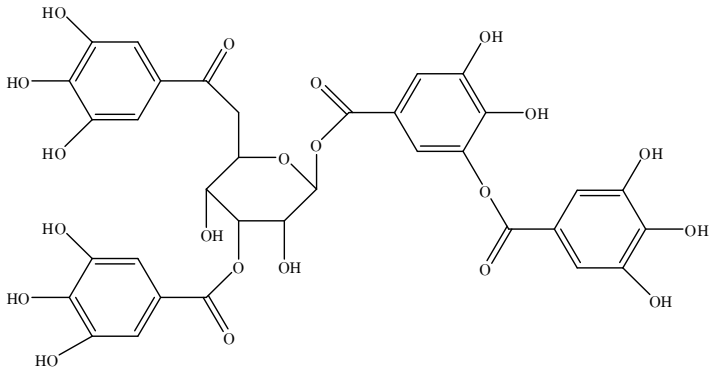
ซาโปนินกลัยโคไซด์หรือซาโปนิน เป็นกลัยโคไซด์ที่มีส่วน aglycone เป็นสารจำพวก steroids หรือ triterpenoids ซาโปนินกลัยโคไซด์ มีสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถเกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ ซาโปนินมีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นสารชะล้างแทนสบู่ได้ เป็นพิษต่อสัตว์เลือดเย็นจึงใช้เป็นสารเบื่อปลา ได้แก่ diosgenin, hecogenin



ภาพที่ 2-10 โครงสร้าง hecogenin

6. แทนนิน (tannins)

แทนนิน เป็นสารจำพวกพอลิฟีนอลิคที่มีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ และสลับซับซ้อน พบในพืชเกือบทุกชนิด ทั้งในรูปอิสระและรูปกลัยโคไซด์ ใช้เป็นยาฝาดสมาน เช่น tannic acid ใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยาแก้ท้องเสีย หรือใช้กับบาดแผลที่ผิวหนัง เพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น ตัวอย่างสารในกลุ่มแทนนิน ได้แก่ tannic acid, gallic acid, ellagic acid



ภาพที่ 2-11 โครงสร้าง tannic acid

7. เทอร์พีนอยด์ (terpenoids)

เทอร์พีนอยด์หรือเทอร์พีน (terpenes) เป็นสารทุติยภูมิที่สามารถพบได้มากที่สุดในธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยเล็กที่สุดเรียกว่า isoprene unit (C_5H_8) ซึ่งเป็น branch chain ของคาร์บอน 5 อะตอม และมีพันธะคู่ 2 ตำแหน่ง เมื่อแบ่งตามจำนวน isoprene unit ที่มาประกอบเป็นเทอร์พีนอยด์แต่ละชนิด สามารถแบ่งได้ ดังนี้

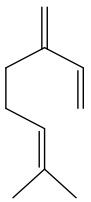
monoterpenes (C_{10}) เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืช

sesquiterpends (C_{15}) เป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืช

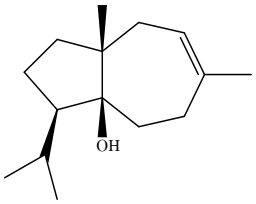
diterpenes (C_{20}) พบในพืช แมลงบางชนิด และในอวัยวะของสัตว์ต่าง ๆ

triterpenes (C_{30}) เป็นส่วนประกอบในยางไม้ cork และ cutin

tetraterpenes (C_{40}) ที่สำคัญ ได้แก่ carotenoids หลายชนิดซึ่งเป็นเม็ดสี สีเหลือง-ส้ม ใช้เป็นสารแต่งสีอาหาร ตัวอย่างสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ได้แก่



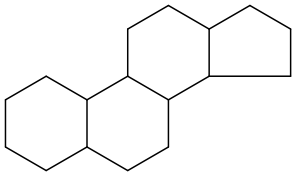
ภาพที่ 2-12 โครงสร้าง myrcene



ภาพที่ 2-13 โครงสร้าง carotol

8. สเตอร์รอยด์ (steroids)

สเตอร์รอยด์เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น cyclopentanoperhydrophenanthrene nucleus นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ รักษาโรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ ตลอดจนนำมาสังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยาคุมกำเนิดหลายชนิด



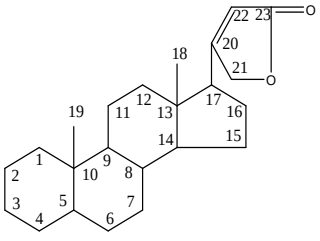
ภาพที่ 2-14 โครงสร้าง cyclopentanoperhydrophenanthrene nucleus

9. คาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ (cardiac glyosides)

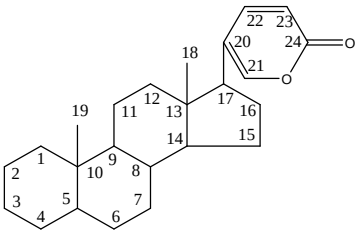
คาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ เป็นกลัยโคไซด์ออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อหัวใจ โดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ใช้รักษาโรคหัวใจวาย เมื่อแบ่งตาม aglycone จะแบ่งคาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ตามชนิดของ unsaturated lactone ring ที่ C-17 ได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

ชนิดที่ 1 คือ C_{23} cardenolide type เมื่อ lactone ring ที่ C-17 เป็นชนิด 5-membered unsaturated lactone ring ตัวอย่าง aglycone ในกลุ่มนี้ ได้แก่ digitoxigenin

ชนิดที่ 2 คือ C_{24} bufadienolide type เมื่อ lactone ring เป็นชนิด 6-membered unsaturated lactone ring ตัวอย่าง aglycone ในกลุ่มนี้ ได้แก่ scillarenin (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)



ภาพที่ 2-15 โครงสร้าง cardenolide



ภาพที่ 2-16 โครงสร้าง bufadienolide

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หมายถึง โมเลกุลของสารที่สามารถป้องกันหรือชลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังสารออกซิไดส์ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอมหรือโมเลกุล ทำให้ไม่เสถียรและสามารถไปจับกับอะตอมหรือโมเลกุลอื่นเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ เช่น อนุมูลไฮดรอกซี (hydroxyl radical) อนุมูลแอลคอกซี (alkoxy radical) และอนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide radical) อนุมูลอิสระเหล่านี้เกิดได้จากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ปัจจัยภายในร่างกาย เช่น การเผาผลาญอาหาร การหายใจ การออกกำลังกาย การติดเชื้อ และความเครียด ส่วนปัจจัยภายนอกร่างกาย เกิดจากอาหารที่เกิดการออกซิไดส์ในระหว่างกระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษา สารกันบูด ยาฆ่าแมลง แสงอัลตราไวโอเลต และมลพิษต่าง ๆ เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นสารที่ไม่เสถียร มีพลังงานสูง ทำให้เกิดการทำงานของเซลล์ผิดปกติ ร่างกายจึงเกิดโรคและพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น เกิดการอักเสบ ผนังหลอดเลือดแข็งตัว การทำลายเนื้อเยื่อ เกิดความชราและความเสื่อมของเซลล์

1. ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ

1.1 สารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป (general antioxidant) มีบทบาทสำคัญในการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้วกลายเป็นสารประกอบที่เฉื่อยต่อปฏิกิริยา

1.2 สารช่วยให้สารประกอบเพอร์ออกไซด์มีความคงตัว (peroxide stabilizer) มีบทบาทในการป้องกันหรือยับยั้งการสลายตัวของสารประกอบเพอร์ออกไซด์ไปเป็นอนุมูลอิสระ

1.3 สารเสริมฤทธิ์ (synergists) เป็นสารที่ไม่มีกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระ แต่มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น

1.4 สารคีเลต (chelating agent) ทำหน้าที่ในการจับกับโลหะที่เป็นตัวกระตุ้นให้สารประกอบเพอร์ออกไซด์สลายตัวไปเป็นอนุมูลอิสระ เมื่อสารคีเลตจับกับโลหะจะเกิดเป็นสารประกอบที่เฉื่อยต่อปฏิกิริยา ทำให้โลหะไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้

1.5 สารจับออกซิเจนซิงเกลต (singlet oxygen quencher) มีบทบาทในการเปลี่ยนซิงเกลตออกซิเจนหรือออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (singlet oxygen) ที่อยู่ในสถานะถูกกระตุ้นไปเป็นทริพเลตออกซิเจนหรือออกซิเจนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวสองตัว (triplet oxygen) ที่อยู่ในสถานะพื้นซึ่งมีความเสถียร (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557)

2. โรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โรคที่มีการยืนยันว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งของโรค และมีบทบาทสำคัญที่ทำให้โรคกำเริบมากขึ้น ได้แก่ โรคหัวใจและสมองขาดเลือด โรคความผิดปกติในระบบประสาท และโรคมะเร็ง

2.1 โรคหัวใจและสมองขาดเลือด

โรคหัวใจและสมองขาดเลือด มีสาเหตุมาจากหลอดเลือดแดงตีบตัวชั่วขณะ และกลับมีเลือดมาเลี้ยงใหม่ซึ่งทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจำนวนมาก อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นทำให้เนื้อเยื่อและเซลล์บาดเจ็บ เกิดกระบวนการอักเสบตลอดจนเกิดสารพิษ เช่น สารเปอร์ออกซีไนไตรท์ทำให้เซลล์ตาย ซึ่งจะทำให้เกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย และเซลล์สมองตาย

2.2 โรคความผิดปกติในระบบประสาท

โรคทางสมองและระบบประสาทที่สำคัญที่เป็นผลเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ และภาวะบีบคั้นจากการถูกออกซิไดซ์ ได้แก่

2.2.1 โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เกิดจากเซลล์ประสาทในสมองถูกทำลาย ทำให้ เซลล์ประสาทในสมองไม่สามารถทำงานสื่อประสาท รวมถึงมีการสร้างอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจน เป็นองค์ประกอบ ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ในสมอง ส่งผลให้เซลล์ประสาทตาย

2.2.1.1 โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) เกิดจากการตายของเซลล์ประสาท และการเกิด Lewy bodies ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทับถมในเซลล์ประสาท ทำให้รบกวนการส่งผ่านสารสื่อประสาท และยังพบว่าในเซลล์สมองบริเวณซับสแตนเชียไนกราของผู้ป่วยขาดกลูตาไทโอนซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการขาดกลูตาไทโอนทำให้เซลล์ประสาทตาย

2.2.1.2 โรคเอแอลเอส (Amytrophic lateral sclerosis) เกิดจากการตายของประสาทที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของผู้ป่วยมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส-1 บกพร่อง เมื่อเอนไซม์ไม่ทำงานทำให้มีปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออนจำนวนมาก ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ได้เป็นเปอร์ออกซิไนเตรทซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์

2.3 โรคมะเร็ง

กลไกสำคัญ 2 กลไก ที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง กลไกแรกคือ สารก่อมะเร็งทำให้มีการสร้างดีเอ็นเอและการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในการแบ่งตัวของเซลล์ กลไกที่สองคือ ความไม่สมดุลระหว่างการเติบโตและการตายของเซลล์ ซึ่งอนุมูลอิสระจะรบกวนการแสดงออกของยีนและเส้นทางการส่งสัญญาณ เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมะเร็ง (โอภา วัชระคุปต์, 2550)

การกำจัดและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (destruction and inhibition of microorganism)

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (prokaryote) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1-2 ไมโครเมตร มักจะอยู่เป็นกลุ่มเรียกโคโลนี เซลล์แบคทีเรียจะมีรูปร่างที่หลากหลาย เช่น กลม (coccus) ท่อน (bacillus) เกลียว (spiral) และแบคทีเรียที่มีรูปร่างไม่แน่นอนเรียกว่า พลีโอมอร์ฟิค (pleomorphic) ประกอบด้วยระยางค์ โครงสร้างห่อหุ้มเซลล์ และโพรโตพลาสซึม (วีรานุช หลาง, 2554)

การกำจัดเชื้อ การยับยั้งการเจริญของเชื้อและการทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ มีหลักการ 3 แบบใหญ่ ๆ คือ

1. วิธีการทางฟิสิกส์ (physical method) มีหลายวิธี คือ

1.1 การใช้ความร้อน (heat treatment) ความร้อนทำให้โปรตีนและส่วนประกอบภายในเซลล์ของจุลินทรีย์จับเป็นก้อน หรือตกตะกอนและเสียสภาพไปอย่างถาวร มี 2 วิธี คือ การใช้ความร้อนแห้ง เช่น การเผา การใช้ตู้อบไอร้อน และการใช้ความร้อนชื้น เช่น การพาสเจอร์ไรส์ การนึ่งด้วยความดันไอน้ำ การต้ม

1.2 การใช้รังสี (radiation) ทำให้กรดนิวคลีอิกและโปรตีนของจุลินทรีย์เสียสภาพ รังสีที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ รังสียูวี และรังสีแกมม่า

1.3 การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) ทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตก

1.4 การกรอง (filtration) ใช้แผ่นเยื่อกรองหรือกระดาษกรองที่มีรูพรุนเล็กกว่าจุลินทรีย์

1.5 การใช้ความเย็น (cold storage) ไม่มีผลในการฆ่าจุลินทรีย์ แต่เป็นการเก็บจุลินทรีย์ในตู้เย็น ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ เพราะเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไม่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นการยับยั้งเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ชั่วคราว

1.6 การใช้ความแห้งหรือการทำแห้ง (dehydration หรือ lyophilization) เป็นการดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยถูกทำให้เย็นจนถึงจุดเยือกแข็งอย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะสุญญากาศ

2. วิธีการทางเคมี (chemical method)

การใช้สารเคมีที่ทำลายจุลินทรีย์ได้ แบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะการใช้ คือ

2.1 disinfectant ใช้ทำลายเซลล์จุลินทรีย์ในสิ่งของที่ไม่มีชีวิต อาจจะเป็นเครื่องใช้ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ หากนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตจะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อได้ เช่น phenol, $HgCl_2$ เป็นต้น

2.2 antiseptic ใช้ทำลายจุลินทรีย์ซึ่งใช้กับเนื้อเยื่อ หรือผิวหนังได้โดยไม่เกิดอันตราย เช่น ethanol ด่างทับทิม ไอโอดีน เป็นต้น

3. การใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotics)

สารปฏิชีวนะ (antibiotics) สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ กลไกการออกฤทธิ์มีหลายแบบ เช่น ทำลายโปรตีน ทำลายกรดนิวคลีอิก แบ่งตามลักษณะการออกฤทธิ์ได้ 2 แบบ คือ

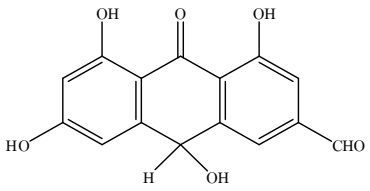
3.1 narrow spectrum antibiotics เป็นยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อจุลินทรีย์บางกลุ่มเท่านั้น เช่น ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ

3.2 broad spectrum antibiotics เป็นยาปฏิชีวนะที่มีผลทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด มีฤทธิ์กว้าง เช่น สามารถทำลายกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ แต่อาจไม่มีผลต่อเชื้อรา (จุรีรัตน์ ลีสมิทธิ์, 2552)

การศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้ chloramphenicol เป็นวิธีมาตรฐานที่นำมาใช้เปรียบเทียบกับการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของชุมเห็ดเทศ ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะประเภท broad spectrum antibiotics ทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด มีกลไกการออกฤทธิ์โดยยา chloramphenicol จะจับกับไรโบโซม และป้องกันการเชื่อมพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโน ทำให้หยุดการสังเคราะห์โปรตีน ออกฤทธิ์แบบยับยั้ง สามารถออกฤทธิ์กับแบคทีเรียได้กว้าง อาจมีผลข้างเคียงได้ เช่น โรคเลือดจางชนิด aplastic (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2555)

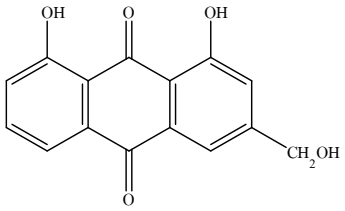
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hemlata and Kalidhar (1994) ได้สกัดสารจากลำต้นของชุมเห็ดเทศโดยใช้เมทานอลร้อน แล้วนำไปแยกด้วย column chromatography ชะด้วย ethyl acetate-benzene (1:9) ทำให้ได้สาร alarone (1)



ภาพที่ 2-17 โครงสร้าง alarone (1)

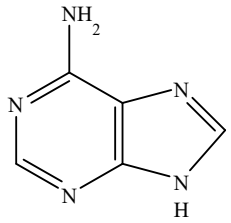
Hofilena, Ragasa, and Rideout (2000) ได้สกัดสารจากใบชุมเห็ดเทศโดยใช้ chloroform แล้วนำไปแยกด้วย silica gel chromatography ทำให้ได้สาร sterols คือ stigmasterol และ sitosterol สาร aloeemodin (2) ซึ่งพบว่า aloeemodin (2) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Trichophyton mentagrophytes* และ *Aspergillus niger*



ภาพที่ 2-18 โครงสร้าง aloeemodin (2)

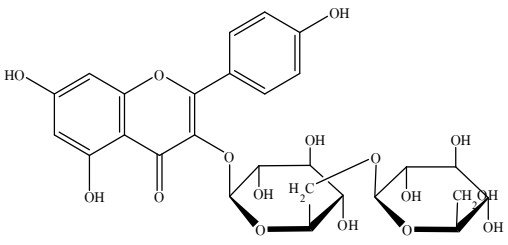
Khan, Kihara, and Omoloso (2001) ศึกษาสารสกัดจาก ใบ ดอก เปลือก ลำต้น และเปลือกราก ของชุมเห็ดเทศที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยใช้ ส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศทั้งหมด 4 ส่วน ใช้ soxhlet สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิดคือ เมทานอล ปิโตรเลียมอีเทอร์ ไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตด เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อราโดยวิธี disc diffusion พบว่าไม่มีสารสกัดที่ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ผ่านการทดสอบ แต่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียและโปรโตซัวทุกชนิดที่นำมาทดสอบ ซึ่งสารสกัดจากดอกชุมเห็ดเทศที่ใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ ดีที่สุด

Moriyama, Iizuka, Nagai, and Hoshi (2003) ได้สกัดสารจากใบชุมเห็ดเทศ โดยใช้ 50% ethanol แล้วนำมาแยกด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ triacontylsilyl silica (C_{30}) พบสาร adenine (3) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด



ภาพที่ 2-19 โครงสร้าง adenine (**3**)

Moriyama, Iizuka, Nagai, and Murata (2003) ได้นำใบแก่ ใบอ่อน ก้านใบ ลำต้น กลีบดอก กลีบเลี้ยง เมล็ด ของต้นชุมเห็ดเทศที่ผ่านการตากแดด และบดละเอียดแล้ว ไปสกัดด้วย 50% methanol โดยวิธีรีฟลักซ์ เมื่อผ่านกระบวนการแยกหลายขั้นตอน ทำได้ สาร kaempferol-3-*O*-gentiobioside (4) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoid glycoside พบในใบแก่มากที่สุด แต่ไม่พบในเมล็ด

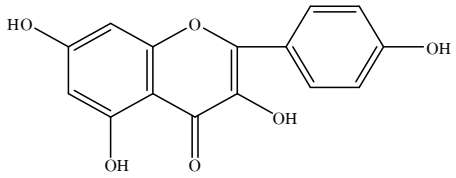


ภาพที่ 2-20 โครงสร้าง kaempferol-3-*O*-gentiobioside (4)

Somchit, Reezal, Elysha, and Mutalib (2003) ได้ศึกษา การสกัดสารจากชุมเห็ดเทศส่วนใบและเปลือก โดยใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายเพื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สกัดโดยใช้ soxhlet เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อได้สารสกัดหยาบแล้ว นำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา และแบคทีเรีย รวมทั้งเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียกับยาที่มีขายในทางเชิงพาณิชย์ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกัน (30µg/µL) สารสกัดจากเปลือกโดยใช้น้ำ มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida albicans* ได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกที่ใช้เอทานอล และพบว่ามีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้ยา Tioconazole แต่สารสกัดจากใบโดยใช้น้ำและเอทานอลไม่มีฤทธิ์ในการต้าน การเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida albicans* สารสกัดจากใบโดยใช้น้ำ มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบที่ใช้เอทานอล

แต่สารสกัดจากเปลือกโดยใช้น้ำและเอทานอลไม่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

Rahaman, Hasan, Ali, and Ali (2006) ได้ศึกษา การสกัดสารจากใบชุมเห็ดเทศโดยใช้ 80% เอทานอล ใช้เวลาในการแช่ 1 สัปดาห์ นำสารสกัดหยาบไปแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วหาโครงสร้างของสารโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่า ได้สาร 3,5,7,4-tetrahydroxy flavones (5)



ภาพที่ 2-21 โครงสร้าง 3,5,7,4-tetrahydroxy flavones (5)

Yakubu et al. (2010) ได้ทำการสกัดสารจากใบชุมเห็ดเทศโดยใช้ น้ำกลั่นเย็น สกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำสารสกัดไปตรวจคัดกรองสารพฤกษเคมี พบ saponins (1.22%), flavonoids (1.06%), cardiac glycosides (0.20%), cardenolides และ dienolides (0.18%), phenolics (0.44%) และalkaloids (0.52%) แต่ไม่พบ tannins, steroids, triterpenes และ anthraquinones เมื่อนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ทำให้เกิดการแท้งในหนูขาวได้ อย่างมีนัยสำคัญ

Sule et al. (2011) ศึกษา สมบัติด้านพฤษเคมี และฤทธิ์การต้านเชื้อราที่ก่อโรคต่อผิวหนังของสารสกัดหยาบจากเปลือกลำต้นชุมเห็ดเทศ ซึ่งสกัดด้วย soxhlet โดยใช้เอทานอล 96% พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ได้แก่ alkaloid, anthraquinone, flavonoid, saponin และtannin เมื่อนำสารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรคที่ผิวหนัง 4 สายพันธุ์ พบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Trichophyton verrucosum* และ *Epidermophyton floccosum* ได้ สูงที่สุดโดยมี inhibition zone เท่ากับ 21.00 mm และ20.05 mm ตามลำดับ

Timothy, Wazis, Adati, and Maspalma (2012) ศึกษาฤทธิ์การต้าน เชื้อราของสารสกัดหยาบจากใบชุมเห็ดเทศ สกัดโดยวิธีการแช่ ใช้น้ำและเอทานอล 95% เป็น ตัวทำละลาย แล้วนำไปเปรียบเทียบกับยา ketoconazole พบว่าสารสกัดหยาบที่ใช้น้ำ และเอทานอล 95% ให้ค่าการยับยั้งสูงกว่ายา ketoconazole อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในเชื้อ *Candida albican, Microsporum canis* และ *Trichophyton mentagrophyte*

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ และสารเคมี

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องปั่นอเนกประสงค์ ยี่ห้อ Sharp รุ่น EM-11, Japan

1.2 เครื่องระเหยสุญญากาศ ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-100, Switzerland

1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AB204-S, Switzerland

1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AG 245, Switzerland

1.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ยี่ห้อ Sturdy รุ่น SA-300VL, Taiwan

1.6 ตู้บ่มเพาะเชื้อ ยี่ห้อ Binder รุ่น BD240, Germany

1.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WNE 22, Germany

2. สารเคมี

2.1 Ethyl acetate ($C_4H_8O_2$) commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA

2.2 Methanol (CH_3OH) commercial grade บริษัท J. T. Baker, Germany

2.3 Dichloromethane (CH_2Cl_2) commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA

2.4 Ethyl alcohol (C_2H_5OH) commercial grade บริษัท J. T. Baker, Germany

2.5 Magnesium ribbon ยี่ห้อAjax Finechem, New Zealand

2.6 Hydrochloric acid (HCl) ยี่ห้อ QRëC AR grade, New Zealand

2.7 Ammonia (NH_3) ยี่ห้อ QRëC AR grade, New Zealand

2.8 Sodium hydroxide (NaOH) ยี่ห้อAjax Finechem, New Zealand

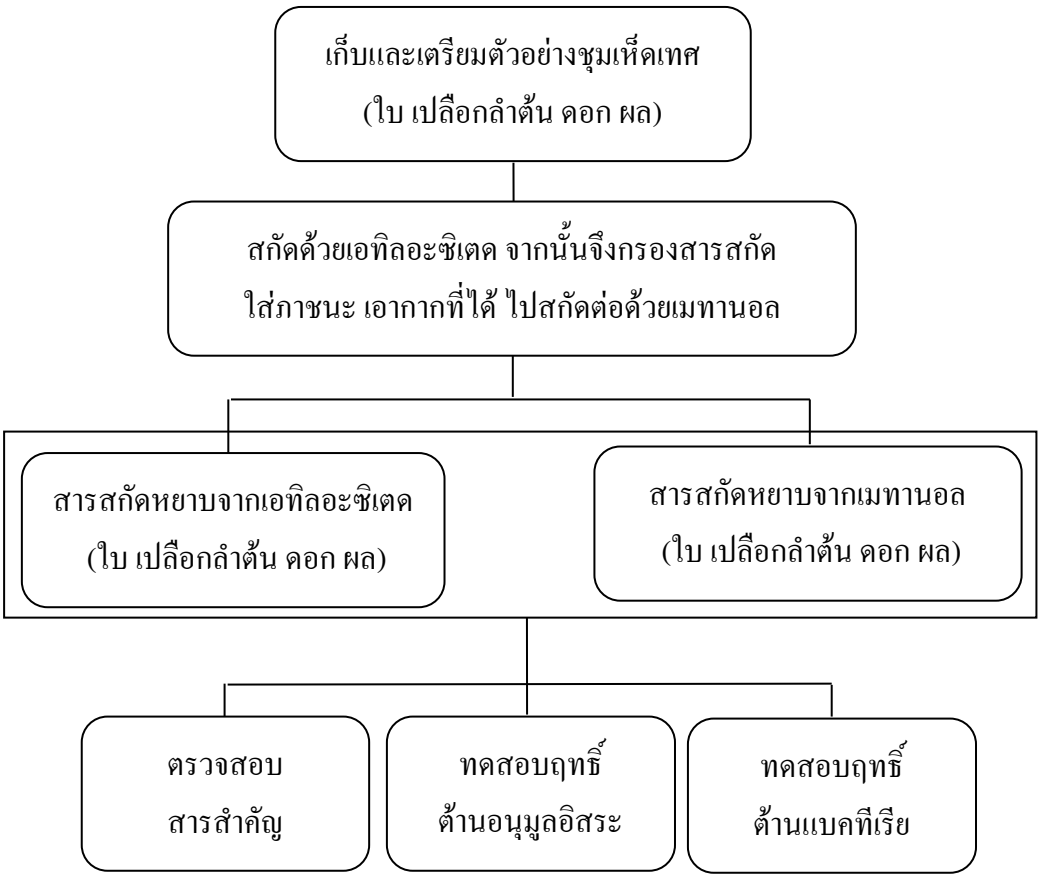
2.9 Iron (III) chloride ($FeCl_3$) ยี่ห้อAjax Finechem, New Zealand

2.10 Sulfuric acid (H_2SO_4) ยี่ห้อ QRëC AR grade, New Zealand

2.11 Glacial acetic acid (CH_3COOH) ยี่ห้อ QRëC AR grade, New Zealand

วิธีการวิจัย

ผู้วิจัยได้ทำการสกัดสารจากชุมเห็ดเทศจากส่วน ใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล ด้วยวิธีการแช่ โดยใช้เอทิลอะซิเตดเป็นตัวทำละลาย จากนั้นได้กรองสารสกัดแล้วนำไประเหยตัวทำละลายส่วนกาก ที่ได้นำไปสกัดต่อด้วยเมทานอล เมื่อระเหยตัวทำละลายแล้ว จะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 8 ส่วน ซึ่งนำไปทดสอบหาสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ส่งตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา แสดงแผนผังขั้นตอนการทำวิจัยได้ ดังนี้



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างชุมเห็ดเทศ

ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างชุมเห็ดเทศ (ใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล) จากพื้นที่ ตำบลระโนด อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา วันที่ 6 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558

2. วิธีสกัดสารจากชุมเห็ดเทศ

2.1 นำใบ ดอก ผล มาล้างน้ำให้สะอาด แล้วนำไปตากแดดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนลำต้น ล้างน้ำให้สะอาด ใช้มีดปอกเอาเฉพาะส่วนเปลือกลำต้น นำไปตากแดดเป็นเวลา 1 สัปดาห์

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 3-2 ส่วนต่าง ๆ ของพืชหลังจากตากแห้งแล้ว (ก) ใบ (ข) เปลือกลำตัน (ค) ดอก (ง) ผล

2.2 นำพืชที่แห้งแล้วไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นอเนกประสงค์

ภาพที่ 3-3 การปั่นชุมเห็ดเทศ

2.3 นำพืชแต่ละส่วนไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเตด ดังนี้

ขวดใบที่ 1 ใส่ใบ 200 กรัม เติมเอทิลอะซิเตด 1,000 มิลลิลิตร

ขวดใบที่ 2 ใส่เปลือกลำต้น 200 กรัม เติมเอทิลอะซิเตด 400 มิลลิลิตร

ขวดใบที่ 3 ใส่ดอก 100 กรัม เติมเอทิลอะซิเตด 400 มิลลิลิตร

ขวดใบที่ 4 ใส่ผล 100 กรัม เติมเอทิลอะซิเตด 400 มิลลิลิตร

สกัดสารโดยวิธีการแช่ เป็นเวลา 7 วัน แล้วกรอง นำของเหลวไประเหยตัวทำละลายออก ทำให้ได้สารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตดของพืชทั้ง 4 ส่วน

(ก)

(ข)

(ข)

(ง)

ภาพที่ 3-4 การสกัดสารด้วยเอทิลอะซิเตด (ก) ใบ (ข) เปลือกลำต้น (ค) ดอก (ง) ผล

2.4 นำกากที่ได้จากข้อ 3 ไปสกัดต่อ ด้วยเมทานอล ดังนี้

ขวดใบที่ 1 ใส่ใบ 200 กรัม เติมเมทานอล 1,000 มิลลิลิตร

ขวดใบที่ 2 ใส่เปลือกลำต้น 200 กรัม เติมเมทานอล 400 มิลลิลิตร

ขวดใบที่ 3 ใส่ดอก 100 กรัม เติมเมทานอล 400 มิลลิลิตร

ขวดใบที่ 4 ใส่ผล 100 กรัม เติมเมทานอล 400 มิลลิลิตร

สกัดสารโดยวิธีการแช่ เป็นเวลา 7 วัน แล้วกรอง นำของเหลวไประเหยตัวทำละลายออก ทำให้ได้สารสกัดหยาบจากเมทานอลของพืชทั้ง 4 ส่วน

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 3-5 การสกัดสารด้วยเมทานอล (ก) ใบ (ข) เปลือกลำต้น (ค) ดอก (ง) ผล

3. การตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น

ตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ดังนี้

3.1 การตรวจสอบ สารอัลคาลอยด์

เตรียมสารละลายแวกเนอร์ (Wagner's reagent) โดยการละลายไอโอดีน 2 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ 6 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1.5% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปอุ่นบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปหยดสารละลายแวกเนอร์ (Wagner's reagent) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีเหลือง

แสดงว่า พบอัลคาลอยด์

3.2 การตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย เอทานอลเข้มข้น 50% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรด ไฮโดรครอริกเข้มข้น จำนวน 5 หยด เขย่า แล้วไปอุ่นบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่า พบฟลาโวนอยด์

3.3 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (anthaquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย เข้มข้น 10% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้น แสดงว่าพบสารแอนทราควิโนน

3.4 การตรวจสอบคูมาริน (coumarins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลายเอทานอลเข้มข้น 50% ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง (filtrate) ไปเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 6 M ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบสารคูมาริน

3.5 การตรวจสอบซาโปนิน (saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง โดยการชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

3.6 การตรวจสอบแทนนิน (tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ เข้มข้น 1% จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำ หรือน้ำเงินดำ แสดงว่าพบสารแทนนิน

3.7 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า แล้วกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยระหว่างชั้นของสารสกัดกับ

กรดซัลฟิวริกแสดงว่า พบเทอร์พีนอยด์

3.8 การตรวจสอบสเตอรอยด์ (steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมละลายสารด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า แล้วกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรองค่อย ๆ เติมแกลเชียลอะซิติก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงิน หรือ น้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสารสเตอรอยด์

3.9 คาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ (cardiac glyosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า แล้ว กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ เข้มข้น 1% จำนวน 5 หยด เขย่า เติมแกลเชียลแอซิติกจำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบสารคาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ (Ayoola et al., 2008)

4. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารละลาย DPPH โดยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

4.1 การหาระบบตัวทำละลาย

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร ด้วยเทคนิค TLC โดยนำ ตัวทำละลายมาผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วนำไปใส่ใน Chamber ปิดฝาทิ้งไว้ให้อิ่มตัว จากนั้นแบ่งสารสกัดชุมเห็ดเทศออกมาเพียงเล็กน้อยใส่ใน Vial แล้วเติมตัวทำละลาย ทำการ Spot สารลงบนแผ่น TLC แล้วนำ แผ่น TLC ไปจุ่มลงใน Chamber ที่เตรียมไว้ ปิดฝา ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระดับที่กำหนดไว้ แล้วนำแผ่น TLC ออกมา รอจนแห้ง

4.2 ทดสอบด้วยสารละลาย DPPH

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารละลาย DPPH ในเมทานอล ที่มีความเข้มข้น 0.2 mM โดยการพ่นสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วงเข้มลงบนแผ่น TLC สังเกตตำแหน่งใดที่ปรากฏการฟอกจางสีบนพื้นสีม่วง แสดงว่าสารที่ตำแหน่งนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วงของ DPPH หายไป

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบของชุมเห็ดเทศไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้วิธี disc diffusion ส่งทดสอบที่ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 4
ผลการวิจัย

สารสกัดจากส่วน ใบ เปลือก ดอก และผลของชุมเห็ดเทศ

จากการนำชุมเห็ดเทศส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล มาทำการสกัดโดยวิธีแช่ด้วยตัวทำละลาย โดยใช้เอทิลอะซิเตดเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงกรองแล้วนำกากที่ได้ไปสกัดต่อด้วยเมทานอลเป็นเวลา 7 วัน นำสารสกัดแต่ละส่วนไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำให้ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 8 ชนิด โดยผลการสกัดที่ได้แสดงดังตารางที่ 4-1 จากตารางพบว่าในการสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของต้นชุมเห็ดเทศโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดแต่ละส่วน พบว่าสารสกัดที่ได้จากการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ให้ร้อยละการสกัดมากกว่าการใช้เอทิลอะซิเตด และเมื่อพิจารณาสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 2 พบว่า ส่วนที่ให้ปริมาณสารสกัดสูงที่สุด คือ ใบ

ตารางที่ 4-1 ลักษณะและปริมาณที่สกัดได้ (Yield) จากส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศ

ตัวทำละลายที่ใช้	ส่วนสกัดชุมเห็ดเทศ	ลักษณะส่วนสกัดชุมเห็ดเทศ	น้ำหนักสารสกัด (g)	ร้อยละการสกัด (%)
เอทิลอะซิเตด	ใบ	ของเหลวหนืดสีเขียว	12.5	6.25
	เปลือกลำต้น	ของเหลวหนืดสีเขียว	5.9	2.95
	ดอก	ของเหลวหนืดสีเหลือง	6.1	6.10
	ผล	ของเหลวหนืดสีเขียว	5.3	5.30
เมทานอล	ใบ	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแกมดำ	16.4	8.20
	เปลือกลำต้น	ของเหลวหนืดสีเหลือง	14.2	7.10
	ดอก	ของเหลวหนืดสีเหลือง	7.4	7.40
	ผล	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแกมดำ	6.2	6.20

การตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น

สารสกัดหยาบของชุมเห็ดเทศทั้ง 8 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบเพื่อหาสาระสำคัญทางพฤกษเคมี โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แอนทราควิโนน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอร์รอยด์ และ คาร์ดิแอก กลัยโคไซด์ พบว่า ชุมเห็ดเทศมีสารสำคัญทางพฤกษเคมีหลายชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์พบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล แอนทราควิโนนพบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล คูมารินพบได้ในส่วนใบ ดอก ผล ซาโปนินพบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล แทนนินพบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล เทอร์พีนอยด์พบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล สเตอร์รอยด์พบได้ในส่วนใบ ดอก ผล และคาร์ดิแอก กลัยโคไซด์พบได้ในส่วนเปลือกลำต้น แต่ไม่มีการตรวจพบอัลคาลอยด์ ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ผลการตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีจากสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศ

สารสำคัญทางพฤกษเคมี	สารสกัดจากเอทิลอะซิเตด				สารสกัดจากเมทานอล			
	ใบ	เปลือกลำต้น	ดอก	ผล	ใบ	เปลือกลำต้น	ดอก	ผล
อัลคาลอยด์	-	-	-	-	-	-	-	-
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	-	-	-	-
แอนทราควิโนน	-	-	-	-	+	+	+	+
คูมาริน	+	-	+	+	-	-	+	-
ซาโปนิน	+	+	+	+	+	+	+	+
แทนนิน	-	-	-	-	+	+	+	+
เทอร์พีนอยด์	+	+	+	+	+	+	+	+
สเตอร์รอยด์	+	-	+	+	-	-	-	-
คาร์ดิแอก กลัยโคไซด์	-	+	-	-	-	+	-	-

หมายเหตุ (-) Negative test, (+) Positive test

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารละลาย DPPH โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

นำสารสกัดหยาบของชุมเห็ดเทศทั้ง 8 ตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH ในเมทานอล ที่มีความเข้มข้น 0.2 mM แยกสารโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) สารสกัดจากเอทิลอะซิเตดใช้ เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 3: 1 เป็นเฟสเคลื่อน ส่วนสารสกัดจากเมทานอลใช้ เฮกเซน: เอทิลอะซิเตด เท่ากับ 5: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ หลังจากนั้นพ่นสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วงเข้มลงบนแผ่น TLC สังเกตตำแหน่งใดที่ปรากฏการฟอกจางสีบนพื้นสีม่วง แสดงว่าสารที่ตำแหน่งนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วงของ DPPH หายไป จากการทดลองพบว่า ทุกสารสกัดมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ผลการทดลองดังตาราง ที่ 4-3

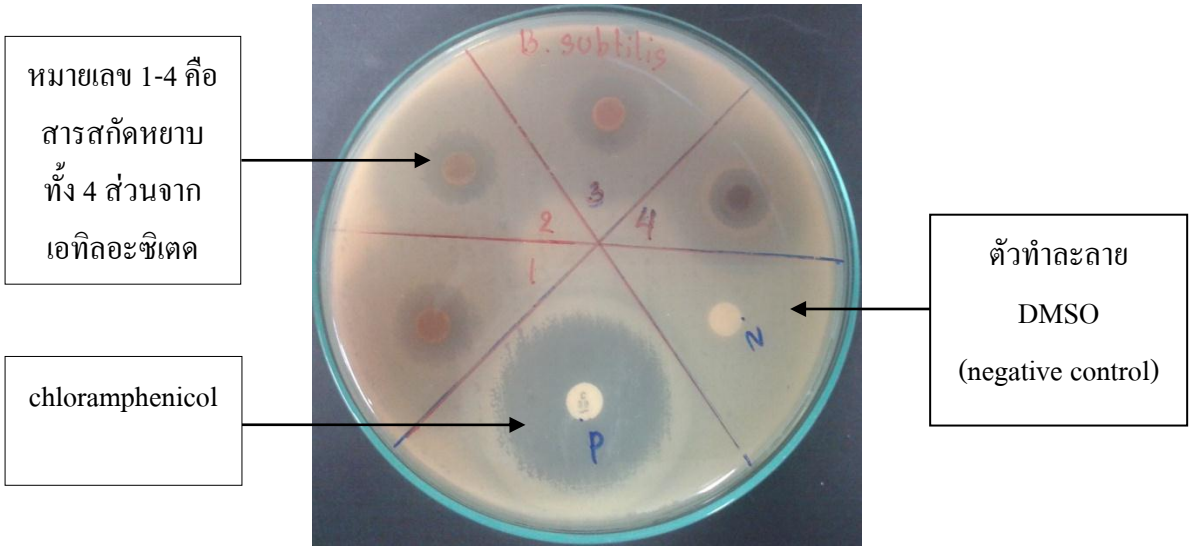
ตาราง 4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ตัวทำละลายที่ใช้	**ส่วนสกัดชุมเห็ดเทศ**	**การฟอกจางสี DPPH**
เอทิลอะซิเตด	ใบ	+
	เปลือกลำต้น	+
	ดอก	+
	ผล	+
เมทานอล	ใบ	+
	เปลือกลำต้น	+
	ดอก	+
	ผล	+

หมายเหตุ (-) Negative test, (+) Positive test

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบของชุมเห็ดเทศทั้ง 8 ตัวอย่าง ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion เทียบกับสารมาตรฐาน chloramphenicol และ DMSO ส่งทดสอบ
ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตัวอย่างดังภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 ตัวอย่างการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตดทั้ง 4 ส่วนของชุมเห็ดเทศ

จากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของชุมเห็ดเทศจำนวน 8 ตัวอย่าง ให้ผลดังตารางที่ 4-4 พบว่า สารสกัดหยาบจากชุมเห็ดเทศทั้ง 8 ตัวอย่างสามารถต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากดอกของชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* สูงที่สุด และสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากใบของชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* สูงที่สุด และมีเพียงสารสกัดเมทานอลจากดอกของชุมเห็ดเทศเท่านั้น ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยที่ยา chloramphenicol ไม่สามารถต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ไม่มีสารสกัดใดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli*

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากชุมเห็ดเทศ

แบคทีเรียทดสอบ	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร) ± SD*									
	สารสกัดจากเอทิลอะซิเตด				สารสกัดจากเมทานอล				chloram-phenicol (30 µg/disc)	DMSO
	ใบ	เปลือกลำต้น	ดอก	ผล	ใบ	เปลือกลำต้น	ดอก	ผล		
B. subtilis	13.0 ± 0.8	10.5 ± 0.8	15.0 ± 1.0	14.1 ± 0.7	6.8 ± 0.7	13.7 ± 0.8	5.5 ± 0.5	6.8 ± 0.2	26.9 ± 0.9	NZ
S. aureus	14.7 ± 1.2	11.2 ± 0.2	13.5 ± 1.0	14.2 ± 1.0	12.0 ± 1.0	12.0 ± 0.5	13.2 ± 0.5	13.3 ± 0.2	25.8 ± 1.4	NZ
E. coli	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	27.1 ±1.1	NZ
P .aeruginosa	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	8.1 ± 1.0	NZ	NZ	NZ

หมายเหตุ NZ หมายถึงไม่มี inhibition zone

* ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การสกัดสารจากใบ เปลือกลำต้น ดอก และผล ของชุมเห็ดเทศ โดยวิธีแช่ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตด เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงกรองแล้วนำกากที่ได้ไปสกัดต่อด้วยเมทานอลเป็นเวลา 7 วัน นำสารสกัดแต่ละส่วนไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำให้ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 8 ชนิด เพื่อนำไปศึกษาสารสำคัญทางพฤกษเคมี ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH และทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์คือ *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion สามารถสรุปได้ ดังนี้

1. ปริมาณสารสกัดหยาบส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล โดยใช้เอทิลอะซิเตด ให้ผลการสกัดคิดเป็นร้อยละ 6.25 2.95 6.10 และ 5.30 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ เมื่อใช้เมทานอลให้ผลการสกัด คิดเป็นร้อยละ 8.20 7.10 7.40 และ 6.20 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมทานอลซึ่งเป็น ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงให้ร้อยละผลการสกัดสูงกว่าเอทิลอะซิเตด ดังนั้นสารต่าง ๆ ที่อยู่ในชุมเห็ดเทศส่วนใหญ่น่าจะเป็นสารที่มีขั้วสูงด้วย

2. ผลการตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่า ชุมเห็ดเทศมีสารสำคัญทางพฤษเคมีหลายชนิด ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ พบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล แอนทราควิโนนพบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล คูมารินพบได้ในส่วน ใบ ดอก ผล ซาโปนินพบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล แทนนินพบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล เทอร์พีนอยด์พบได้ในส่วนใบ เปลือกลำต้น ดอก ผล สเตอร์รอยด์พบได้ในส่วนใบ ดอก ผล และคาร์ดิแอก กลัยโคไซด์พบได้ในส่วนเปลือกลำต้น แต่ไม่มีการตรวจพบอัลคาลอยด์ในทุกส่วนที่นำมาทดสอบ จากผลการทดลองที่พบ แอนทราควิโนน ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hemlata and Kalidhar (1994) และ Hofilena, Ragasa, and Rideout (2000) ซึ่งเป็นงานวิจัยที่พบ สารบริสุทธิ์ในกลุ่มแอนทราควิโนน และการตรวจพบฟลาโวนอยด์ในงานวิจัยนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Moriyama, Iizuka, Nagai, and Murata (2003) และ Rahaman, Hasan, Ali, and Ali (2006) ซึ่งเป็นงานวิจัยที่พบสารบริสุทธิ์ในกลุ่มฟลาโวนอยด์

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารละลาย DPPH พบว่าสารสกัดหยาบจากชุมเห็ดเทศทั้ง 8 ตัวอย่าง มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Panichayupakaranant and Kaewsuwan (2004) ซึ่งได้ทำการแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Bioassay-guided isolation พบว่าใบ ดอก และฝักของชุมเห็ดเทศมีสารต้านอนุมูลอิสระ

4. ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดหยาบจากชุมเห็ดเทศทั้ง 8 ตัวอย่าง สามารถต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากดอกของชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* สูงที่สุด และสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากใบ ชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* สูงที่สุด และมีเพียงสารสกัดเมทานอลจากดอกชุมเห็ดเทศเท่านั้นที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ โดยที่ยา chloramphenicol ไม่สามารถต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ แต่ไม่มีสารสกัดใดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากชุมเห็ดเทศสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Alam, Karim, and Khan (2009) ซึ่งได้ทำการสกัดสารจากใบและลำต้นของชุมเห็ดเทศแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบ 3 สายพันธุ์ พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae* แต่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella typhi* ได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สามารถยับยังเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

ข้อเสนอแนะ

1. ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay ซึ่งเป็นเพียงวิธีหนึ่งของการทดสอบเท่านั้น ดังนั้นจึงควรทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีอื่น ๆ ด้วยเพื่อเป็นการยืนยันผลอีกทางหนึ่ง

2. ควรศึกษาการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี เพื่อหาสารตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อ

3. ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดที่ใช้อาจมีความเข้มข้นน้อยเกินไป หากเพิ่มความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบอาจทำให้ได้ผลการยับยั้งที่ดีมากขึ้น

บรรณานุกรม

คณะกรรมการคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย. (2551). *ตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย เล่ม 1*. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

จุรีรัตน์ ลีสมิทธิ์. (2552). *ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โชติอนันต์ อินทุใสตระกูล, กุลกัลยา ชัยจรีนนท์, จิรวิชญ์ ฐิติโชติอนันต์ และวัฒเกะ ชาวสวน. (2551). *สมุนไพรไทยสำหรับงานสาธารณะสุขมูลฐาน*. กรุงเทพฯ: ดวงกมลพับลิชชิ่ง.

เต็ม สมิตินันท์. (2557). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: แสงเทียนการพิมพ์.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีรานุช หลาง. (2554). *จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริธร ศิริอมรพรรณ. (2557). *สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2555). *จุลชีววิทยาทางการแพทย์ แบคทีเรียก่อโรค*. กรุงเทพฯ: จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์.

อุดมการ อินทุใส และปาริชาติ ทะนานแก้ว. (2549). *สมุนไพรไทย ตำรับยา บำบัดโรค บำรุงร่างกาย*. กรุงเทพฯ: มติชน.

โอภา วัชระคุปต์. (2550). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996).

Alam, M. T., Karim, M. M., & Khan, N. (2009). Antibacterial activity of different organic Extracts of Achyranthes aspera and Cassia alata. *Journal of scientific research, 1*(2), 393-398.

Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya1, K., Ezennia1, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7*(3), 1019-1024.

Chomnawang, M. T., Surassmo, S., Nukoolkarn, V. S., & Gritsanapan, W. (2005). Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *Journal of Ethnopharmacology, 101,* 330-333.

Hemlata, A., & Kalidhar, S. (1994). Alarone, an anthrone from *Cassia alata*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section A*, *60*(6), 765-768.

Hofilena, J. G., Ragasa, C. Y., & Rideout, J. A. (2000). An Antimicrobial and Antimutagenic Anthraquinone from *Cassia alata. ACGC Chemical Research Communications, 10,* 15-20.

Khan, M. R., Kihara, M., & Omoloso, A. D. (2001). Antimicrobial activity of *Cassia alata*. *Fitoterapia, 72,* 561-564.

Moriyama, H., Iizuka, T., Nagai, M., & Hoshi, K. (2003). Adenine, an Inhibitor of Platelet Aggregation, from the Leaves of *Cassia alata. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26*(9), 1361-1364.

Moriyama, H., Iizuka, T., Nagai, M., & Murata, Y. (2003). HPLC quantification of kaempferol-3-*O*-gentiobioside in *Cassia alata*. *Fitoterapia, 74,* 425-430.

Panichayupakaranant, P., & Kaewsuwan, S. (2004). Bioassay-guided isolation from *Cassia alata* L. leaves. *Songklanakarin J. Sci. Technol., 26*(1), 104-107.

Rahaman, M. S., Hasan, A. J. M., Ali, M. Y., & Ali, M. U. (2006). A flavone from the leaves of *Cassia alata. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 41,* 93-96.

Somchit, M. N., Reezal, I., Elysha, I. N., & Mutalib, A. R. (2003). In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata. Journal of Ethnopharmacology, 84,* 1-4.

Sule, W. F., Okonko, I. O., Omo-Ogun, S., Nwanze, J. C., Ojezele, M. O., Ojezele, O. J., Alli, J. A., Soyemi, E. T., & Olaonipekun, T. O. (2011). Phytochemical properties and in vitro antifungal activity of *Senna alata* Linn. crude stem bark extract. *Journal of Medicinal Plants Research, 5*(2), 176-183.

Timothy, S. Y., Wazis, C. H., Adati, R. G., & Maspalma, I. D. (2012). Antifungal activity of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Cassia alata* Linn. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2*(7), 182-185.

Yakubu, M. T., Adeshina, A. O., Oladiji, A. T., Akanji, M. A., Oloyede, O. B., Jimoh, G. A., Olatinwo, A. W. O., & Afolayan, A. J. (2010). Abortifacient potential of aqueous extract of *Senna alata* leaves in rats. *Journal of Reproduction & Contraception, 21*(3), 163-177.

ภาคผนวก

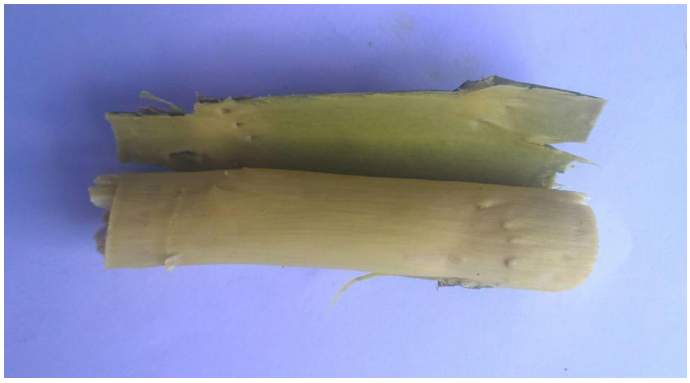
ภาคผนวก ก

รูปส่วนต่าง ๆ ของชุมเห็ดเทศ

ภาพที่ ก-1 ต้นชุมเห็ดเทศ

ภาพที่ ก-2 ต้นชุมเห็ดเทศ

ภาพที่ ก-3 ใบชุมเห็ดเทศ (หน้าใบ-หลังใบ)



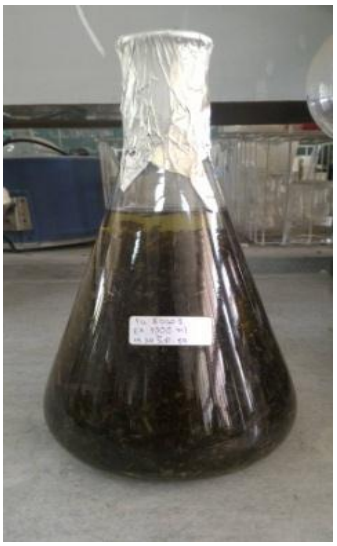
ภาพที่ ก-4 เปลือกลำต้นชุมเห็ดเทศ

ภาพที่ ก-5 ดอกชุมเห็ดเทศ

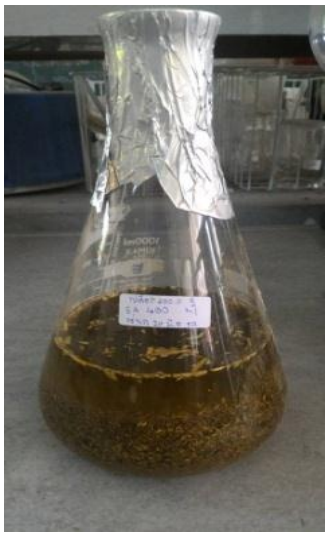
ภาพที่ ก-6 ผลชุมเห็ดเทศ

ภาคผนวก ข

การสกัดชุมเห็ดเทศด้วยวิธีการแช่



ภาพที่ ข-1 การสกัดสารจากใบด้วยเอทิลอะซิเตด



ภาพที่ ข-2 การสกัดสารจากเปลือกลำต้นด้วยเอทิลอะซิเตด

ภาพที่ ข-3 การสกัดสารจากดอกด้วยเอทิลอะซิเตด

ภาพที่ ข-4 การสกัดสารจากผลด้วยเอทิลอะซิเตด

ภาพที่ ข-5 การสกัดสารจากใบด้วยเมทานอล

ภาพที่ ข-6 การสกัดสารจากเปลือกลำต้นด้วยเมทานอล

ภาพที่ ข-7 การสกัดสารจากดอกด้วยเมทานอล

ภาพที่ ข-8 การสกัดสารจากผลด้วยเมทานอล

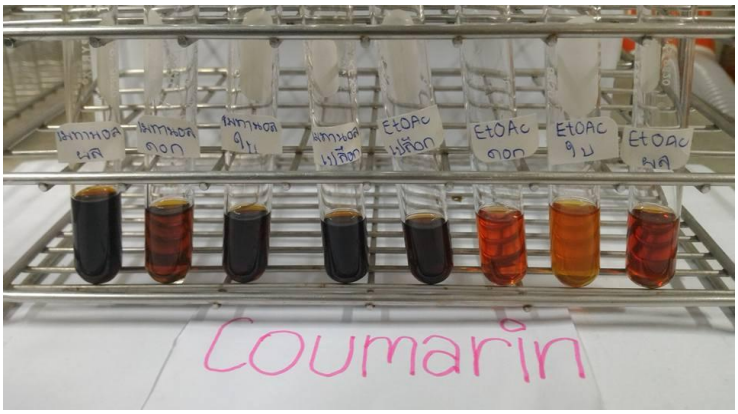
ภาคผนวก ค

การตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น

ภาพที่ ค-1 การตรวจสอบสารอัลคาลอยด์

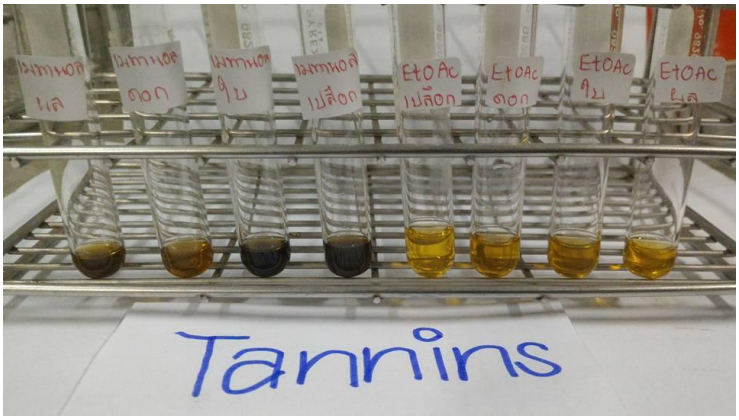
ภาพที่ ค-2 การตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์

ภาพที่ ค-3 การตรวจสอบสารแอนทราควิโนน

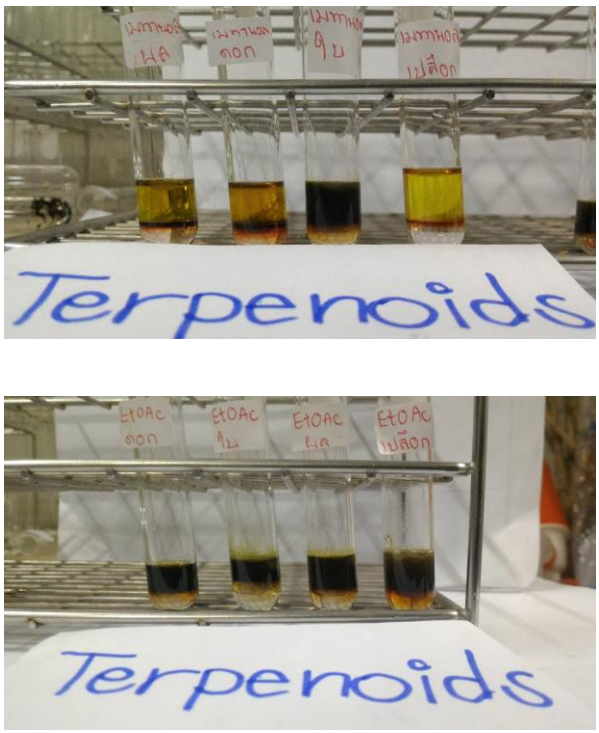


ภาพที่ ค-4 การตรวจสอบสารคูมาริน

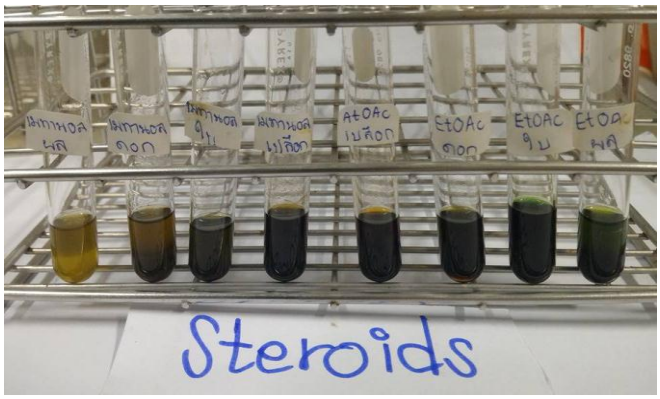
ภาพที่ ค-5 การตรวจสอบสารซาโปนิน



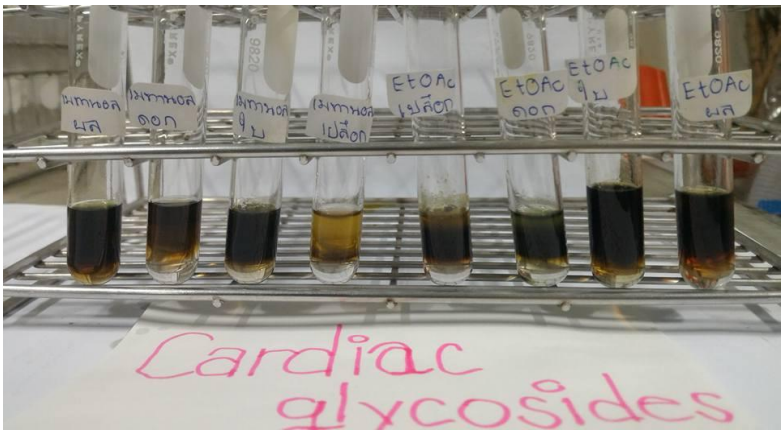
ภาพที่ ค-6 การตรวจสอบสารแทนนิน



ภาพที่ ค-7 การตรวจสอบสารเทอร์พีนอยด์



ภาพที่ ค-8 การตรวจสอบสารสเตอรอยด์

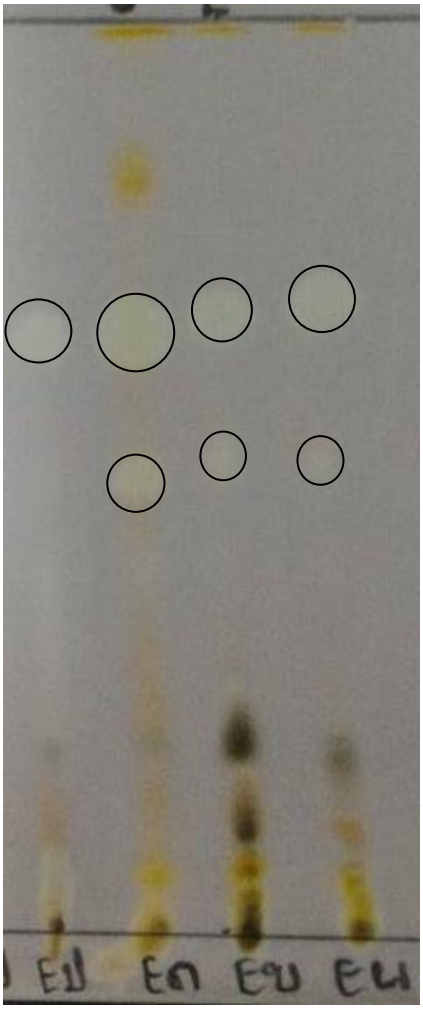


ภาพที่ ค-9 การตรวจสอบสารคาร์ดิแอก กลัยโคไซด์

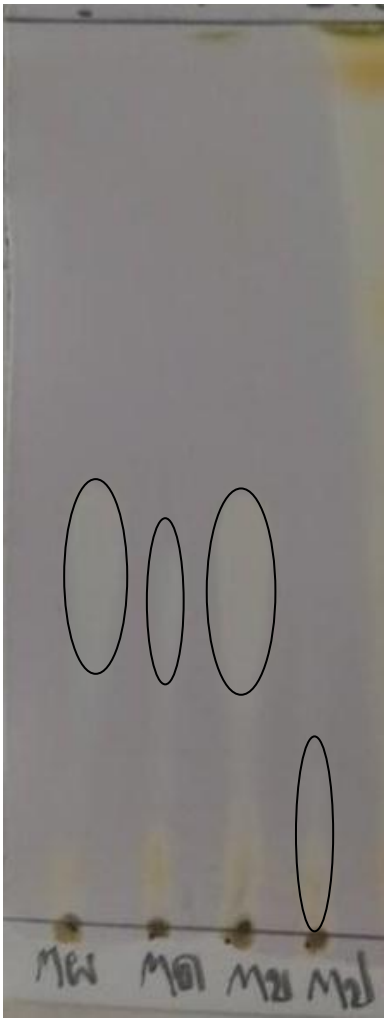
ภาคผนวก ง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารละลาย DPPH

โดยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแผ่นบาง



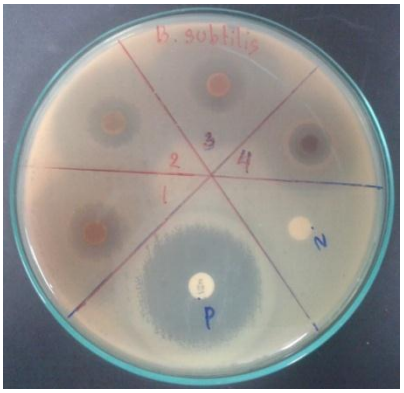
ภาพที่ ง-1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด
โดยใช้ เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน
เท่ากับ 3: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่



ภาพที่ ง-2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ของสารสกัดจากเมทานอล
โดยใช้ เฮกเซน: เอทิลอะซิเตด
เท่ากับ 5: 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่

ภาคผนวก จ

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย



ภาพที่ จ-1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด

1: สารสกัดจากผล

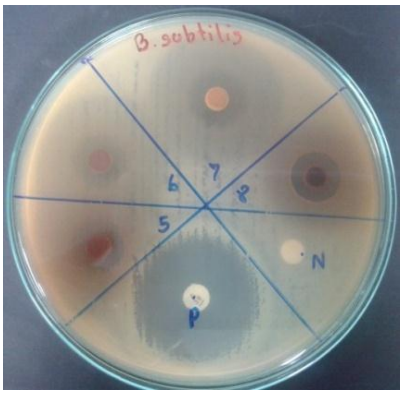
2: สารสกัดจากใบ

3: สารสกัดจากดอก

4: สารสกัดจากเปลือกลำต้น

P: ยา chloramphenicol (positive control)

N: DMSO (negative control)



ภาพที่ จ-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* ของสารสกัดจากเมทานอล

5: สารสกัดจากผล

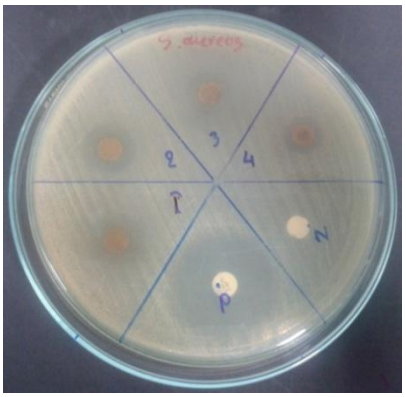
6: สารสกัดจากใบ

7: สารสกัดจากดอก

8: สารสกัดจากเปลือกลำต้น

P: ยา chloramphenicol (positive control)

N: DMSO (negative control)



ภาพที่ จ-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด

1: สารสกัดจากผลด้วย

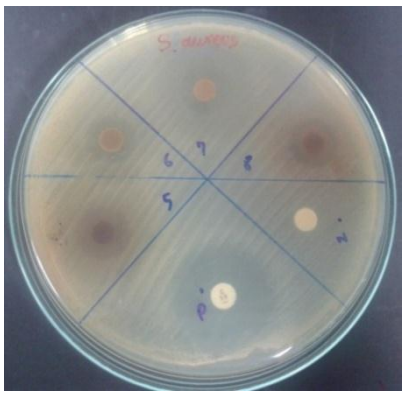
2: สารสกัดจากใบด้วย

3: สารสกัดจากดอก

4: สารสกัดจากเปลือกลำต้น

P: ยา chloramphenicol (positive control)

N: DMSO (negative control)



ภาพที่ จ-4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดจากเมทานอล

5: สารสกัดจากผล

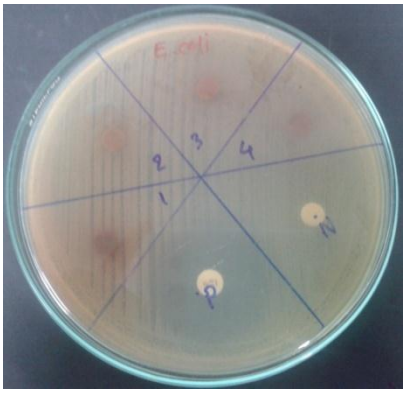
6: สารสกัดจากใบ

7: สารสกัดจากดอก

8: สารสกัดจากเปลือกลำต้น

P: ยา chloramphenicol (positive control)

N: DMSO (negative control)



ภาพที่ จ-5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด

1: สารสกัดจากผล

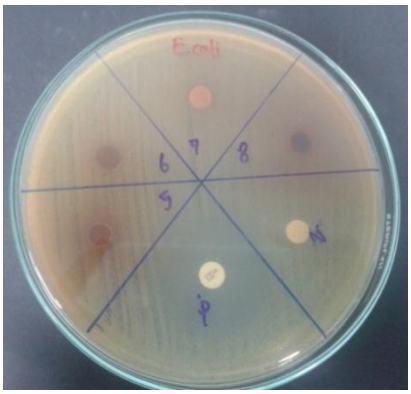
2: สารสกัดจากใบ

3: สารสกัดจากดอก

4: สารสกัดจากเปลือกลำต้น

P: ยา chloramphenicol (positive control)

N: DMSO (negative control)



ภาพที่ จ-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ของสารสกัดจากเมทานอล

5: สารสกัดจากผล

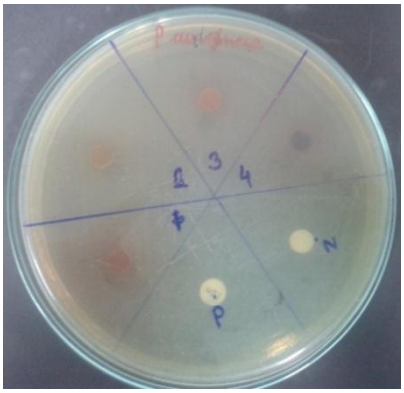
6: สารสกัดจากใบ

7: สารสกัดจากดอก

8: สารสกัดจากเปลือกลำต้น

P: ยา chloramphenicol (positive control)

N: DMSO (negative control)



ภาพที่ จ-7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัดจากเอทิลอะซิเตด

1: สารสกัดจากผล

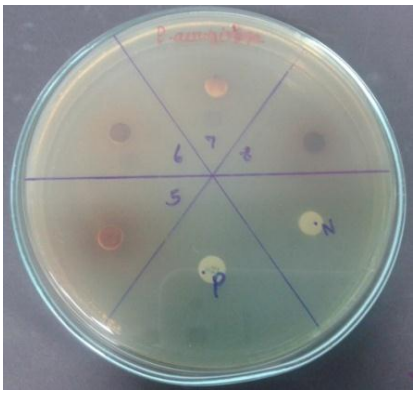
2: สารสกัดจากใบ

3: สารสกัดจากดอก

4: สารสกัดจากเปลือกลำต้น

P: ยา chloramphenicol (positive control)

N: DMSO (negative control)



ภาพที่ จ-8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารสกัดจากเมทานอล

5: สารสกัดจากผล

6: สารสกัดจากใบ

7: สารสกัดจากดอก

8: สารสกัดจากเปลือกลำต้น

P: ยา chloramphenicol (positive control)

N: DMSO (negative control)