ศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

The potential of *Siphonodon celastrineus* Griff, traditional medicinal plants of Thailand for treatment from local wisdom knowledge lead to the development of sustainable use

อุดมเดชา พลเยี่ยม
นิภาพร ปัญญา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายจ่าย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ชื่อเรื่อง : ศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

ผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุดมเดชา พลเยี่ยม และ อาจารย์นิภาพร ปัญญา
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะดูกเพื่อสร้างความเชื่อมั่นในการนำมะดูกไปใช้ประโยชน์ทางยาสมุนไพร โดยนำเปลือก ใบ และผลของมะดูกมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ประกอบด้วย เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และ เมทานอล ตามลำดับความมีขั้วจากต่ำไปสูง จะได้สารสกัดทั้งหมด 9 ชนิด นำสารสกัดมาตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu method และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ ผลการวิจัยพบว่า

1. สารสกัดจากผลของมะดูกชั้นเมทานอลแสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุด มีค่า EC_{50}เท่ากับ 31 μg/ml ส่วนการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลrพบว่าสารสกัดจากผลของมะดูกชั้นเมทานอลมีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือ มีค่า 95.23 mg GAE/g dw

2. สารสกัดจากเปลือกของมะดูกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 μg/ml สารสกัดจากใบของมะดูกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml และสารสกัดจากใบของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml และ สารสกัดจากผลของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 μg/ml

Title : **The potential of *Siphonodon celastrineus* Griff, traditional medicinal plants of Thailand for treatment from local wisdom knowledge lead to the development of sustainable use**

Researcher : Udomdeja Polyium (M.Sc) and Niphaporn Panya (M.Eng)
Faculty of Science and Technology
Rajamangala University of Technology Phra Nakorn

ABSTRACT

The research project on The potential of *Siphonodon celastrineus* Griff, traditional medicinal plants of Thailand for treatment from local wisdom knowledge lead to the development of sustainable use, with the objective of studying the botanical, phytochemical, and biological activity of the *Siphonodon celastrineus* to create confidence in the use of *S. celastrineus* in herbal medicine by using the bark, leaves and fruit of the *S. celastrineus* to extract with 3 types of solvents. Each of hexane, ethyl acetate, and methanol, respectively, from low to high polarity. All nine extracts will be extracted. Preliminary examinations for phytochemistry, Antioxidant activity by DPPH radical scavenging assay and quantitative determination of phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method and antimicrobial activity were tested. The research found that.

1. The extract of the results of the methanol layer of the *S.celastrineus* shows a reduction in the amount of 1,1-diphenol-2-picrylhydrazyl (DPPH) had the highest EC_{50} equal to 31 mg/ml. The amount of phenol compounds found that the extracts from the methanol extract of *S. celastrineus* contain the amount of phenol. The highest concentration of 95.23 mg GAE / g dw

2. Extract from the bark of the *S. celastrineus* with methanol showed the best inhibition of the growth of *Vibrio paraheamolyticus* with the MIC value of 15.60 mg/ml. The extracts of the *S. celastrineus* leaf extracts with hexane showed the best inhibition of the growth of *Vibrio cholerae* with the MIC value equal to 31.25 mg/ml and leaf extracts with ethyl acetate showed the best inhibitory effect on the growth of *Vibrio cholerae* with a MIC value of 31.25 mg/ml and the extract of the fruit with ethyl acetate to inhibit the growth of *Vibrio paraheamolyticus* most with MIC equal to 15.60 mg/ml.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณรายจ่าย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยและอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการสำหรับการทดลองเป็นอย่างดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบบูชาแด่คณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้แก่คณะผู้วิจัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV

บทที่ 1 บทนำ **1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย 3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **5**
2.1 พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน 6
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร 11
2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร 14
2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร 22
2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร 24
2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร 31
2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 37
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 38

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง **41**
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 42
3.2 พืชและจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย 43
3.3 วิธีการทดลอง 45
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 48
3.5 ระยะเวลาการทดลอง 48
3.6 สถานที่ทำการทดลอง 48

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4. ผลการทดลอง **49**
4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี 50
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน 51
4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 53

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 56
5.1 สรุปผลการทดลอง 56
5.2 อภิปรายผล 58
5.3 ข้อเสนอแนะ 58

บรรณานุกรม **59**

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

การศึกษาทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านเป็นการบูรณาการความรู้ด้านพฤกษศาสตร์และด้านมานุษยวิทยา เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างมนุษย์กับพืช โดยเน้นที่การนำพืชสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ในด้านยารักษาโรค ของปราชญ์พื้นบ้านตามชุมชนท้องถิ่นต่าง ๆ โดยการรวบรวมความรู้จากหมอพื้นบ้าน การใช้ในชุมชน (field work) และการศึกษาจากเอกสาร (literature search)เกี่ยวกับรายละเอียดของพืชสมุนไพรในท้องถิ่นแต่ละชนิด ได้แก่ ชื่อท้องถิ่นของสมุนไพร สรรพคุณ การเตรียมยาสมุนไพรและวิธีการใช้รักษา การศึกษาด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและพัฒนายาสมุนไพรพื้นบ้านแผนโบราณเป็นงานวิจัยที่ศึกษาการออกฤทธิ์โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานพืช พร้อมกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆตามตำหรับยาที่ค้นพบเพื่อนำมาใช้ประโยชน์จากฤทธิ์ทางชีวภาพโดยตรง หรือนำมาเป็นโครงสร้างต้นแบบเพื่อทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นอีก หรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นที่แตกต่างไปจากเดิม หรือนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารชนิดอื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรมประเทศไทยจึงได้รับประโยชน์จากการวิจัยด้านนี้เป็นอย่างยิ่งเนื่องจากเป็นประเทศมีลักษณะทางภูมิศาสตร์ตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อนจึงส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) ในภูมิภาคของประเทศ

ประกอบกับยุทธศาสตร์การวิจัยตามนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559) ให้ความสำคัญกับการสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางสังคม โดยมีกลยุทธ์การวิจัยเพื่อพัฒนาและการคุ้มครองภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน การแพทย์ทางเลือก และสมุนไพร เน้นแผนงานวิจัยเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน และการแพทย์ทางเลือก เพื่อสร้างองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่นและการคุ้มครองภูมิปัญญาและการวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข อีกทั้งยุทธศาสตร์การวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย พ.ศ. 2556-2559 ให้ความสำคัญกับการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่สามารถนำไปสู่การเป็นผลิตภัณฑ์น้ำมันสมุนไพร ยาสมุนไพร เครื่องดื่มสมุนไพร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสมุนไพร และเครื่องสำอางสมุนไพร การวิจัยและการพัฒนาสมุนไพรไทย และสารสมุนไพรไทยเพื่อพัฒนาเป็นยา ทั้งในรูปแบบยาแผนไทย ยาแผนปัจจุบัน และยาสาหรับสัตว์ การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพในการใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยเฉพาะกลุ่มที่มีผลทางโภชนาการ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในลักษณะต่างๆ และ การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีศักยภาพเป็นเครื่องสำอางหรือส่วนประกอบของเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์สปา (ยุทธศาสตร์การวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย พ.ศ. 2556 – 2559)

จากการวิเคราะห์สถานการณ์การใช้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรพบว่า ด้านยาสมุนไพร จากข้อมูลสภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย (กลุ่มสมุนไพร) ปี พศ.2554 มูลค่าการตลาดยาจากสมุนไพรในประเทศ ประมาณ 8000 ล้านบาท ไม่รวมมูลค่ายาจากสมุนไพรในสถานบริการสาธารณสุขของรัฐ (ข้อมูลจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยามีมูลค่า 1,000 ล้านบาท) ส่วนการนำเข้าและส่งออกยาสมุนไพรมีมูลค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ประมาณ 200-300 ล้านบาท

ด้านเครื่องสำอาง จากข้อมูลจากสมาคมผู้ผลิตเครื่องสำอางไทย ปี พ.ศ.2544 ประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางคิดเป็นมูลค่า 140,000 ล้านบาท (ข้อมูลจากศูนย์วิจัย ธนาคารกสิกรไทย รายงาน ประมาณ 90,000 ล้านบาท) ซึ่งต้องนำเข้าวัตถุดิบจากต่างประเทศราวร้อยละ 90 ของการผลิต โดยเป็นวัตถุดิบสารสกัดสมุนไพร 20,000-30,000 ล้านบาท (จากยุโรปเป็นส่วนใหญ่) และเป็นสมุนไพรที่สามารถปลูกและแปรรูปได้ในประเทศไทย ด้านอาหารเสริม จากข้อมูลสมาพันธ์สุขภาพและความงาม ปี พศ.2554 ประมาณมูลค่าอาหารเสริมสุขภาพตลาดในประเทศ 80,000 ล้านบาท โดยต้องนำเข้าวัตถุดิบสารสกัดจากสมุนไพรคิดเป็นมูลค่า 20,000 ล้านบาท (แผนยุทธศาสตร์การพัฒนาสมุนไพรไทย : สมุนไพรไทย--สินค้าโลก พ.ศ. 2556-2560 การพัฒนาสมุนไพรไทยสู่ผลิตภัณฑ์สร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก)

ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคจากองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นพัฒนาไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน จึงเป็นประเด็นการวิจัยที่สำคัญที่ต้องทำการศึกษาเพื่อเป็นการสืบทอดภูมิปัญญาท้องถิ่น การสนับสนุนการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพอย่างยั่งยืน และเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพของพืชสมุนไพรในประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาข้อมูลทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านและตำรับยาตามภูมิปัญญาท้องถิ่นในการใช้มะดูกเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน

1.2.2 ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะดูก เพื่อต่อยอดองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่น และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคในการนำมะดูกไปใช้ประโยชน์ทางยาสมุนไพร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ทำการศึกษาจากพืชตัวอย่างในพื้นที่ของจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กำหนดขอบเขตการวิจัยดังนี้

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาคือมะดูก (*Siphonodon celastrineus* Griff)

2. ส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

3.1 เปลือก

3.2 ใบ

3.3 ผล

3. องค์ประกอบทางพฤกษเคมี
    3.1 Alkaloids
    3.2 Condensed
    3.3 Tannins
    3.4 Phenolic compounds
    3.5 Triterpenes
    3.6 Steroids
    3.7 Cardiac glycosides
    3.8 Antraquinones

4. ฤทธิ์ทางชีวภาพ
    4.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ
    4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน
        - การทดสอบกับ สาร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
        - การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอล(Folin-Ciocalteu’s reagent)

5. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด
    5.1 เฮกเซน
    5.2 เอทิลแอซิเตต
    5.3 เมทานอล

1.4 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

ตัวแปรอิสระ

มะดูกกับภูมิปัญญาท้องถิ่น

↓

ตัวแปรตาม

1. ศึกษาข้อมูลทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านและตำรับยาตามภูมิปัญญาท้องถิ่นในการใช้มะดูกเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน
2. ศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของมะดูก เพื่อต่อยอดองค์ความรู้จากภูมิปัญญาท้องถิ่น และสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคในการนำมะดูกไปใช้ประโยชน์ทางยาสมุนไพร

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของวัมะดูก

2. การส่งเสริมและสร้างความตระหนักถึงคุณค่าของพืชสมุนไพรในท้องถิ่นเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างและการอนุรักษ์ทรัพยากรอย่างยั่งยืน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนคณะผู้วิจัยทำการศึกษาเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.1 พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน
2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร
2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร
2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร
2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร
2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

2.1.1 ความเป็นมาพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

มนุษย์เกี่ยวข้องกับพืชพรรณตั้งแต่เริ่มวิวัฒนาการของมนุษยชาติ ปัจจัยสี่อันจำเป็นต่อการดำรงชีพของมนุษย์คือ อาหาร เครื่องนุ่งห่ม ที่อยู่อาศัย และยารักษาโรค ได้จากพืชเป็นส่วนใหญ่ มนุษย์นำพืชมาใช้ประโยชน์หลายรูปแบบ แตกต่างกันไปตามสภาพสิ่งแวดล้อม และวัฒนธรรมของกลุ่มชนแต่ละท้องถิ่น นอกจากการใช้ประโยชน์พืชโดยตรงแล้ว มนุษย์ยังนำพืชมาใช้ทางด้านพิธีกรรมทางศาสนา ความเชื่อถือโชคลาง งานนักขัตฤกษ์ ฯลฯ หรือนำมาใช้ในงานหัตถกรรมพื้นบ้าน การใช้ประโยชน์พืชดังกล่าว ได้ถ่ายทอดต่อกันมาจากบรรพชนหลายรุ่น จนกลายเป็นความรู้ หรือภูมิปัญญาชาวบ้าน หรือภูมิปัญญาพื้นบ้าน (traditional knowledge หรือ folk knowledge) ซึ่งเป็นวัฒนธรรมพื้นบ้านแบบหนึ่ง ของกลุ่มชนท้องถิ่น ภูมิปัญญาพื้นบ้านส่วนใหญ่ ได้จากการบอกเล่าจากชนรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง ความรู้เหล่านี้เกิดจากประสบการณ์ และการลองแบบถูก-ผิด ที่ได้สั่งสมติดต่อกันมาเป็นเวลานาน แต่การจดบันทึกภูมิปัญญาพื้นบ้านไว้เป็นหลักฐาน ยังมีปรากฏอยู่น้อยมาก นอกจากคำบอกเล่า จากความทรงจำของกลุ่มชนพื้นบ้าน ดังนั้นการถ่ายทอดความรู้ และวัฒนธรรมพื้นบ้าน จึงขาดตอน หรือขาดตกบกพร่องขึ้นได้ง่ายในกลุ่มชนพื้นบ้าน โดยเฉพาะในชุมชนที่มีการพัฒนา โดยวัฒนธรรมเมืองหลั่งไหลเข้ามามีบทบาทแทนวัฒนธรรมพื้นบ้าน ที่นับวันจะเสื่อมสูญไป

ในยุคโลกาภิวัฒน์ วัฒนธรรม และความรู้พื้นบ้าน ในการใช้ประโยชน์พืช ที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษ ยังคงเหลืออยู่บ้าง ตามกลุ่มชนพื้นบ้าน ในพื้นที่ทุรกันดารห่างไกลจากสังคมเมือง กลุ่มชนหลายแห่ง มีความผูกพันกับพืชมานาน จนกลายเป็นเอกลักษณ์ของกลุ่มตน ดังเช่น วัฒนธรรมการบริโภคข้าวเหนียวทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การบริโภคพืชผัก จำพวกสะตอและลูกเนียงทางภาคใต้ การผลิต เครื่องดนตรีประเภทเป่าที่เรียกว่า "แคน" ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การผลิตเครื่องเขินของจังหวัดเชียงใหม่ การผลิตกระเป๋าย่านลิเภาของจังหวัดนครศรีธรรมราช ฯลฯ การผลิตดังกล่าว ได้พัฒนามาจากความรู้ และหัตถกรรมพื้นบ้านของกลุ่มชนในสังคมชนบท ดังนั้นเราสามารถสืบสาวเรื่องราวความเป็นมาของกลุ่มชนโบราณ และกลุ่มชนพื้นบ้าน แต่ละยุคแต่ละสมัยได้ โดยอาศัยความเกี่ยวข้องของพืชพรรณ ในวิถีชีวิตความเป็นอยู่ของกลุ่มชนพื้นบ้าน ในปัจจุบันนักวิชาการได้ตระหนักถึงความสำคัญ และความจำเป็นในการอนุรักษ์ภูมิปัญญาพื้นบ้านไม่ให้เสื่อมสูญไป จึง เริ่มงานค้นคว้าวิจัย จดบันทึกความรู้ ในการใช้ประโยชน์พืชของกลุ่มชนพื้นบ้าน ตามแบบแผนของการศึกษาวิชาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านอย่างจริงจัง (ที่มา: http://saranukromthai.or.th)

2.1.2 ความหมายและขอบเขตของพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน เป็นศาสตร์ที่มีความสำคัญอีกสาขาหนึ่งของวิชาพฤกษศาสตร์ ตรงกับนิยามศัพท์ภาษาอังกฤษว่า "Ethnbotany" เรียกกันมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1895 (พ.ศ.2438) จากการศึกษาพรรณไม้ที่ชาวพื้นเมืองท้องถิ่นนำมาใช้ประโยชน์ของ ดร.จอห์น ดับเบิลยู ฮาร์ชเบอร์เกอร์ (Dr. John W. Harshberger) พฤกษศาสตร์พื้นบ้านเป็นคำผสมระหว่าง "พฤกษศาสตร์" หมายถึง วิชาที่ศึกษาในเรื่องพืช และ "พื้นบ้าน" หมายถึง กลุ่มชนใดกลุ่มชนหนึ่งที่มีเอกลักษณ์อย่างใดอย่างหนึ่งร่วมกัน อาจจะเป็นการดำรงชีพ ใช้ภาษาท้องถิ่นเดียวกัน นับถือศาสนา หรือความเชื่อถือเดียวกัน กล่าวได้ว่ากลุ่มชนนั้นมีจุดรวมของวัฒนธรรม และขนบธรรมเนียมประเพณีร่วมกัน ความหมายของคำว่าพื้นบ้านในที่นี้ ไม่ได้หมายถึงเฉพาะชาวชนบท หรือชาวไร่ ชาวนา แต่อาจจะเป็นกลุ่มชนเมือง หากกลุ่มชนนั้นยังคงเอกลักษณ์ของกลุ่มตนไว้ได้ พฤกษศาสตร์พื้นบ้านจึงเป็นวิชาที่ศึกษาถึงความเกี่ยวข้องระหว่างพืชและกลุ่มชนพื้นบ้าน ความหมายที่ชัดเจนของวิชานี้ก็คือ "การนำพืชมาใช้ของกลุ่มชนพื้นบ้านที่สืบทอดต่อกันมาจากบรรพบุรุษ หรือได้รับการถ่ายทอดจากเพื่อนบ้านในกลุ่มของตน จนเป็นเอกลักษณ์การใช้พืชพรรณประจำท้องถิ่นนั้น" พฤกษศาสตร์พื้นบ้านเกี่ยวข้องกับศาสตร์อื่นๆ อีกหลายสาขา เช่น พฤกษศาสตร์จำแนกพวกพฤกษนิเวศ มานุษยวิทยา นิรุกติศาสตร์ เภสัชศาสตร์ ฯลฯ

ในประเทศไทยคำว่า “พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน” กำหนดใช้ครั้งแรกจากการประชุมเรื่องพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน จัดโดยสำนักงานคณะกรรมการวัฒนธรรมแห่งชาติ โดยผู้เชี่ยวชาญของประเทศซึ่งได้บัญญัติคำขึ้นมาใช้ให้เหมาะสม ว่า “พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน” หมายถึง การศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ของพืชที่ได้มีการสืบทอดต่อกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ ทั้งที่เป็นอาหาร ที่อยู่อาศัย ตลอดจนการใช้เป็นสัญลักษณ์และความเชื่อต่าง ๆ รวมทั้งวิธีการจำแนกแบบพื้นบ้าน ตลอดจนขั้นตอนการเตรียมและลู่ทางการใช้พืชนั้น ๆ (เต็ม สมิตินันท์ และวีระชัย ณ นคร, 2534, หน้า 35)

จะเห็นได้ว่า กลุ่มชนพื้นบ้านมีความผูกพันกับพืช มาตั้งแต่ครั้งโบราณกาล ภูมิปัญญาพื้นบ้านที่เกี่ยวกับพืชของกลุ่มชนในท้องถิ่นได้สูญหาย หรือขาดการถ่ายทอดไปแล้วมากมาย ตามกาลเวลาที่ผ่านไป เมื่อสังคมพื้นบ้าน หรือสังคมชนบท ได้พัฒนาไปสู่สังคมเมือง หรือสังคมอุตสาหกรรม แต่การศึกษาวิชาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านตามแบบแผน ยังคงอยู่ในช่วงเริ่มต้นของทศวรรษที่ผ่านมา ก่อนหน้านั้น งานค้นคว้าวิจัย ที่เกี่ยวกับการนำพืชมาใช้ประโยชน์ จะเน้นแต่ความสำคัญ และคุณค่าทางเศรษฐกิจของพืช เช่น พืชสมุนไพร-เครื่องเทศ พืชอาหาร พืชเส้นใย พืชที่ใช้ในการก่อสร้าง อันเป็นการศึกษาวิชาพฤกษศาสตร์เศรษฐกิจ (Economic botany) มากกว่าที่จะเป็นการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน ซึ่งมีรูปแบบการศึกษาแตกต่างออกไป เช่น การศึกษาพืชผักพื้นบ้านตามชนบท ที่ได้จากการเก็บหาในธรรมชาติ หรือจากป่า แตกต่างจากการศึกษาพืชผักเศรษฐกิจ ที่ได้จากการปลูกในแปลงผักเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามพืชผักพื้นบ้านหลายชนิด ที่เกิดจากภูมิปัญญาพื้นบ้าน อาจจะมีศักยภาพกลายมาเป็นพืชผักเศรษฐกิจขึ้นได้ในอนาคต หากได้รับการส่งเสริมอย่างจริงจัง

การศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านครอบคลุมไปถึงศาสตร์ที่เกี่ยวข้องอีกหลายสาขา เช่น เภสัชพื้นบ้าน (Ethnopharmacology) เกษตรกรรมพื้นบ้าน (Ethnoagriculture) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการทำเกษตรกรรมแบบโบราณ เครื่องมือเครื่องใช้พื้นบ้าน ที่ใช้ทำการเกษตร และการปลูกพันธุ์พืชดั้งเดิมหรือพันธุ์พืช ที่ยังไม่ได้ปรับปรุงพันธุ์ เครื่องสำอางพื้นบ้าน (Ethnocosmetics) ศึกษาเกี่ยวกับเครื่องประทินผิว เครื่องร่ำ เครื่องหอม และวิธีการผลิต เช่น การนำไม้กระแจะมาเป็นเครื่องประทินผิว การทำเครื่องหอมปรุงน้ำอบ หรือแป้งร่ำ จากดอกชำมะนาด ดอกมะลิ ดอกกระดังงาไทย ดนตรีพื้นบ้าน

(Ethnomusicology) ศึกษาเกี่ยวกับเพลงพื้นบ้าน และพืชที่ใช้ทำเครื่องดนตรีพื้นเมือง และวิธีการทำเครื่องดนตรี ถึงแม้ว่ามนุษย์จะเกี่ยวข้องกับพืช โดยนำพืชมาใช้ประโยชน์หลายรูปแบบมานานแล้ว แต่พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน ยังเป็นวิชาที่ค่อนข้างใหม่ ปัจจุบันอยู่ในความสนใจของนักพฤกษศาสตร์ นักนิเวศวิทยา นักเภสัชศาสตร์ นักพฤกษเคมี นักมานุษยวิทยา นักธรรมชาติวิทยา นักโบราณคดี นักนิรุกติศาสตร์ ฯลฯ

กล่าวได้ว่าการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน เป็นการศึกษาหาความรู้จากภูมิปัญญาพื้นบ้าน ที่เกี่ยวกับพืช โดยศึกษาถึงชนิดพันธุ์พืชที่ถูกต้อง ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพื้นเมือง ถิ่นกำเนิด ประโยชน์หรือโทษของพืช ฯลฯ ตลอดจนศึกษาถึงวิธีการนำพืชไปใช้ จนกลายเป็นวัฒนธรรมของกลุ่มชนพื้นบ้าน ชนบางกลุ่มได้อนุรักษ์ต้นไม้ใหญ่ หรือพื้นที่ป่าไม้ ของหมู่บ้านเอาไว้สืบต่อกันมา ด้วยความเชื่อถือ เกี่ยวกับโชคลาง หรือสงวนไม้เพื่อใช้สอย เช่น ป่า ปู่ตา ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นป่าชุมชนประเภทหนึ่ง ที่มีการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์ป่าไม้แบบยั่งยืน

2.1.3 พฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทย

การศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทย อยู่ในระยะเริ่มต้น ข้อมูลที่เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์พืช โดยผ่านการค้นคว้าวิจัยตามแบบแผน มีน้อยมาก เท่าที่มีการจดบันทึกเป็นหลักฐานอยู่บ้าง ได้แก่ ข้อมูลเกี่ยวกับพืชสมุนไพร ในตำรับยาไทยโบราณ ข้อจำกัดของการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทยก็คือ ประเทศไทยยังขาด ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรพืช ทั้งยังขาดแคลนนักพฤกษศาสตร์ที่ เชี่ยวชาญ และมีประสบการณ์ทางด้านการจำแนกพรรณพืช และขาดแคลนนักพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน (Ethnobotanist) ผู้มีประสบการณ์สามารถจำแนกพืชในละแวกชุมชนของตนเองได้

ข้อมูลพื้นฐานทรัพยากรพรรณพืชของประเทศใดประเทศหนึ่ง จะปรากฏอยู่ในหนังสือพรรณพฤกษชาติ (flora) ประเทศไทยยังไม่เคยมีหนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศฉบับสมบูรณ์มาก่อน ในขณะที่ประเทศอื่นในภูมิภาคเอเชีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ตีพิมพ์หนังสือพรรณ พฤกษชาติของประเทศมานานแล้ว โดยนัก พฤกษศาสตร์ชาวตะวันตก ได้แก่ หนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศอินเดีย พม่า แหลมมลายู ภูมิภาคอินโดจีน และชวา หนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศไทยตอนแรก ตีพิมพ์เมื่อปี พ.ศ. ๒๕๑๓ - พ.ศ. ๒๕๓๘ ตีพิมพ์หนังสือไปได้เพียงประมาณร้อยละ ๓๐ ของจำนวนพืชที่มีท่อลำเลียง (vascular plants) ทั้งหมดของประเทศ ซึ่งมีประมาณไม่ต่ำกว่า ๑๐,๐๐๐ ชนิด ดังนั้นประเทศไทยยังขาดข้อมูลพื้นฐานพรรณพฤกษชาติอยู่อีกมาก อันเป็นข้อจำกัดที่สำคัญประการหนึ่ง ในการศึกษา ค้นคว้าพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทย

การศึกษาทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทยที่ผ่านมา ผลงานส่วนใหญ่ปรากฏเป็นเพียงรายงานเบื้องต้น เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์พืช ของกลุ่มชนพื้นบ้าน โดยเฉพาะการใช้พืชสมุนไพรและพืชอาหาร นอกจากนี้มีรายงานไม่กี่เรื่องที่ กล่าวถึง พืชที่มีพิษ พืชที่ใช้เป็นวัตถุดิบในงานหัตถกรรมพื้นบ้าน และพืชโบราณที่ปรากฏอยู่ใน จารึก หรือถูกกล่าวขานในวรรณคดีไทยหรือนิทานพื้นบ้านในยุคสมัยต่างๆ ส่วนงานค้นคว้าวิจัย พฤกษศาสตร์พื้นบ้านตามแบบแผนที่ได้มาตรฐาน โดยมีการสำรวจในพื้นที่พร้อมบันทึกรายละเอียด และทำการเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งไว้เป็นหลักฐาน (voucher specimen) ยังมีน้อยมาก เท่าที่ปรากฏ มีผลงานเพียงไม่กี่เรื่อง ได้แก่ การศึกษาเกี่ยวกับการใช้พืชสมุนไพรของชาวเขาบางเผ่าทางภาคเหนือ โดยนักวิชาการชาวต่างประเทศ

งานค้นคว้าวิจัยทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในประเทศไทยมีขอบเขตกว้าง ขึ้นกับวัตถุประสงค์และความชำนาญเฉพาะเรื่องของผู้วิจัย แต่ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาการใช้พืชพรรณกลุ่มใดของกลุ่มชนพื้นบ้าน นักวิจัยด้านนี้จำเป็นต้องมีความรู้ และ ประสบการณ์ทางพฤกษศาสตร์จำแนกพวกเป็นพื้นฐานอยู่บ้าง เพื่อช่วยในการปฏิบัติงานภาคสนาม เป็นไปได้รวดเร็วและแม่นยำมากยิ่งขึ้น นักวิจัยควรถือหลักปฏิบัติงานในท้องที่ดังต่อไปนี้

1. สำรวจพืชพรรณที่ผู้คนนำมาใช้ตามชุมชนพื้นบ้าน ทั้งพืชที่ใช้บริโภค อุปโภค หรือใช้ในพิธีกรรมทางศาสนา ความเชื่อถือ ฯลฯ และเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (herbarium specimen) ไว้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการตรวจสอบชนิดพืช และชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง

2. บันทึกชื่อพื้นเมือง รายละเอียดรูปพรรณของพืช ถิ่นกำเนิด ประโยชน์หรือโทษของพืช

3. บันทึกส่วนของพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะพืชสมุนไพร ต้องระบุว่า ใช้ส่วนราก หัว เหง้า เปลือก ยางหรือชันไม้ แก่นไม้ กิ่งไม้ ใบ ดอก ผล หรือเมล็ด และวิธีการนำมาใช้ การปรุง การผลิต ฯลฯ

4. บันทึกชื่อ อายุ เพศ และความรู้ของผู้คนพื้นบ้าน ที่ให้ข้อมูล หรือให้ความรู้เกี่ยวกับภูมิปัญญาพื้นบ้าน และควรสอบถามผู้อื่นในชุมชนเดียวกันซ้ำมากกว่า ๑ ราย เพื่อความแน่นอนว่า มีการใช้พืชดังกล่าวในรูปแบบเดียวกัน

5. บันทึกสภาพของชุมชนพื้นบ้าน ลักษณะการตั้งถิ่นฐาน และความเป็นอยู่ของชุมชน ช่วงเวลาของการตั้งถิ่นฐาน การทำเกษตรกรรม ขนบธรรมเนียมประเพณี วัฒนธรรม และความเชื่อถือต่างๆ

2.1.4 รูปแบบการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

การศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านแบ่งประเภทได้ดังนี้ (อาทร ริ้วไพบูลย์, 2538, หน้า 241)

1. การศึกษาทางโบราณคดี จากซากดึกดำบรรพ์ของพืช (paleoethnobotany)

2. การศึกษาพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium search) โดยศึกษาจากรายละเอียดที่บันทึกไว้ของตัวอย่างพืชอัดแห้ง (herbarium label)

3. การศึกษาจากเอกสาร (literature search) เช่น การบันทึกของนักสำรวจ ผู้เดินทางเผยแผ่ศาสนา

4. การศึกษาการใช้ในชุมชน (field work) โดยการเก็บข้อมูลในท้องถิ่นที่อยู่ของชนกลุ่มน้อย

2.1.5 ประโยชน์ของพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน

ประโยชน์ของพฤกษศาสตร์พื้นบ้านแบ่งตามลักษณะการใช้ประโยชน์หลักๆ ได้ดังนี้ (เต็ม สมิตินันท์ และวีระชัย ณ นคร, 2534, หน้า 7-8)

1. พืชอาหาร หมายถึง พืชที่มนุษย์ใช้เป็นอาหารโดยตรง แปรรูปเป็นอาหาร หรือใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ได้แก่ ธัญพืช ผัก ผลไม้ พืชที่เป็นสารปรุงแต่ง สีผสมอาหารเครื่องเทศ ฯลฯ

2. พืชที่ใช้เป็นยารักษาโรค หมายถึง พืชที่ชาวบ้านเชื่อว่ามีสรรพคุณเป็นยารักษาโรค รวมถึงพืชที่นำไปใช้เป็นยารักษาโรคได้โดยตรง หรือที่ต้องใช้ผสมกับพืชอื่นหรือสารอื่นหรือต้องผ่านกรรมวิธีการสกัด และพืชที่ใช้เป็นยาเสพติด หรือเป็นพืชมีพิษ

3. พืชที่ใช้เป็นเครื่องนุ่งห่ม หมายถึง พืชที่ให้เส้นใยถักทอ รวมถึงพืชที่ให้สีย้อมและพืชที่ใช้เลี้ยงแมลงที่ให้เส้นใย

4. พืชที่ใช้เป็นที่อยู่อาศัย หมายถึง พืชที่มนุษย์นำมาแปรรูปสร้างที่อยู่อาศัยประดิษฐ์อุปกรณ์ต่าง ๆ ฯลฯ

5. พืชที่ใช้เป็นสัญลักษณ์และความเชื่อถือต่าง ๆ หมายถึง พืชที่มนุษย์ให้ความเชื่อถือเป็นตัวแทนของหมู่คณะ เป็นเครื่องรางของขลัง นำโชค และป้องกันภูตผีปีศาจ

2.1.6 ภูมิปัญญาท้องถิ่นกับฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. การคัดเลือกพืชสมุนไพร เช่น การสกัดสารและการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารก่อนจะศึกษาผลทางชีวภาพ การวางแนวทางการดำเนินงานตามเงื่อนงำจากการประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในยาสมุนไพรและความเชื่อตามขนบธรรมเนียม การตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีววิทยา ชีวเคมี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีและกายภาพ

2. การคัดเลือกทางเภสัชวิทยา เป็นการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรีย เห็ดรา โปรโตซัว การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาโรคเช่น โรคมะเร็ง การอักเสบ วิธีการเบื้องต้นที่ใช้เช่น Brine shrimps, Antibacterial screening, Hippocratic screening เป็นต้น

2.2 การเตรียมพืชสมุนไพร

การเตรียมพืชสมุนไพร (Preparation of Medicinal plants) ประกอบด้วยการคัดเลือกพืชสมุนไพร การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร การเก็บส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพร การเตรียมพืชสมุนไพร การทำให้สมุนไพรมีขนาดเล็ดลง (http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri02/lesson.htm)

2.2.1 การคัดเลือกพืชสมุนไพร

1. คัดเลือกพืชที่มีผลในการรักษามานานแล้ว โดยใช้ภูมิปัญญาแผนโบราณ
2. คัดเลือกพืชที่อยู่ในวงศ์ (Family) หรือ genus เดียวกัน โดยใช้หลักของ Chemotaxonomy
3. คัดเลือกพืชในวงศ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยดูจาก Botanical และ Chemotaxonomy
4. การคัดเลือกโดยทั่วไปพืชที่จะคัดเลือกควรเป็นพืชที่มีอยู่ในประเทศไทย

2.2.2 การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 59-60) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. พืชสมุนไพรที่จะนำมาสกัด ต้องมีการตรวจเอกลักษณ์ให้ถูกต้อง เพราะพืชหลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันหรือมีชื่อพ้องกัน โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่หายากและขาดแคลน ต้องตรวจสอบอย่างรอบครอบ
2. การเลือกเก็บพืชสมุนไพรที่สมบูรณ์ มีอายุตามชนิดของพืช สามารถออกดอกออกผลที่มีจำนวนมากพอ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มากพอดังนี้
   - 2.1 รากและเหง้า เก็บหลังจากที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้วและหยุดการเจริญเติบโต หากเป็นพืชล้มลุกควรเก็บเมื่อต้นตาย
   - 2.2 เปลือกต้น เก็บในระยะเวลาที่พืชเจริญเติบโตเติมที่
   - 2.3 ใบและดอก เก็บก่อนที่พืชจะออกดอกหรือก่อนที่ดอกจะบาน
   - 2.4 ดอก เก็บขณะที่ดอกกำลังจะบานหรือก่อนถึงเวลาผสมเกสร
   - 2.5 ผล เก็บเมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่แต่ยังไม่สุกหรือเมื่อสุกเต็มที่ ตามชนิดของพืชสมุนไพร
   - 2.6 เมล็ด เก็บเมื่อแก่เต็มที่แล้ว แต่ควรเก็บก่อนที่ผลจะแตกออก
3. เก็บตัวอย่างให้ถูกฤดูกาลของพืชแต่ละชนิด เช่น พวก ขิง ข่า กระชายดำ จะมีเหง้าอยู่ใต้ดิน ในฤดูฝนเหง้าจะมีน้ำปริมาณมาก ทำให้มีปริมาณสารระเหยต่ำ ดังนั้นจึงควรเก็บเกี่ยวในช่วงฤดูแล้งจะได้ปริมาณสารระเหยที่มากกว่า
4. วิธีการเก็บตัวอย่างต้องเหมาะสมต่อการนำไปแยกสกัดสาร พืชบางชนิดต้องสกัดสด หรือบางชนิดต้องสกัดแห้ง
5. เก็บตัวอย่างในปริมาณที่มากพอ เพื่อเก็บไว้เป็น Original Sample ซึ่งการเก็บจะต้องมีการจดบันทึกข้อมูลที่เกี่ยวข้อง เช่น วันเวลา ฤดูกาลที่เก็บ สถานที่เก็บ เป็นต้น

6. ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างจากร้านค้าและผลิตภัณฑ์ ต้องระวัง สิ่งปลอมปน การใช้ชื่ออื่นมาอ้าง และชื่อพ้องกัน

7. เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วต้องการทำตัวอย่างแห้ง ต้องใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสารออกฤทธิ์

2.2.3 การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. การเตรียมตัวอย่างแบบสด พืชสมุนไพรสดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ได้ดี โดยนำพืชสดมาต้มกับแอลกอฮอล์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และป้องกันไม่ให้สารเคมีในพืชเกิดการเปลี่ยนแปลง

2. การเตรียมตัวอย่างแบบแห้ง เป็นการป้องกันการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในพืชสด การเตรียมตัวอย่างแบบแห้งควรทำให้แห้งด้วยวิธีที่รวดเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะอุณหภูมิที่สูงจะทำให้สารสำคัญเกิดการเปลี่ยนแปลงได้

3. ระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้พืชแห้งโดยทั่วไปดอก ใบ และยอด จะใช้อุณหภูมิที่ 20-40 องศาเซลเซียส ส่วนเปลือกและรากจะใช้อุณหภูมิที่ 30-35 องศาเซลเซียส

4. พืชสมุนไพรแห้งควรเก็บในที่แห้ง มืด เย็น และมีอากาศหมุนเวียนและหลีกเลี่ยงการเก็บสมุนไพรไว้เป็นเวลานาน

2.2.4 การทำให้สมุนไพรตัวอย่างมีขนาดเล็กลง

การสกัดพืชสมุนไพรต้องย่อยตัวอย่างให้มีขนาดให้เล็กลง (comminution or pulverization) เนื่องจากสารสำคัญจะอยู่ภายในเซลล์ในสภาพผลึกหรือผงละเอียด เมื่อได้สัมผัสกับน้ำยาสกัดที่เหมาะสมองค์ประกอบเหล่านั้นจะละลายออกมา โดยการบดพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดเพื่อทำลายผนังเซลล์และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชสมุนไพรที่จะสัมผัสกับน้ำยาสกัด การสกัดจะสมบูรณ์ ถ้าเซลล์แตกออกและน้ำยาสกัดเข้าไปสัมผัสสารสำคัญได้มากที่สุด

การย่อยพืชสมุนไพรให้มีขนาดเล็กลง

1. การหั่นหรือตัดพืชสมุนไพรแห้งควรตัดตามยาว (longitudinal cut) หรือตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยม (rectangular or cubical cut) ก่อนบด (grinding) โดยใช้เครื่องบดแบบต่างๆ ตามชนิดของวัตถุดิบและขนาดที่ต้องการหลังการบด เช่น เครื่องบดชนิดค้อน(driven hammer mill) เหมาะสำหรับย่อยขนาดพืชที่แตกหักง่าย เช่นรากหรือหัว ขนาดของพืชที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของตระแกรงที่ใช้

ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่จะหมุนเวียนกลับไปย่อยอีก จนได้ขนาดที่เล็กพอที่จะลอดผ่านรูตะแกรง หรือเครื่องบดชนิดตัด (cutting mills) เหมาะสำหรับย่อยใบ เปลือกไม้ และรากที่เหนียวมีเส้นใย ขนาดของพืชที่ต้องการลดขนาดขึ้นกับขนาดของตะแกรงที่ใช้และความเร็วของมอเตอร์ที่ใช้หมุนใบมีด เป็นต้น

2. พืชสมุนไพรสดทำได้โดยการหั่น (slicing) โดยใช้มีด หรือพืชสมุนไพรที่แช่ในแอลกอฮอล์อาจใช้เครื่องปั่น (waring blender) เป็นต้น

นอกจากนี้อาจทำการย่อยเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เอนไซม์ (enzyme disintegration) หรือโดยใช้สารเคมี (chemical disintegration)

3. การลดขนาดของพืชสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดควรคำนึงถึงโครงสร้างของพืชสมุนไพรเป็นหลัก ถ้าเป็นโครงสร้างแข็งแรง ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปได้ยาก เช่น รก เนื้อไม้ ควรบดให้มีขนาดเล็กกว่าส่วนที่มีโครงสร้างอ่อนนุ่ม ซึ่งน้ำยาสกัดแทรกซึมเข้าไปได้ง่าย เช่น ใบ ดอก การบดพืช

4. การย่อยสมุนไพรให้มีขนาดเล็กมากจนเกินไปจะเกิดผลเสียได้ คือทำให้เกิดปัญหาในการอุดตันเครื่องกรองในขบวนการสกัด และทำให้ได้องค์ประกอบที่ไม่ต้องการมากขึ้นอันเนื่องมาจากเซลล์แตกมากเกินไป ซึ่งบางครั้งทำให้สารสกัดขุ่น ขนาดของผงพืชสมุนไพรที่เหมาะสมหาได้จากการทดลองซึ่งเป็นขนาดที่ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบสำคัญสูงสุด

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบจากสมุนไพร(Extraction of Active Constituents from Medicinal Plant) ในเบื้องต้นโดยใช้ตัวทำละลาย(solvent)จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) โดยสารสกัดหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรซึ่งจะมีองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active constituents) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) ซึ่งชนิดและปริมาณขององค์ประกอบในสารสกัดขึ้นอยู่กับสมุนไพรและสภาวะที่ใช้ในการสกัด

วัตถุประสงค์ของการสกัดนั้นเพื่อแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพร และทำให้ความเข้มข้นของสารสำคัญมีสูงขึ้น และเพื่อลดขนาด (dose) ของการใช้สมุนไพรให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547 : 59-60)

ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรนั้นมีข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์ การเลือกตัวทำละลาย การเลือกวิธีการสกัด วิธีการสกัด และการทำสารสกัด ให้เข้มข้น

2.3.1 สมบัติทั่วไปของสารออกฤทธิ์

ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551 : 68-71) กล่าวถึงคุณสมบัติทั่วไปที่ควรทราบกอนทำการแยกสารดังนี้

1. ความไมชอบน้ำ (hydrophobicity) หรือ ความชอบน้ำ (hydrophilicity)

ความชอบน้ำ (hydrophilicity) หรือความไมชอบน้ำ (hydrophobicity) ของสารนั้นพิจารณาไดจากความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลาย ที่มีขั้วสูงไปหาขั้วต่ำตามลำดับดังนี้ น้ำ เมธานอล อะซีโตไนไตร(acetonitrile) เอธิลอะซีเตด (ethyl acetate) ไดคลอโรมีเธน (dichloromethane) คลอโรฟอรม (chloroform) ปโตรเลียมอีเธอร (petroleum ether) และเฮกเซน (hexane) สารสกัดหยาบที่จะนำมาแยกใหไดสารบริสุทธิ์อาจละลายในตัวทำละลายไดยาก ควรกรองสารละลายของสารสกัดหยาบเพื่อ แยกเปนสวนของตะกอนและสวน ของสารละลาย (filtrate)หรือหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเปน สวนของตะกอนและสวนลอย (supernatant) นอกจากนี้ยังสามารถสกัดแยกสวนของสารสกัดหยาบ ดวยการใชตัวทำละลายสองชนิดที่ไมเขากัน เชน น้ำกับเอธิลอะซีเตด หรือคลอโรฟอรมกับไดคลอโรมีเธนหรือเฮกเซน เปนตน โดยทำการสกัด ดวยกรวยแยก จากนั้นจึงนำแตละ สวนมาแยกใหบริสุทธิ์ ตอไปดวยเทคนิคทางโครมาโทกราฟชนิดอื่น หรือแบงบางสวนของสารที่แยกไดนั้นมาทดสอบฤทธิ์ทาง ชีวภาพกอนที่จะแยกสารใหบริสุทธิ์ตอไป

2. pKa

โดยทั่วไปค่าพีเอช (pH) 3 7 และ 10 จะเปนคาพีเอชที่แสดงถึงความเปนกรด กลาง และเบสตามลำดับ การทราบคา pKa จะทำใหทราบถึงความคงตัวของสารนั้นที่คาพีเอชตาง ๆ ของสารละลาย อยางไร ก็ตามในขั้นตอนการแยกสารสามารถปรับความเปนกรดเบสของสาร ที่อยูในรูปสารละลายหรือสารแขวนตะกอนดวยการหยดกรดหรือดางเพียง 1 - 2 หยด จากนั้นจึงสกัดแยก ดวยตัวทำละลายผสมที่แยกออกเปนสองชั้นได สารที่ไมแตกตัวจะละลายอยูในเฟสของ ตัวทำละลายอินทรีย (organic phase) สวนสารที่แตกตัวมีประจุเปนไอออนจะละลายอยูในเฟสของน้ำ (aqueous phase)

3. ความคงตัวตอความรอน

ความคงสภาพ (stability) มี 2 ประเภท คือ ความคงสภาพทางเคมี (chemical stability) และความคงสภาพทางกายภาพ (physical stability) ความคงสภาพของสารจะลดลงเมื่อเกิดการเสื่อมสลาย (degradation) เนื่องจากกระบวนการตาง ๆ เชน hydrolysis, dehydration, isomerization และ racemization, decarboxylation และ elimination, oxidation, photodegradation และ complex interaction รวมทั้งแสงและความรอน สารผลิตภัณฑธรรมชาติที่จัดเปนโปรตีนมักไมคงตัวตอความรอนจึงมักทำใหเกิดปญหาในการแยกสาร ดังนั้นจึงนิยมแยกสารที่ไมใชโปรตีนเพราะมีความคงตัวสูงกวา โดยทั่วไปการทดสอบความคงสภาพตอความรอนจะใชวิธีการบม (incubation) สารตัวอยางที่อุณหภูมิ 80 หรือ 90 องศาเซลเซียส เปน เวลานาน 10 นาที บนหมออังไอน้ำ (water bath) สารที่ถูกความรอนมักมีคุณสมบัติเปลี่ยนไป เชน เกิดการเกาะกลุมกัน (clotting หรือ aggregation) แสดงวาความรอนทำใหสารสลายตัวหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสรางทางเคมีไปจากเดิม

4. ขนาดโมเลกุล

การแยกสารอาจไม่ไดแยกตามความมีขั้วของสาร แตอาจแยกตามขนาดของโมเลกุล(size) หรือน้ำหนักโมเลกุล ของสาร เชน การแยกสารผลิตภัณฑธรรมชาติดวย Sephadex LH-20 column พบวาสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญจะถูกชะ ออกมาจากคอลัมนกอนสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเปนตน ทั้งนี้การแยกสารตามขนาดโมเลกุลจะมีประโยชนอยางมากเมื่อ สารที่เปนองคประกอบในสารผสมมีขนาดโมเลกุลแตกตางกันแตมีขั้วใกลเคียงกันมาก จึงทำใหแยกออกจากกันไดยากเมื่อ ใช normal phase หรือ reverse phase แตหากแยกสารเหลานี้ดวย Sephadex LH-20 ที่อาศัยหลักการแยกสารตามขนาด โมเลกุลจะสามารถแยกสารบริสุทธิ์ไดตามตองการ ในบางครั้งโปรตีนที่ไมมีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเขามารบกวนกระบวนการแยกสาร อีกทั้งโปรตีนมักไมคงตัวตอความ รอนจึงสลายตัวกลายเปนสารรบกวนได วิธีกำจัดโปรตีนออกจากสารสกัดทางชีวภาพมักทำการสกัดดวยตัวทำละลายที่เขา กับน้ำได เชน เมธานอล เมื่อทำสารสกัดในชั้นเมธานอลใหแหงสนิท (ปราศจากน้ำ) แลว จึงจะสกัดสารสกัดที่ไดนั้นซ้ำอีกครั้ง ดวยเมธานอลเพื่อใหแนใจวาไมมีโปรตีนติดมาดวย เพราะโปรตีนจะละลายมากับน้ำในระหวางกระบวนการสกัด นอกจากนี้ ยังสามารถกำจัดโปรตีนออกไปไดด

วยการกรองผาน ultrafiltration membrane โดยใชแรงดันสุญญากาศหรือแรงหมุนเหวี่ยง ชวยไลสารตัวอยางใหผานไปบนแผนกรอง สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเทานั้นที่จะสามารถผานรูของแผนกรองไปได สำหรับ โปรตีนซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญนั้นไมสามารถผานแผนกรองไปได อยางไรก็ตามสารที่จะแยกดวยวิธีนี้ไดตองมีขนาดโมเลกุล ใหญกวา 2000 amu สำหรับสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากจะตองแยกดวยวิธีการแยกสารผานเยื่อ (dialysis)

ซึ่งสามารถ แยกโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกวา 2000-3000 amu ได โดยสารจะแพรผาน dialysis tubing ออกมา ยังสารละลายตัวกลางที่อยู ภายนอก โดยโปรตีนจะถูกกักเก็บไวใน tubing

5. สเตอริโอเคมี

สเตอริโอเคมี(Stereochemistry) เปนวิชาเคมีที่เกี่ยวกับระยะอะตอมในโมเลกุล ซึ่งมีอิทธิพลตอการแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และการคนพบยา เนื่องจากในปจจุบันมียาหลายชนิดที่จำหนายทั่วโลกจัดเปน chiral drug ดังนั้นเทคนิคในการแยก chiral compound จึงมีความสำคัญมากขึ้น

โดยทั่วไปสามารถแบงไอโซเมอร (isomer) ออกเปนหลายชนิดดังแผนภาพที่ 1 นอกจากนี้ยังสามารถแบง stereoisomer ออกเปน 2 ชนิด คือ enantiomer และ diastereomer โดยที่ enantiomer คือ โมเลกุลที่เปนภาพกระจกเงา (mirror image) ซึ่งกันและกัน เนื่องจาก enantiomer ทั้งสองมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ เหมือนกัน ดังนั้นจึงไมสามารถแยก enantiomer ออกจากกันดวยวัฏภาคคงที่ชนิด conventional reversed-phase stationary phase ได สำหรับ diastereomer ซึ่งโมเลกุลทั้งสองไมไดเปน ภาพกระจกเงาซึ่งกันและกันนั้น มีคุณสมบัติทาง เคมีและกายภาพแตกตางกันบาง จึงสามารถแยกออกจากกันดวย conventional stationary phase ได นอกจากนี้ยัง สามารถแบง diastereomer ออกเปน 2 กลุม คือ optically active isomer และ non-optically active geometric isomer โมเลกุลที่มี optical actiชนิดนี้ไมมีสมมาตร (symmetry) ภายในโมเลกุล ไมสามารถซอนทับ (superimpose) กับโมเลกุลที่เปนกระจกเงากันได โดยทั่วไปโมเลกุลชนิดนี้จะมีหมูแทนที่โดยรอบ tetrahedral carbon atom ที่แตกตางกันทั้ง 4 หมู ซึ่ง chiral molecule ของ lactic acid ที่มี central stereogenic center จะไมมีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุล (internal symmetry plane) (รูปที่ 1) ดังนั้น lactic acid จึงมี chiral enantiomeric form 2 แบบ ในทางตรงกันขาม propanoic acid ซึ่งมีระนาบสมมาตรภายในโมเลกุลจัดเปน achiral molecule ความแตกตางระหวาง enantiomer ทั้งสอง คือ มีปฏิกิริยากับ chiral molecule ชนิดอื่นไดแตกตางกัน และมี คุณสมมบัติทางกายภาพที่แตกตางกันดวย จึงเปนเหตุใหมี optical activity ในการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ (plane polarized light) ไดแตกตางกัน อยางไรก็ตาม enantiomer ทั้งสองยังคงมีคุณสมบัติบางอยางที่เหมือนกัน (identical) เชน จุดหลอมเหลว การละลาย และขอมูลทางสเปกโตรสโกปบางชนิด เปนตน ในปจจุบันนิยมแยก enantiomer ใหบริสุทธิ์ดวย HPLC นอกจากนี้การแยก chiral drug ในเชิงอุตสาหกรรมจะนิยมใช simulated moving bed (SMB) chromatography โดยการทำใหเกิด diastereomeric complex จากนั้นจึงแยกตอไปดวย conventional reversed-phase chromatography หรือคอลัมนที่บรรจุ immobilized chiral stationary phase (CSP)

2.3.2 การเลือกตัวทำละลาย

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 83-84) กล่าวถึงการเลือกตัวทำละลายสรุปได้ดังนี้

1. ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายมีความสำคัญมากที่สุด ซึ่งจะทำให้ทราบว่าสารที่ต้องการละลายหรือไม่ละลายในตัวทำละลายชนิดใด เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งมีโครงสร้างสลับซับซ้อนมากน้อยต่างกันและมีอยู่ในพืชทั้งในสภาพอิสระและรวมตัวกับสารอื่นๆ ในสภาพเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นควรพิจารณาถึงสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญที่ต้องการสกัด นอกเหนือจากความมีขั้วของสาระสำคัญดังกล่าว ในการเลือกตัวทำละลายมีหลักการทั่วไปว่า สิ่งที่เหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน (Like dissolve like) เช่น คุณสมบัติสารสำคัญมีขั้วก็ควรเลือกตัวทำละลายหรือตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นเดียวกันในสารสกัด

2. ความคงตัว

ตัวทำละลายมีความคงตัว หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

3. การระเหย

ตัวทำละลาย ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

4. สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด

สภาพของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัด เช่นเมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรขจัดไขมันพวกนี้ออกก่อนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำกากพืชที่เหลือไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.3.3 วิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 85-89) กล่าวโดยสรุปดังนี้

1. มาเซอเรชัน

มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในตัวทำละลายที่เหมาะสม จะทำเป็นเวลานาน 7 วัน หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างที่หมักผงสมุนไพรอยู่นั้นควรเขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกาก (marc) ออกจากตัวทำละลาย วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายน้อยและเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะสมกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย เมื่อสารในสุมนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจนสมบูรณ์

การสกัดแบบมาเซอเรชันใช้เวลานาน จึงมีผู้ดัดแปลงใช้มิกเซอร์ (mixer) หรือโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) มาช่วยทำให้เซลล์พืชแตกออกมาก่อนทำการสกัด เพื่อลดระยะเวลาการสกัด ต่อมาพัฒนาใช้เสียงที่มีความถี่สูงเกิน 20,000 เฮิรตซ์ ร่วมในการสกัดเรียกวิธีนี้ว่า การสกัดอัลตราซาวน์ (ultrasound extraction) แต่วิธีหลังนี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำไปเป็นเพอร์ออกไซด์ ซึ่งอาจมีผลต่อการสกัด นอกจากนี้อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ต่อสารโดยตรง เพราะขณะที่ใช้การสกัดอัลคราซาวน์ทำให้เกิดช่องว่างและมีอากาศแทรกเข้าไปในตัวทำละลาย

2. เพอร์โคเลชัน

เพอร์โคเลชัน (Percolation) เป็นการปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายสารสำคัญออกมาโดยใช้เครื่องเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) วิธีการทำเพอร์โคเลชัน คือนำผงสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายก่อน 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุผงทีละชั้นลงในเพอร์โคเลเตอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (column) ปลายเปิดทั้ง 2 ด้าน โดยด้านบนจะกว้างกว่าด้านล่าง เพื่อความสะดวกในการบรรจุผงสมุนไพร ส่วนปลายด้านล่างปิดเปิดได้ เพื่อที่จะสามารถควบคุมอัตราการไหลของสารสกัดหรือเพอร์โคเลตจากเพอร์โคเลเตอร์ได้ เติมตัวทำละลายหรือตัวทำลาย (menstrumm) ลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 0.5 cm ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงปล่อยตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วที่พอเหมาะ พร้อมกับเติมตัวทำละลายใหม่ลงไปเรื่อยๆ อย่าให้แห้งเก็บเพอร์โคเลตจนการสกัดสมบูรณ์โดยการตรวจสอบจากเพอร์โคเลตส่วนสุดท้าย นำเพอร์โคเลตที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

วิธีเพอร์โคเลชันจัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ เปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารจะใช้เพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายตัว และให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าหากัน

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง

การสกัดแบบต่อเนื่อง(Continuous extraction) โดยการใช้ซอกซ์เลตเอกแทรกเตอร์ (soxhlet extractor) ซึ่งเป็นระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ เมื่อได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ ตัวทำละลายจะผ่านผงสมุนไพรซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดออกมา เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแซมเบอร์ (extracting chamber) สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะวนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์

วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสมสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลืองแต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และตัวทำละลายที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของตัวทำละลายแตกต่างไปจากเดิม และผลการสกัดที่ไม่ดี

4. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) มีหลายวิธี เลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชที่ใช้ ดังนี้

4.1 การกลั่น (distillation) ในทางอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ

การกลั่นโดยใช้น้ำ (water distillation) ใช้กับพืชแห้งซึ่งไม่ถูกทำลายเมื่อต้ม เนื่องจากพืชที่นำมากลั่นจะแช่อยู่ในน้ำเดือดทั้งหมดตลอดระยะเวลาการกลั่น วิธีนี้ใช้กลั่นน้ำมันจากเปลือกไม้ เช่น กลั่นน้ำมันสน (turpentine oil) จากยางสน เป็นต้น

การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) ใช้ได้กับพืชสดและแห้ง ซึ่งอาจถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกต้ม เช่น กานพลู จะบดให้เป็นผง เติมน้ำให้ท่วมผ่านไอน้ำเข้าไป ส่วนที่กลั่นได้จะมีทั้งน้ำมันและน้ำ ทำการแยกน้ำมันออกมา การกลั่นวิธีนี้สะดวกที่สุดและใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันในทางการค้า

การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (steam distillation) วิธีนี้ใช้กับพืชสด เช่น สะระแหน่ โดยนำพืชสดมาวางบนตะแกรง แล้วผ่านไอน้ำเข้าไปโดยตรง โดยไม่ต้องมีการหมักพืชด้วยน้ำก่อน จัดเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายน้อย

4.2 การบีบหรือการอัด

การบีบหรือการอัด (expression)ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้วิธีการกลั่นไม่ได้ เนื่องจากถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม ได้แก่ น้ำมันผิวมะนาว (lemon oil) น้ำมันผิวส้ม (orange oil)

การบีบทีนิยมคือ วิธีเอกคิวเอล (ecuelle method) ซึ่งใช้กับน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม (citrus oil) โดยเอาผลไปบีบบนรางที่มีเข็มแหลมๆ อยู่เข็มต้องยาวพอที่จะแทงผ่านผนังชั้นนอก (epidermis) เพื่อให้ต่อมน้ำมันแตกออกมา น้ำมันจะหยดลงไปในรางซึ่งเก็บน้ำมันได้

4.3 วิธีเอ็นฟอยเรนซ์

วิธีเอ็นฟอยเรนซ์ (enfleurange) ใช้กับน้ำมันหอมระเหยของกลีบดอกไม้ต่างๆ เป็นวิธีที่เก็บความหอมได้ดี แต่ก่อนใช้ในอุตสาหกรรมทำน้ำหอม (perfume) วิธีนี้จะใช้ไขมัน (fat) หรือน้ำมันไม่ระเหย (fixed oil) ที่ไม่มีกลิ่นเป็นตัวดูดซับ [ส่วนใหญ่ใช้ไขมันวัว (beef tallow) ร้อยละ 40 กับไขมันหมู (lard) ร้อยละ 60] โดยนำตัวดูดซับมาแผ่เป็นแผ่นบางๆ แล้วเอากลีบดอกไม้มาวางเรียงบนตัวดูดซับนาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนกลีบดอกไม้ใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนตัวดูดซับเอาน้ำมันหอมระเหยมากพอ จึงเอาตัวดูดซับมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยออกด้วยแอลกอฮอล์

4.4 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย

การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (extraction with solvent) ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) อาจใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น แอซีโทน (acetone) เมทานอล แอลกอฮอล์ เป็นต้น วิธีนี้จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการกลั่นที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลง และมีกลิ่นผิดไปจากธรรมชาติได้ จึงนำวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ต้นทุนการผลิตสูงกว่าวิธีการกลั่น

2.3.4 การเลือกวิธีการสกัด

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 90) กล่าวถึงการเลือกวิธีการสกัดสรุปได้ดังนี้ การสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลายๆ อย่าง ได้แก่

1. ธรรมชาติของสมุนไพร โดยพิจารณาดังนี้

1.1 ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อพืช สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน หากเป็นสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

1.2 ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในตัวทำละลาย ถ้าละลายได้ง่ายใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้ยากใช้วิธีเพอร์เลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

1.3 ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

2. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด

หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญและมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยาเตรียมต่างๆ ก็อาจใช้วิธีง่ายๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

3. ความต้องการการสกัด

หากต้องการสารสกัดเจือจาง ควรใช้ใช้วิธีมาเซอเรชัน แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2.3.5 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 101-102) กล่าวถึงการทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration) สรุปได้ดังนี้

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. การระเหย

การระเหย(Free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากตัวละลาย โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารอินทรีย์ (organic solvent) ในการสกัดการระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสาระสำคัญ เมื่อใช้ความร้อน

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ

การกลั่นในภาวะสุญญากาศ(Distillation in vacuo) เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากตัวทำละลายสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ(vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า rotary evaporator ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่จะกลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบนี้จะต้องต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต้อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

3. การทำให้แห้ง

การทำให้แห้ง(drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากตัวทำละลายจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของเข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dyer)

4. อัลตราฟิลเทรชั่น

อัลตราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) เป็นการนำสารสกัดด้วยน้ำ ทำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหลักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000

2.4 สารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 19-55) และจาก http://cyberlab.lh1.ku.ac.th/elearn/faculty/agriculture/agri02/lesson.htm กล่าวโดยสรุปดังนี้

สารที่พบในพืชประกอบด้วย สารปฐมภูมิ (Primary Constituents) และสารทุติยภูมิ (Secondary Constituents) สารปฐมภูมิประกอบด้วยแป้ง โปรตีน ไขมัน เซลลูโลส ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารที่พืชสร้างจาก Intermedial basic metabolism มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ มีโครงสร้างง่ายๆไม่ซับซ้อน สารทุติยภูมิกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางเคมี (Chemotaxonomy Group) ประกอบด้วยแอลคาลอยด์(Alkaloid) ไกลโคไซด์ (Glycoside) แทนนิน (Tannins) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) สเตอรอยด์ (Steroid) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) ยางไม้ (Gums) และอื่นๆ

1. แอลคาลอยด์

แอลคาลอยด์เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีไนโตรเจน มีสมบัติเป็นเบส พบในพืช มีโครงสร้างซับซ้อนแตกต่างกัน มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถสกัดด้วยกรดอ่อน เมื่อนำสารสกัดไปทำปฏิกิริยากับเบสจะได้แอลคาลอยด์อิสระ ใช้เป็นเป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ แอลคาลอยด์ส่วนมากมีผลต่อความว่องไวเชิงสรีรวิทยา เช่น อะโทรเพน (Atropane) โคเคน (Cocatine) มีสมบัติคล้ายสารเสพติด และเป็นยาแก้ปวด ควินิน (Quinine) รักษาโรคมาลาเรีย

2. ไกลโคไซด์

ไกลโคไซด์เกิดจาก aglycone หรือ genin จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycone part) ละลายน้ำได้ดี ไกลโคไซด์จำแนกตามโครงสร้างของ aglycone ได้หลายประเภท เช่น คาร์ดิเอ็ก ไกลโคไซด์ (Cardiac glycisides) แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ (Antraw quinonne glycosides) ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycosides) ไซยาโนเจนนิติก ไกลโคไซด์ (Cyanogenatic glycosides) ไอโซไทโอไซยาเนท ไกลโคไซด์ (Isothiocyanate glycosides) ฟลาโวนอล ไกลโคไซด์ (Favonol glycoside) แอลกอฮอลิค ไกลโคไซด์ (Alcoholic glycosides)

3. แทนนิน

แทนนินพบในพืช มีโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อน เป็นกรดอ่อน มีรสฝาด เมื่อรวมกับโปรตีนจะให้สารที่ไม่ละลายน้ำ ใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้และใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ถ้ารับประทานเป็นประจำอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม เปลือกอบเชย ใบฝรั่ง เมื่อทาผิวหรือเยื่อบุอ่อนที่เป็นโรค หรือได้รับอันตราย แทนนิน จะสร้างฟิล์มปกคลุม ทำให้ผิวไม่ไวต่อความรู้สึกเจ็บปวด จะหยุดการหลั่งสารและทำให้หายคัน

4. ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารมีสีเช่นสารสีแดง (carthamim) จากดอกคำฝอย สารสีเหลือง (luleolin) จากดอกสายน้ำผึ้ง

5. สเตอรอยด์

สเตอรอยด์เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฮอร์โมนและยาต้านอักเสบ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยา

6. เทอร์ปีนอยด์

เทอร์ปีนอยด์ พบมากในพืช เป็นองค์ประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหย เช่น ลิโมนีน (limonene) ซิโทรเนลลอล (citronellol) เป็นต้น

7. น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย เป็นของเหลวมีกลิ่นหอมเฉพาะ ระเหยได้ในอุณหภูมิห้อง เบากว่าน้ำ สามารถสกัดออกมาจากส่วนของพืชได้โดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำหรือการบีบใช้เป็นสารแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง และ สมุนไพร และใช้ขับลม ฆ่าเชื้อโรค

8. ยางไม้

ยางไม้เป็นของเหนียวที่พบในพืช จะไหลออกมาเมื่อพืชถูกกรีด บางชนิดนำมาใช้ในการเตรียมยาจำพวกอีมัลชั่นในทางเภสัชกรรม เช่น กัมอะเคเชีย (gum acacia) และกัมทรากาคานท์ (gum tragacanth)

9. สารอื่นๆ

ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เอ็นไซม์ วิตามิน เรซิน และบาลซัม

2.5 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพร

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 19-55) และชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551 : 78-80) กล่าวโดยสรุปดังนี้

การตรวจสอบประเภทของสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑธรรมชาติจากพืช ต้องทราบว่าปฏิกิริยาการตรวจสอบเหลานี้ไมจำเพาะเจาะจง และการใหผลบวกก็เปนเพียงการบอกถึงประเภทของสารผลิตภัณฑธรรมชาติบางชนิดเทานั้น เพราะสารประกอบบางชนิดมีโครงสรางคลายกันแต่เป็นสาร
ตางกลุมกันจะใหผลบวกลวง ในอีกแงหนึ่งการใหผลลบก็อาจเกิดจากสารประกอบที่นำมาทดสอบมีความเขมขนต่ำเกินไป หรือมีปริมาณไมพอตอการตรวจสอบดวยสารเคมี การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี ดังนี้

2.5.1 การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือการเกิดตะกอน

โดยการนำสารตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาเคมีจะปรากฏสี หรือเกิดการขุ่น (turbidity) หรือเกิดตะกอน เป็นวิธีที่มีความไว (sensitive) สูง แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มสารเคมีและต้องระวังปริมาณน้ำยาตรวจสอบที่ใช้และภาวะที่เหมาะสม

1. กลุ่มคาร์โบไฮเดรต

ใช้ปฏิกิริยามอลลิช (Molisch’s test) การเกิดวงแหวนสีมวงแดงที่รอยตอระหวางชั้นของเหลวกับ Molisch reagent การตรวจสอบสมบัติการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing agent) ของโมโนแซคคาร์ไรด์ และไดแซ็กคาร์ไรด์ ใช้สารละลายเฟทลิ่ง (Fehling’s solution) ถ้ามีจะเกิดตะกอนแดงของคิวปรัสออกไซด์ (cuprous oxide)

การตรวจสอบน้ำตาลดีออกซี (deoxysugar) ใช้ปฏิกิริยาเคอเลอขคิเลียนี (Keller-Kiliani test) โดยละลายน้ำตาลในกรดน้ำส้มที่มีสารเฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride) ละลายอยู่เล็กน้อยเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถ้ามีน้ำตาลดีออกซีจะเห็นสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้นตรงรอยต่อของชั้นสารละลายและจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

2. กลุ่มแอลคาลอยด์

อัลคาลอยเปนสารที่มีฤทธิ์เปนดางและมีไนโตรเจนเปนองคประกอบในโมเลกุล true alkaloids ตองมีไนโตรเจนอยูใน heterocyclic ring และมีสูตรโครงสรางทางเคมีที่ซับซอน สามารถตรวจสอบดวยน้ำยาทดสอบเบื้องตน เชน Dragendorff’s reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีแดงอิฐหรือสีส้ม Kraut’s reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีสมน้ำตาลแดง Marme’s reagent (potassium cadmium iodide) เกิด ตะกอนสีขาว และ Hager’s reagent (picric acid) เกิดตะกอนสีเหลือง ทั้งนี้สารที่ใชตรวจสอบอัลคาลอยด เชน Mayer reagent, Dragendorff reagent, Wagner reagent และ Ammonium reineckate จะใหผลบวกลวงกับ coumarins, polyphenols, purines, amino acids, proteins และ

สารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ซึ่งมักพบไดในสาร สกัดจากพืช ในทางตรงกันขามอัลคาลอยดไมทุกชนิดที่อาจพบไดในสารสกัดจากพืชจะใหผลบวกกับสารทดสอบเหลานี้ เพราะลักษณะเฉพาะหรือคุณสมบัติเฉพาะของโครงสรางทางเคมี

3. กลุ่มไกลโคไซด์

3.1 กลุ่มคาร์ดิแอกกลุ่มไกลโคไซด์

ภายในโครงสรางทางเคมีประกอบดวย steroids nucleus, unsaturated lactone ring และ rare sugar ซึ่งมีความสำคัญในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแตละสวนในโครงสรางทำไดดังนี้

1. Steroid nucleus ใชวิธี Liebermann-Burchard test ใหสีฟาหรือเขียว สารทดสอบตองแหงและปราศจากน้ำ
2. Unsaturated lactone ring ตรวจสอบดวย Kedde reagent หรือ Raymond reagent ใหสีมวง น้ำเงิน หรือ Baljet reagent ใหสีสม-แดง
3. Deoxy sugar ตรวจสอบดวย Killer-Kailiani test ใหวงแหวนสีมวงแดงที่รอยต่อระหวางชั้นของเหลว ทั้งนี้สารประกอบหลายชนิดในกลุม sesquiterpene lactones และ cardiacglycosides ที่มีโครงสราง เปน unsaturated lactones จะใหผลบวกกับการทดสอบดวย Kedde reagent, Baljet reagent และ Legal reagent

3.2 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์

ซาโปนินไกลโคไซด์เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีโครงสร้างทางเคมีแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของอะไกลโคน (aglycone) คือ สเตียรอยดอลซาโปจินิน (steroidal sapogenin) และไทรเทอร์พีนอยด์ซาโปจินิน (triterpenoid sapogenic) การตรวจสอบเบื้องต้น จากการเกิดฟองเมื่อเขยากับน้ำ ฟองรูปหกเหลี่ยมจะคงอยูนานกวา 15 นาที และคุณสมบัติการทำใหเม็ดเลือดแดง แตกออก นอกจากนี้ยังตรวจสอบดวย Liebermann-Burchard test โดย steroidal saponins ใหสีฟา-เขียว ในขณะที่ triterpenoid saponins ใหสีมวงแดง

3.3 กลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

สารในกลุมนี้ประกอบดวยสวนของ aglycone ของanthraquinones และน้ำตาล ซึ่งanthraquinones มีคุณสมบัติละลายไดดีในดาง แลวเกิดเปนสีชมพูหรือแดง ดังนั้นจึงไฮโดรไลซ anthraquinone glycosides ดวยกรดหรือดาง หรือ $FeCl_3$ หรือ sodium dithionate ใหกลายเปน aglycone ของ anthraquinones แลวจึงสกัดออกมาดวยตัวทำละลายอินทรีย จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรียมาทดสอบกับดางจะพบสีชมพู-แดง การทดสอบนี้เรียกวา Borntrager test

3.4 กลุ่มไซยาโนจินิกส์ไกลโคไซด์

ทดสอบดวยวิธี Grignard test และ Guaiac-copper sulfate paper วิธีที่นิยมใช้กันมากคือวิธีที่ใช้กระดาษพิเครท เนื่องจากสามารถตรวจหากรดไฮโดรไซยานิกไดแม้ว่ามีปริมาณน้อยขนาด 1 ไมโครกรัมหรือต่ำกว่าได้ ในการจรวจหากรดไฮโดรไซยานิกมีข้อระวัง คือหากผลการตรวจสอบเป็นผลบวก มิได้หมายความว่าในพืชตัวอย่างนั้น มีไซยาโนจินิกไกลโคไซด์อยู่เป็นองค์ประกอบเสมอไป พืชนั้นอาจจะมีไซยาโนจีนิกไลปิด (cyanogenic lipid) ซึ่งจะถูกไฮโดรไลซ์ได้โดยเอนไซม์ไลเปส (lipase enzyme) ที่อยู่ในพืชนั้นและให้กรดนี้ออกมาหากผลการตรวจสอบให้ผลบวกตั้งแต่ช่วงเวลา 16-24 ชั่วโมง ในกรณีนี้กรดไฮโดรไซยานิกที่ถูกปล่อยออกมาส่วนใหญ่เกิดจากสารเคมีที่ระเหยได้ตัวอื่นๆ มากกว่าจะมาจากไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ สารเคมีเหล่านี้อาจเป็นพวกไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) หรือพวกอัลดีไฮด์ที่ระเหยได้ (volatile aldehydes) หรือแม้แต่พวกสารอินทรีย์ไทโอไซยาเนส (thiocyanates) และไนไทรต์ (nitrites) ก็ให้ผลบวกในการตรวจสอบเช่นเดียวกัน ฉะนั้นช่วงเวลาที่ถือว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกควรอยู่ในช่วง 15 นาทีถึง 3 ชั่วโมงเท่านั้น

การตรวจหาไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ในพืชตัวอย่างควรทำการเปรียบเทียบกับพืชชนิดเดียวกันแต่ใช้ภาวะเงื่อนไขที่แตกต่างกัน เช่น หลอดทดลองหนึ่งมีการเติมเอนไซม์อิมัลซิน(emulsion) กับ (linamarase) ลงไป แต่อีกหลอดหนึ่งไม่ต้องเติม เพื่อให้แน่ใจว่าผลการตรวจสอบเป็นผลบวกจริง เนื่องจากพืชบางชนิดถึงแม้จะมีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบจริง แต่อาจขาดเอนไซม์ เบตา-กลูโคซิเดสร่วมอยู่ในพืชนั้น จึงเติมเอนไซม์ทั้งคู่ลงในหลอดทดลองหลอดหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบกันจะช่วยในการตัดสินใจว่าผลการตรวจสอบนั้นเป็นผลบวกจริง

3.5 กลุ่มไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์

การตรวจหาไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์อาจตรวจในสภาพของไกลโคไซด์หรือตรวจหาผลิตภัณฑ์ของไกลโคไซด์จากการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ (enzymic hydrolytic products) เช่น ตรวจหาน้ำตาลกลูโคสหรือหมู่ซัลเฟตหรือโมเลกุลของไอโซไทโอไซยาเนต

การตรวจหาในสภาพไกลโคไซด์จัดเป็นวิธีที่นิยมและง่ายต่อการตรวจหา โดยนำพืชที่ต้องการมาต้มในแอลกอฮอล์เดือด เพื่อขจัดฤทธิ์ของเอนไซม์ จากนั้นทำการสกัดพืชด้วยน้ำต้มเดือดหรือเอทานอลหรือเมทานอล หากพืชมีองค์ประกอบเป็นพวกไขมันมากควรกำจัดไขมันออก แล้วทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator) และแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ซึ่งมีอะลูมินา (alumina) เป็นตัวดูดซับหรือมี เรซินชนิดแลกเปลี่ยนประจุลบได้ (anion exchange resin) เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออน นำไกลโคไซด์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกในสารละลายผสมของแอลกอฮอล์และน้ำ จากนั้นศึกษาเอกลักษณ์ของไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ด้วยเปเปอร์โครมาโทกราฟีหรือรงคเลขกระดาษ (paper chromatography) ในระบบตัวทำละลาย (solvent system) ของบิวทานอล-กรดแอซิติก- น้ำ (butanol-acetic acid-water) จากนั้นฉีดพ่นด้วย 0.2 โมลาร์ของ ซิลเวอร์ไนเทรต (silver nitrate) และอบให้แห้งด้วย 0.2 โมลาร์ของโพแทสเซียมไดโครเมต (potassium dichromate) ถ้าหากเป็นไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ จะสังเกตเห็นจุดสีเหลือปรากฏขึ้นบนพื้นสีแดง

3.6 กลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์

ฟลาโวนอยดแบงออกเปน typical flavonoids, related flavonoids และ miscellaneous flavonoids การตรวจสอบสารในกลุมนี้ ทำไดดังนี้

1. Shibata's reaction หรือ Cyanidin test เปนการตรวจสอบโครงสรางหลักของฟลาโวนอยด หากมีโครงสรางเปน benzo-pyrone ที่เปนโครงสรางสวนสำคัญใน flavones, flavonols, flavanones, flavanonols และ isoflavones จะเกิดปฏิกิริยากับแมกนีเซียมโดยมีกรดไฮโดรคลอริก เขมขนชวยละลายแมกนีเซียมและเรงปฏิกิริยา ไดผลบวกเปนสารละลายสีสม แดง หรือชมพู

2. Pew test ใชหลักการเดียวกันกับ cyanidin test แตใชสังกะสีเปนตัวเรงปฏิกิริยา ผลบวกจะใหสารละลายเปนสี สม แดง แตสีที่เกิดขึ้นจางกวาวิธี cyanidin test

3. Ferric chloride (FCl_3) test เปนการตรวจสอบ phenolic group ในโครงสราง ซึ่งพบไดใน flavonoids, tannins, coumarins, quinones และสารที่ประกอบดวย phenolic group ผลบวกจะเกิดตะกอนหรือสารละลายมีสีเขียว น้ำเงิน หรือดำ

4. Bromine water เปนการตรวจสอบสารในกลุม proanthocyanidins ที่เปนองคประกอบใน condensed tannins ผลบวกเกิดตะกอนสีเหลือง ซึ่ง flavonoids กลุมอื่น ๆ จะใหผลลบ

5. Molisch's test เปนการทดสอบสารกลุมคารโบไฮเดรต หากพบน้ำตาลซึ่งเปนสวนหนึ่งของ glycosides จะพบวงแหวนสีมวงที่รอยตอระหวางชั้นของเหลว และในบางครั้งพบสีมวงกระจายอยูทั่วไปในชั้นลางที่เปนชั้นกรดซัลฟวริก เขมขน

6. การตรวจสอบโดยใชสารละลายกรดและดาง จะพบวาฟลาโวนอยดมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงสีไดตามสภาพความ เปนกรดหรือดาง หากเปนสารกลุม anthocyanins เมื่ออยูในสภาวะกรดจะใหสีแดง และในสภาวะดางจะใหสีมวง หรือน้ำเงิน หากเปนสารกลุม chalcones และ aurones เมื่ออยูในสภาวะกรดจะใหสีแดง และในสภาวะดางจะใหสี สมหรือแดง ทั้งนี้สารในกลุมฟลาโวนอยดจะใหผลบวกกับ Shinoda test และกรดซัลฟวริก ในขณะที่สารพวก polyphenols ชนิดอื่นก็สามารถใหผลบวกลวงกับสารทดสอบเหลานี้ดวย

4. กลุ่มคูมาริน

คูมารินเปนสารที่มีโครงสรางพื้นฐานเปน benzo-pyrone หรือ phenylpropanoid lactone หรือ benzopyran-2-one ตรวจสอบดวยการนำสารสกัดดวยแอลกอฮอลมาละลายในเอธานอลแลวกรอง จากนั้นนำไปชุบดวยกระดาษ กรอง แลวจึงหยดดวย 10% NaOH จะพบการเรืองแสงที่ long wave UV (365 nm)

5. กลุ่มแทนนิน

แทนนิน เปนสารจำพวก polyphenols แบงออกเปน 3 กลุม คือ 1). hydrolyzable tannins ที่โครงสรางทางเคมี ประกอบดวย phenolic acids และน้ำตาล เมื่อตมในกรดหรือใชเอนไซมจะกลายเปน กรดและน้ำตาล 2). condensed tannins มีโครงสรางเปน oligomer หรือ polymer ที่มี monomer เปน catechins (flavan-3-ol) ซึ่งอาจจัดเปน proanthocyanidins

ของ flavonoids เมื่อนำไปตมกับกรดจะเกิดตะกอนสีแดงที่เรียกวา phloba phene จึงเรียกสารเหลานี้วา phlobatannins และ 3). pseudotannins เปนสารเชิงเดี่ยวมีขนาดโมเลกุลเล็ก แทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานและ ตกตะกอนอัลคาลอยดได จึงทำใหอัลคาลอยดหมดฤทธิ์ทางชีวภาพ การตรวจสอบแทนนินอาศัยการเกิดตะกอนระหวาง แทนนินกับ gelatin, lead acetate, zinc acetate หรืออัลคาลอยด ไดดังนี้

1. การตรวจสอบดวย gelatin สารจำพวก true tannins จะเกิดตะกอนคงตัวกับ gelatin แตสารจำพวก pseudotannins จะเกิดตะกอนที่ไมคงตัว

2. การตรวจสอบดวย bromine water หากเปน condensed tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine water

3. การตรวจสอบดวย $FeCl_3$ หากเปน hydrolyzable tannins จะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน ในขณะที่ condensed tannins จะเกิดตะกอนสีเขียว สำหรับสารอื่น ๆ ที่ประกอบดวย phenolic group เชน flavonoids และ coumarins จะเกิดสี เขียวหรือน้ำเงิน ในขณะที่สารพวก polyphenols อื่น ๆ จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลกับสารละลาย ferric chloride (5%) ในน้ำหรือเอธานอล

4. การตรวจสอบดวย vanillin reagent และกรดไฮโดรคลอริกเขมขน พบวา condensed tannins จะเกิดสีแดง

6. กลุ่มเทอร์พีนอยด์

การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์อาศัยหลักการเกิดสีกับน้ำยาทดสอบบางชนิด เช่น น้ำยา 2,6-ได-เทอร์-บิวทิว-พารา-ครีซอลในเอทานอล (2,6-di-tert-butyl-p-cresol in ethanol) ใช้ตรวจสอบเพนตาไซคลิกไทรเทอร์พีนอยด์ (pentacyclic trirerpenoids) ให้สีม่วง หรือใช้น้ำยากรดคลอโรซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ไทรเทอร์พีนอยด์ให้สีแดง เป็นต้น

2.5.2 การตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547 : 77-79) กล่าวไว้สรุปได้ดังนี้

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการตรวจสอบเอกลักษณ์ที่สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ โดยประเมินค่า R_f (Relative Front หรือ Retardation Factor) หรือค่าอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ สีและความเข้มข้องสีเปรียบเทียบกับสารอ้างอิง (Reference substance) หรือสารมาตรฐาน (Standard substance) ในกรณีที่ไม่มีสารอ้างอิงหรือสารมาตรฐาน อาจใช้พิมพ์ลายนิ้วมือ (fingerprint) ของโครมาโทแกรม (chromatogram) ของสมุนไพรนั้นเนื่องจากไม่มีพืชสมุนไพรใดที่มีองค์ประกอบและปริมาณสารที่เหมือนกันทุกอย่าง ทำให้ได้ลักษณะโครมาโทแกรมเฉพาะตัวของพืชสมุนไพรนั้น

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
น้ำมันหอมระเหย (essential oils)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน: เอทิลแอซีเทต (toluene :ethyl acetate) 73:7	วานิลลิน : กรดซัลฟิวริก (vanillin : sulphuric acid) ให้สีแดง หรือน้ำเงิน
แอลคาลอยด์ (alkaloids)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม(methanol chloroform) 85 : 15 หรือ โทลูอีน : เอทิลแอซีเทต: ไดเอทิลเอไมด์ (toluene : ethyl acetate : diethylamine) 70:20:10	น้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ให้สีส้ม
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เอทิลแอซีเทต : เมทานอล : น้ำ (ethyl acetate : methanol : water) 65:35:10 หรือ เอ็นบิวทานอล : กรดแอซีติก : น้ำ (n-buthanol : acetic acid :water) 4:1:5	น้ำยาเดคเด (Kedde reagent) ให้สีชมพู หรือน้ำเงินอมม่วงกับพวกคาร์ดีโนไลด์ (cardenolide) แอนติโมนีคลอไรด์ (antimony chloride) ให้สีน้ำเงินหรือเรืองแสงสีเหลืองอมเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm กับพวกบิวฟาไดอีโนไลด์ (bufadienolide)
ซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	ไซโคลเฮกเซน : ไดเอทิลเอมีน (cyclohexane : diethylamine) 9:1 หรือ คลอโรฟอร์ม : โทลูอีน: คลอโรฟอร์ม :เมทานอล: น้ำ (chloroform :methanol :water) 64:50:10	วานิลลิน: กรดซัลฟิวริก (vanillin :sulphuric acid) ให้สีน้ำเงิน

ตารางที่ 2.1 แสดงการตรวจสอบสารโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection Agent)
แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquuinone glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene : chloroform) 9:11 หรือ โทลูอีน : แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene : acrtone :chloroform) 40:25:35 หรือ แอซีเทต : เมทานอล : น้ำ(ethyl acetate:methanol:water) 100:13.5:10	ปฏิกิริยาบอนเทรเกอร์ (Borntraeger reaction) แอนทราควิโนนให้สีแดงหรือเรืองแสงสีแดงเมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) 365 nm แอนโทรน (anthrone) ให้สีเหลืองหรือเรืองแสงสีเหลือง
ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม :แอซิโทน : กรดฟอร์มิก (chloroform : acetone : formic acid) 75:16.5 :8.5 หรือ เอทิลแอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate : methanol:water) 100:13.5:10 หรือ โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (toluene: chloroform) 9:11	เนเซอรัล โปรดักส์ (ไดฟีนิลโบริล ออกซีเอทิลลามีน) -พอลีเอทิลีนไกลคอล) (natural products (dephenylboryloxyethylamine)-polyethylene glycol) แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) –ถ nm เรืองแสงสีเหลือง ส้ม หรือเขียว
คูมารินไกลโคไซด์ (coumarin glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน :แอซีโทน :คลอโรฟอร์ม (toluene :acetone: chloroform) 40 : 25:35 หรือ โทลูอีน:คลอโรฟอร์ม (toluene:chloroform) 9:11	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) หรือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) เรืองแสงสีน้ำเงินหรือเขียวที่ความยาวคลื่น 365 nm
อิริดอยด์ไกลโคไซด์ (iridoid glycosides)	ซิลิกาเจล (silica gel)	โทลูอีน : แอทิลแอซีเทต (toluene:ethyl acetate) 93:7 หรือ คลอโรฟอร์ม : กรดแอซีติก : น้ำ (chloroform : acetic acid : water) 80:10:5:2:6	กรดเกลือ-กรดแอซีติก (hydrochloric acid: acetic acid) ให้สีน้ำเงินหรือน้ำตาล
แทนนิน (tannin)	ซิลิกาเจล (silica gel)	เอ็น-บิวทานอล: กรดแอซีติก: น้ำ (n-butanol:acetic acid:water) 4:1:5 หรือ เอ็นบิวทานอล:โทลูอีน: เมทานอล : กรดแอซีติก : น้ำ (n-butanol: acetic acid:water) 80:10:5:2:6 หรือ เบนซีน:ไดออกเซน : กรดแอซีติก 90:25:4	1% เมทานอลิกเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% methanolic ferric chloride) ให้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน
แทนนิน (tannin)	ซิลิกาเจล (silica gel)	คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (chloroform: methanol) 95:5 เอทิลแอซีเทต :เมทานอล :น้ำ (ethyl acetate:methanol :water) 77:15:8	กรดซัลโฟนิก (chlorosulfonic acid) ให้สีแดง

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547 : 77-79

2.6 เทคนิคการแยกสารจากพืชสมุนไพร

ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัติ์ (อ้างในธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551 : 81-85) กล่าวโดยสรุปดังนี้

เทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่นิยมใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ไดแก่ Solid phase extraction (SPE) ,thin layer chromatography (TCL), column chromatography (CC) และ high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น ซึ่งการจะเลือกใช้เทคนิคใดนั้นจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการแยกสารและชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด ดังจะกล่าวถึงในรายละเอียดต่อไปนี้

1. Solid phase extraction (SPE)

Solid phase extraction เป็นการแยกสารโดยให้สารที่สนใจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่สารที่ไม่สนใจหรือไม่ต้องการจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะสารที่สนใจให้ออกจากคอลัมน์ในภายหลัง โดยทั่วไปสารที่สนใจจะจับอยู่กับวัฏภาคคงที่ (Stationary phase)ซึ่งเป็นสารดูดซับ (adsorbent) ที่มีรูปร่างเป็นเม็ดเล็ก (bead) หรือเรซิน (rasin) ซึ่งอาจเป็น normal phase, reverse phase หรือ ion-exchange media ก็ได้ และสามารถบรรจุไว้ในคอลัมน์ได้ซึ่งโดยทั่วไปมักเป็นไซริงค์ (syring) ตัวอย่างเช่น นำสารที่สกัดด้วยน้ำมาแยกด้วย SPE ที่มีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase พบว่าสารที่มีขั้วต่ำจะติดอยู่ในคอลัมน์แต่สารที่มีขั้วสูงจะถูกชะออกมาก่อน จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่มีขั้นต่ำชะสารที่ติดอยู่ในคอลัมน์ออกมา ซึ่งสารที่ถูกชะออกมานี้ค่อนข้างจะบริสุทธิ์ ในปัจจุบันได้มีการนำ SPEไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีขั้วต่ำ โดยสารที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วต่ำจะจับอยู่กับเรซินที่เป็น reverse phase การแยกสารโดยปรับความแรงของ eluting power ให้เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เพื่อชะสารออกมาเป็นลำดับตามความมีขั้ว ใช้ศึกษาความเหมือนกันของสารเนื่องจากสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันจะจับกับวัฏภาคคงที่ได้เหมือนกันและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้เหมือนกันอีกด้วย จึงช่วยในการจัดสินใจว่าสารสกัดหยาบที่แยกด้วย SPEมาแล้วจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับที่เคยแยกได้หรือไม่ นอกจากนี้ยังใช้ SPE เตรียมสารปริมาณมากให้บริสุทธิ์ขึ้น หรือนิยมใช้แยกสารสกัดหยาบก่อนที่จะแยกต่อไปด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีชนิดอื่น ซึ่งการแยกในขั้นแรกด้วย SPE นี้เรียกว่า clean-up โดยจะแยกสารปนเปื้อนจำนวนมากออกไปจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สนใจ เช่น การใช้ SPEกำจัดสารที่มีขั้วจำนวนมากที่ไม่ต้องการและมีที่มาจาก buffer salt หรือส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ใช้SPE ในการเตรียมสารให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยผ่านสารละลายที่เจือจางลงไปในคอลัมน์ SPE จากนั้นชะสารที่ต้องการซึ่งติดค้างอยู่บนคอลัมน์ให้ออกมาโดยใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อยๆ นิยมใช้ SPE เพื่อเตรียมสารในปริมาณน้อยมาก เช่น เมแทบอไลท์ของยาในตัวอย่างเลือด สารปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในน้ำทะเล และสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในทะเล ให้บริสุทธิ์มากขึ้น ก่อนนำไปแยกต่อไปด้วยเทคนิคอื่นทางโครมาโทกราฟี

2. Thin layer chromatography (TCL)

Thin layer chromatography สามารถแย่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของวัฏภาคคงที่ คือnormal phase TCL และ reverse phase TCL หากเป็น normal phase TCL สารที่มีขั้วต่ำจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วสูง ในขณะที่ reverse phase TCL สารที่มีขั้วสูงจะเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าสารที่มีขั้วต่ำ โดยทั่วไปนิยมทดลองแยกตัวอย่างด้วย TCL เพื่อหาค่า R_f ที่เหมาะสมของตัวอย่างที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะทำการแยกจริงด้วย column chromatography (CC) ค่า R_f ที่ดีจะต้องเป็นค่าที่ไม่ทำให้สารที่สนใจติดค้างอยู่จุดเริ่มต้นหรือเคลื่อนที่ด้ำกลเกินไปจนใกล้หรือคิดตัก solvent front เมื่อหาสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เหมาะสมแล้วจึงนำตัวอย่างที่ต้องการแยกในปริมาณสูงขึ้นมาแยกในคอลัมน์ต่อไป อย่างไรก็ตามไม่สามารถนำสภาวะหรือสัดส่วนขององค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ได้จาก TCL มาใช้กับ CC ได้โดยตรง เนื่องจากคอลัมน์เป็นการเคลื่อนที่แบบสองทิศทางและมีสมดุลเกิดขึ้นในคอลัมน์ แต่ TCL นั้นมีสมดุลระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตลอดระยะทางที่สารเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อต้องการนำสภาวะของวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ใน TLC ไปใช้ในการแยกสารด้วย CC จึงแนะนำให้ลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน TLC ลงเล็กน้อย(ในกรณีที่วัฏภาคคงที่เป็น normal phase) และเพิ่มความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ทีใช้ใน TLC มากขึ้นเล็กน้อย (ในกรณีวัฏภาคคงที่เป็น reverse phase) เพื่อให้การแยกสารในคอลัมน์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

โดยทั่วไปมักใช้ TLC ร่วมกับ densitometric detector เพราะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง แยกสารได้รวดเร็วสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณสาร หรือใช้แยกสารเจือปนออกได้ นอกจากนี้ยังได้พัฒนามาเป็น high –performance TLC (HTLC) ซึ่งมีความหนาของวัฏภาคคงที่ที่บางลงและขนาดอนุภาคของวัฏภาคคงที่ที่เล็กลงด้วย จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดีขึ้น

3. Column chromatography (CC)

Column chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารที่ภายในคอลัมน์จะบรรจุวัฏภาคคงที่ชนิดต่างๆ เอาไว้ เมื่อบรรจุ (load) สารตัวอย่างที่ต้อการแยกให้บริสุทธิ์ไปบนคอลัมน์แล้ว จึงชะสารออกจากคอลัมน์ตามแบนด์ (band) ที่ปรากฏอยู่ในคอลัมน์ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมต่อไป

การแยกสารตัวอย่างในคอลัมน์ออกเป็นแบนด์อาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีซึ่งหมายถึงการกระจาย (distribution) ของสารระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคคงที่ ดังสมการต่อไปนี้

$$K_D = \frac{[X]_{stationary\ phase}}{[X]_{mobile\ phase}}$$

ความสามารถในการแยกสารเกิดจากอันตรกิริยา (interaction) ของสารกับวัฏภาคคงที่และการแย่งกันจับกับวัฏภาคคงที่ระหว่างสารกับวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว และวัฏภาคเคลื่อนที่อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ ซึ่งจัดเป็น liquid chromatography (CL) และgas chromatography (GC) ตามลำดับ นิยมใช้ GC โดยเฉพาะ Gas-liquid chromatography

(GLC) ในงานวิเคราะห์แต่ไม่สามารถใช้เทคนิคนี้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายได้ทุกชนิด โดยทั่วไปสามารถแบ่ง LC ออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ การแบ่งตามลักษณะทางกายภาพของระบบ ได้แก่ CC และ planar chromatography (TLC และ paper chromatography) สำหรับ countercurrent chromatography เป็นการแยกสารด้วยของเหลว 2 เฟสที่แบ่งออกเป็นวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ โครมาโทกราฟีส่วนมากมักบรรจุวัฏภาคคงที่ไว้ในคอลัมน์และมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว และการแบ่งตามลักษณะการแยกสารที่อาศัยแรงกระทำระหว่างโมเลกุล หรือลักษณะการแยกที่แตกต่างกัน เช่น การดูดซับ (adsorption) การแยกส่วน (partition) ประจุ (charge) ขนาด (size) และการจับกันของชีวโมเลกุล (biological affinity) เป็นต้น

การดูดซับ (adsorption) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของโมเลกุลระหว่างผิวหน้าของวัฏภาคคงที่กับวัฏภาคเคลื่อนที่ ณ ที่สมดุลพลวัต (dynamic equilibrium) ซึ่งจะมีสารเข้าและออกระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ในปริมาณที่เท่าๆ กัน เรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้ว่าการดูดซับ(sorption) และการคาย(desorption) ตามลำดับ โดยอาศัยแรงทางพันธุเคมีที่เป็นแรงอ่อนๆ เช่น hydrogen bond , Van der Waals force และ dipole-dipole interaction สารที่นิยมนำมาใช้เป็นสารดูดซับ (adsorbent) จะต้องคงตัวและไม่เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย เช่น silica, cellulose, styrene, divinylbenzene, alumina และ carbon เป็นต้น

การแยกส่วน (partition) เป็นการแบ่งภาคหรือแยกส่วนของสารที่อาศัยหลักการสกัดระหว่างของ เหลวกับของ เหลวโดยวัฏภาคคงที่เป็นของเหลวชนิดหนึ่งที่เคลือบอยู่บน solid support เช่น คอลัมน์ของ เซลลูโลสที่เคลือบด้วยน้ำ หรือ silica TLC plate ที่ดูดซับน้ำเอาไว้บนผิวหน้า ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวอีกชนิดหนึ่งที่เข้ากันไม่ได้กับของเหลวที่เป็นวัฏภาคคงที่จึงทำให้เกิดการสกัดระหว่างขั้นของของเหลว (liquid-liquid extraction) ซึ่งเป็นข้อดีของการแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี อย่าไรก็ตามเทคนิคนี้ก็มีข้อเสียคือวัฏภาคคงที่ที่เป็นของเหลวจะถูกชะออกไปจากคอลัมน์พร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ และเกิดการละลายของวัฏภาคคงที่ได้

โดยทั่วไปแล้ววัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวมักเกิดพันธะเคมีกับตัวรองที่เฉื่อย (inert support) ได้เป็น bonded phase ซึ่งหมายถึงพันธะที่คงตัว เช่น พันธะระหว่าง silanol group (Si-OH) บน silica support กับ chlorosilane ซึ่งสารจำพวก silane มักเป็นสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain)ที่มีคาร์บอนมาเชื่อมต่อกันยาวประมาณ 1,2,6, 8 หรือ 18คาร์บอน ดังนั้น bonded phase chromatography หรือ modified partition chromatography จึงเป็นการแยกสารที่อาศัยหลักการร่วมกันระหว่างการแยกส่วน (partition) และการดูดซับ (adsorption) สำหรับความแตกต่างระหว่าง normal phase กับ reverse phase คือ normal phase มีวัฏภาคคงที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น silica column มี silanol group ที่มีขั้วสูงกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ในขณะที่ reverse phase จะมีวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ เช่น สายไฮโดรคาร์บอนที่สร้างพันธะกับ silica support เป็นเสมือนวัฏภาคคงที่ที่มีขั้วต่ำและมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำที่มีขั้วสูง ซึ่งอาจผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น เมธานอล หรืออะซีโตไนไตร์ (acetonitrite) อย่างไรก็ตาม หากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่กำลังแยกอยู่นั้นมีขั้วต่ำและไม่ชอบน้ำ มันจึงอาจติดค้างอยู่ในคอลัมน์ได้ ดังนั้นจึงแนะนำให้ติดตามการชะสารออกจาก

คอลัมน์โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่อยู่ในส่วนสกัดต่างๆ ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย TLC เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสารใดติดค้างอยู่ในคอลัมน์

ประจุ (charge) สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายชนิดเมื่อมีการปรับเปลี่ยนค่าพีเอชของสารละลายด้วยกรดหรือด่างอาจจะทำให้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นถูกเปลี่ยนแปลงไปให้อยู่ในรูปของ ไอออนบวกหรือลบได้ ดังนั้นจึงนำคุณสมบัติการแตกตัวเป็นไอออนนี้มาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ดังต่อไปนี้

3.1 Ion-exchange chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารที่วัฏภาคคงที่ประกอบด้วยเมทริกซ์ที่ไม่ละลาย (insoluble matrix) บนผิวหน้ามีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นประจุลบหรือบวก ซึ่งหมู่ฟังก์ชันนี้จะสัมพันธ์กับไอออนตรงข้าม (counter-ion) ที่มีประจุตรงกันข้าม หลักในการแยกสารขึ้นอยู่กับความสามารถของไอออนสารตัวอย่างที่แข่งขันกับไอออนตรงข้ามในการเข้าจับกับวัฏภาคคงที่ เรียกระบบที่มีวัฏภาคที่เป็นประจุลบและไอออนตรงข้ามเป็นประจุบวกว่า cation- exchange chromatography และเรียกระบบที่มีวัฏภาคคงที่เป็นประจุบวกและไอออนตรงข้ามเป็นประจุลบว่า anion-exchange chromatography การแยกสารที่เกิดขึ้นจากแต่ละโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันที่ความแรงในการจับกับ exchange site จึงสามารถชะสารตัวอย่างออกมาตามลำดับโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะการแตกตัวของสารที่มีประจุ หรือการเพิ่ม ionic concentration ของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลเพิ่มการแย่งจับที่ exchange site และมีผลไล่ที่ไอออนของสารตัวอย่าง ความสามารถในการจับของสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของไอออนสารตัวอย่างและหมู่ฟังก์ชันบน ion exchange rasin ไอออนสารตัวอย่างที่จับกับวัฏภาคคงที่ได้ดีจะอยู่ในคอลัมน์ได้นานและถูกชะออกมาช้ากว่า ในทางตรงกันข้ามไอออนสารตัวอย่างที่จับได้ไม่มีจะถูกชะออกมาเร็วกว่า

3.2 Ion-pair chromatography / ion-suppression chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารที่สามารถแยกไอออนสารตัวอย่างได้ด้วยวัฏภาคคงที่มีขั้วต่ำ เช่น reverse phase modified partition column โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อลดการแตกตัวเป็นไอออนของโมเลกุลสารตัวอย่าง ทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างมีความเป็นกลาง(ไม่มีขั้ว) และสามารถจับกับวัฏภาคคงที่ที่ไม่มีขั้วได้ ในทำนองเดียวกัน ion-pair chromatography จะมีวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยโมเลกุลสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถแตกตัวได้ (ionizable group) และมีส่วนที่ชอบไขมัน (lipophillic region) ซึ่งทำหน้าที่เป็นไอออนตรงข้าม (counter-ion) ที่จะทำให้เกิด reversible ion-pair กับสารตัวอย่าง โดยมี ionic modifier ทำหน้าที่จับคู่ (pairing) กับไอออนสารตัวอย่าง ในสารละลายแล้วทำให้เกิดสปีชีส์ที่ไม่มีขั้วที่สามารถแยกส่วน (partition) เข้าไปในวัฏภาคคงที่ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุแล้วเกิดเป็นคู่ไอออน (ion –pair) กับสารตัวอย่างได้ ข้อดีของเทคนิคนี้คือใช้แยกสารตัวอย่างที่มีขั้วและไม่มีขั้วได้ในระบบเดียวกัน

ขนาด (size) โครมาโทกราฟีที่แยกสารตามขนาดของโมเลกุลนั้นจะไม่อาศัยการจับกันระหว่างสารตัวอย่างและวัฏภาคคงที่ การแยกสารด้วยเทคนิค size exclusion chromatography จะครอบคลุมถึง gel permeation chromatography และ gel filtration ซึ่งมีลักษณะของ packing material เป็นเม็ดเล็ก (bead) ที่ทำจากโพลิเมอร์ เช่น polyacrylamide , agarose หรือ silica โดยมีระดับของ polymer crosslinking ช่วยควบคุมความพรุนของเม็ดเล็กเหล่านี้ โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนได้และจะถูกชะออกมาก่อนในขณะที่โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนได้โมเลกุลสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่สุดจะสามารถแพร่เข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดเล็กที่สุดได้ ที่ว่างใน cross-linked polymer ทำหน้าที่เสมือนวัฏภาคคงที่ ซึ่งโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สุดจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดเล็กและไหลออกมาในทิศทางตรง ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างเม็ดเล็ก โมเลกุลที่มีขนาดรองลงมาจะมี diffusible volume มากกว่าทำให้ถูกชะออกมาได้หลายทิศทางและใช้เวลาในการชะออกมาจากคอลัมน์นานกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ โมเลกุลที่เล็กที่สุดสามารถแทรกเข้าไปในรูพรุนขนาดเล็กที่สุดได้และจะถูกชะออกมาทีหลังสุด size exclusion chromatography เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายมากและไม่ทำลายโครงสร้างทางเคมีของสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการแยกชีวโมเลกุลที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่าง กันมาก เช่น ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ออกจากเมแทบอไลท์ที่มีขนาดโมเลกุลเกล็กกว่ามาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากเมแทบอไลท์ทุติยภูมิมักมีขนาดโมเลกุลเล็กและมีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้ size exclusion chromatography ในการแยกสารเหล่านี้ ทั้งนี้มีข้อยกเว้นสำหรับ Sephadex LH20 ที่ยังคงนิยมนำมาใช้แยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพราะมีข้อดีที่สามารถใช้กับวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ไม่ใช่น้ำ (nonaqueoese) ได้

การจับกันของสารชีวโมเลกุล (biological affinity) มีความสัมพันธ์กับเทคนิค affinity chromatography ซึ่งเป็นการแยกสารที่ขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาอย่างจำเพาะเจาะจง(specific interaction) ของชีวโมเลกุล เช่น antibody-antigen interaction, enzyme-inhibitor interaction, DNA-DNA binding, DNA-protein interaction หรือ receptor –agonist/antagonist interaction โดยที่ลิแกนด์ (ligand) หรือรีเซปเตอร์ (receptor) จะจับกับ packing material ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) และทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ ของผสมจะไหลผ่านคอลัมน์ โมเลกุลที่มีความชอบจับอย่าจำเพาะเจาะจง (specific affinity) กับลิแกนด์จะถูกจับอยู่ในคอลัมน์ในขณะที่โมเลกุลอื่นที่ไม่มีความชอบจับอย่างจำเพาะเจาะจงจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ การชะสารทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและ/หรือองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ซึ่งจะทำให้แรงที่จับกันระหว่างสารตัวอย่างและลิแกนด์นั้นอ่อนลง โดยทั่วไปแล้วการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจะหมายรวมถึงการแยกสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นการแยกสารด้วยเทคนิคนี้จึงนับว่าเป็นแนวทางที่ดีในการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่อาศัยความจำเพาะเจาะจงทางชีวภาพ (biological specicity) อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกเมแทบอไลท์ทุติยภูมิในปริมาณมากด้วย affinity chromatography เนื่องจากเทคนิคนี้ทำได้ยากและต้องใช้เวลานานมากในการเตรียมลิแกนด์ที่เหมาะสมให้มีปริมาณเพียงพอต่อการแยกสารแต่ละครั้ง หากสารผสมเมื่อเริ่มต้นนั้นซับซ้อนเช่นในกรณีสารสกัดหยาบจากพืชหรือจุลินทรีย์ทีมักมีสารอื่นเข้ามารบกวนการแยกหรือขัดขวางการจับกันระหว่างรีเซปเตอร์และลิแกนด์ (receptor –ligand interaction) หรือสารเหล่านี้เข้าไปดูดซับแบบไม่

จำเพาะเจาะจงกับวัฏภาคคงที่ จะทำให้การแยกสารไม่สมบูรณ์ และยิ่งไปกว่านั้นการได้สารกลับคืนมา (recovery) จะขึ้นอยู่กับแรงที่จับกันอย่างผันกลับได้ ซึ่งการรบกวนของสารหลายชนิดอาจขัดขวางการได้สารกลับคืนมาด้วย

4. Gradient high performance liquid chromatography (Gradient HPLC)

Gradient high performance liquid chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงความต่างระดับของความมีขั้ว (gradient) ของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ตลอดเวลา เพื่อแยกของผสมและชะองค์ประกอบทุกชนิดให้ออกมาจากคอลัมน์ตามลำดับความมีขั้ว การชะสารออกจากคอลัมน์ด้วย gradient elution มีข้อดีกว่า isocratic elution ซึ่งมีสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์คงที่ตลอดเวลา ตรงที่สามารถแยกสารที่มีขั้วใกล้เคียงกันมากออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถแยกสารที่มีขั้วสูงและต่ำออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการคู่ต่อมาการใช้ประโยชน์ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเป็นจำนวนมาก เช่น HPLC-UV, GC-MS, HPLC-MS และ HPLC-NMR เป็นต้น การวิเคราะห์สารที่แยกออกมาจาก HPLC column ด้วย UV และ NMR จะสามารถนำสารนั้นกลับคืนมาได้ ในขณะที่การวิเคราะห์ GC และ MS ไม่สามารถนำสารที่ถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือดังกล่าวกลับคืนมาได้ อย่างไรก็ตามสารต่างชนิดกันอาจดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันได้ ทำให้ UV มีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ต่ำกว่า MS นอกจากนี้ MS ยังมีความไว (sensitivity) ที่สูงกว่า UV จึงสามารถวิเคราะห์สารในปริมาณต่ำมากได้ การแยกสารด้วย GC มีข้อด้อยกว่าการแยกด้วย HPLC เนื่องจาก GC เหมาะสำหรับการแยกสารที่สามารถระเหยได้และทนต่อความร้อน หากสารที่ต้องการแยกระเหยไม่ได้จะต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ที่ระเหยได้เสียก่อน จึงทำให้มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและเสียเวลามาก ดังนั้นในปัจจุบันจึงมักพบว่า HPLC-MS เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการศึกษาองค์ปีระกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ

2.7 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2546 : 56-65) กล่าวถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชกรรมและการใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษาสรุปได้ดังนี้

2.7.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. คุณสมบัติทางสรีระวิทยาและทางเคมี เช่นการละลาย
2. คุณสมบัติทางเคมี เช่น เรโซแนนซ์ ปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น ชนิดของพันธะเคมี
3. ข้อควรพิจารณา เช่น ขนาดของโมเลกุล สเตอริโอเคมี เป็นต้น

2.7.2 Bio-assaying

1. หลักในการคัดเลือกวัสดุจากพืชสมุนไพร เช่น การสกัดสารและการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารก่อนจะศึกษาผลทางชีวภาพ การวางแนวทางการดำเนินงานตามเงื่อนงำจากการประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในยาสมุนไพรและความเชื่อตามขนบธรรมเนียม การตรวจสอบคุณสมบัติด้านชีววิทยา ชีวเคมี ชีววิทยาโมเลกุล เคมีและกายภาพ

2. วิธีการคัดเลือกทางเภสัชวิทยา เป็นการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการ การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรีย เห็ดรา โปรโตซัว การทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดรักษาโรคเช่น โรคมะเร็ง การอักเสบ วิธีการเบื้องต้นที่ใช้เช่น Brine shrimps, Antibacterial screening, Hippocratic screening เป็นต้น

2.7.3 การสำรวจการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนา

การศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความหลากหลายของผลทางชีวภาพและสูตรโครงสร้างของสรออกฤทธิ์และเป้าหมายด้านเภสัชกรรมในการบำบัดรักษาที่ชัดเจน โดยอาศัยการพัฒนาในหลายสาขาวิชา เช่น พันธุกรรม ชีวโมเลกุล วิธีการทดสอบโดยใช้เทคนิคที่ทันสมัย

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชฎารัตน์ ดวงรัตน์ (2544) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองของสารสกัดจากต้นกระทุ่มน้ำเพื่อวัดความเป็นพิษและบ่งชี้ส่วนของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบว่า สารสกัดหยาบ ที่เป็น Crude alkaloids สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.62 μg/ml ซึ่งสูงกว่าสารมาตรฐาน 5-FU ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.47 μg/ml

เกสร นันทจิต (2545) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของใบขันทองพยาบาท โดยการสกัดสารจากใบขันทองพยาบาท ด้วย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี Agar Dilution Methods พบว่าสารสกัดหยาบ จาก เฮกเซน และเมทานอล ไม่มีฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *C.albicans* ATCC 90028, *A.flavus และ* และ *M. gypseum.ส่วนสารสกัดจาก* ไดคลอโรมีเทน มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *T.mentagrophytes* และ *T.rubrum* ต่ำ โดยมีค่าMIC เท่ากับ 3200 mg/ml

บุญส่ง คงคาทิพย์และคณะ (2545) ศึกษาการสกัด การแยกสารออกฤทธิ์จากต้นเบาหวานเพื่อแยกสารออกฤทธิ์ที่มีผลในการรักษาโรคเบาหวานและหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์พบว่า allantoin เป็นสารหนึ่งในต้นเบาหวานที่ออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด และการนำต้นเบาหวานต้มด้วยน้ำ น้ำที่ต้มเมื่อดื่มในปริมาณที่พอเหมาะ จะสามารถรักษาโรคเบาหวานได้

ปัทมาวดี เสตะกัณณะ. (2545) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย การผลิตยาต้านจุลชีพจากสมุนไพรไทยเพื่อทราบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพร 10 วงศ์ 20 ชนิด จำนวน 48 สารสกัด โดยวิธี Agar dilution ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 21 ชนิด 24 สายพันธุ์ และเชื้อรา 1 สายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่า สมุนไพร 17 ชนิด จำนวน 35 สารสกัด มีฤทธิ์ต้านจุลชีพบางชนิดได้ และไม่พบสารสกัดจากสมุนไพรใดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ทุกชนิด ในจำนวนนี้มีสมุนไพร 7 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้หลายชนิด และสมควรนำไปศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตยา ได้แก่ กะเม็ง (Eclipta prostrata L.), กระเจี๊ยบแดง (Hibiscus sabdariffa L) , โด่ดอกขาว (Elephantopus mollis H.B.K.) , ปีบ (Millingtonia hortensis L.f.) , ผักขมหิน (Boerhavia diffusa L.) , ยมหิน (Chukrasia tabularis A. Juss.) และเหงือกปลาหมอ(Acanthus ebracteatus Vahl)

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และคณะ (2546) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี โดยจากการนำ สารสกัดจากเอทิลแอซิเตต และ เอทานอล 22 ชนิด ซึ่งได้มาจากพืชในจังหวัดอุบลราชธานี 11 ต้น นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สิ่งสกัดจากใบพอกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลางในการต้านอนุมูลอิสระ และสิ่งสกัดจากเอทานอลของใบการเวก มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

วาทินี จตุรพรชัย (2546) ศึกษาการสกัดและผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศไทย โดยการทดสอบสารสกัดหยาบชั้นเอทอลแอลกอฮอล์ของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ 24 ชนิด ในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย 8 ชนิด ด้วยวิธี Well assay พบว่าสารสกัดจากใบพลูสามารถยับยั้งการเติบโตของ *E. coli, S. aureus, S.derby, S.Typhi, S. Typhimurium และ Lactobacillus sp.* ได้

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2547) ศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง พบว่าเมล็ดมะเกี๋ยงมีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟาโวนอยด์ ซาโปนิน แอนทราควิโนนกลัยโคซายด์และแทนนิน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี ABTS Assays และ DPPH Assays พบว่าสารสกัดด้วย n-butanol และ ethyl acetate (F3และF4) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนอื่น โดยมีค่า TEAC เท่ากับ 1.5108 และ 1.3943 กรัม/กรัม ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่า BHA , Quercetin แต่มีฤทธิ์มากกว่าBHT, Kaempferol และ Rutin และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี DPPH Assays พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ น้อยกว่า BHA, Quercetin , BHT แต่มีฤทธิ์มากกว่า Kaempferol

สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี่ยวไชยพันธุ์ (2548) ศึกษาการแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแกว๋นป่า โดยใช้วิธี DPPH และ เทคนิคโครมาโทกราฟฟี่ผิวบาง (TLC) พบว่าสารสกัดเมทานอลของผลมะแกว๋นป่ามีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่หลายชนิด การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ใช้คอลัมน์ซิลิกาเจลและคอลัมน์ของเรซิน Diaion HP-20 ตามลำดับ พบว่าสามารถแยกสารต้านอนุมูลอิสระได้โดยการใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 70 : 30 และสารต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้เป็นสารประกอบพวก Condensed tannin

เชฏฐ รัตนาจารย์ (2548) ศึกษาผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดไพรในชั้นของตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดี มีบริเวณยับยั้งระหว่าง 7.87-19.27 มิลลิเมตร แต่ยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้น้อย ส่วนสารสกัดไพลชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเมทานอลยับยั้งแบคทีเรียได้ดี

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิวของสารสกัดและน้ำหมักของพืชไทย พบว่าสารสกัดและน้ำหมักจากเปลือกมังคุด กระชายดำ มะขามป้อม มะเกี๋ยง ขมิ้นชันและใบบัวบก สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Propionibacterium acnes* ได้ดีแตกต่างกัน โดยสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม เปลือกมังคุด กระชายดำ ขมิ้นชัน ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่ต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้ดีคือสารสกัดจากมะขามป้อม กัดเปลือกมังคุด ขมิ้นชัน กระชายดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง ตามลำดับ น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มะขามป้อม กระชายดำ ใบบัวบก และมะเกี๋ยง น้ำหมักชีวภาพที่สามารถต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* ได้คือน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุดเท่านั้น และเมื่อนำน้ำหมักชีวภาพจากเปลือกมังคุด มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่

สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) โดยวิธี Broth dilution พบว่า ค่า MIC ของ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 1.5625 % และ *Propionibacterium acnes* เท่ากับ 6.25 %

Arina C.U. และคณะ (2002) ศึกษาสารต้านมาลาเรียจาก Parinari capensis พบว่าฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารสกัดจากเปลือกของ Parinari capensis (Chrysobalanceae ที่สกัดด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์ และไดคลอโรมีเทน จากการทดสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัด แยก ไดเทอร์ปีนแลคโตนได้ 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียโดยมีค่า IC_{50} 0.54 0.67 และ 1.57 mg/mL.

Arunporn Itharat et al. 2004 ศึกษาเรื่อง In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer โดยทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 สายพันธุ์ด้วยพืชสมุนไพรไทย 11 ชนิดที่ใช้โดยหมอพื้นบ้านในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง ขั้นตอนการสกัดที่ใช้มีความคล้ายคลึงวิธีดังเดิมโดยสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ สารสกัดถูกนำมาทดสอบ มีพืชจำนวน 3 ชนิดและมีพืชในวงศ์ CELASTRACEAE แสดงผลต่อเซลล์มะเร็ง

Pornpimon Mayachiew, Sakamon Devahasti. 2007. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดจาก gooseberry and galangal โดยการสกัดสารจาก Indian gooseberry (Phyllanthus emblica Linn.) and galangal (Alpinia galanga) ทดสอบกับ Staphylococcus aureus 2 วิธี คือ disc diffusion และ agar dilution methods พบว่ามีค่า MIC 3.97 และ 0.78 mg/ml ตามลำดับ ค่า MBC 13.97 และ 2.34 mg/ ml ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดด้วยวิธี b-carotene bleaching method มีค่าเท่ากับ 86.4% and 70.3% ตามลำดับ ค่าฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin–Ciocalteu method มีค่า 290.470.7 and 40.970.2 mg/g plant extract (in GAE) ตามลำดับ

Somtanuek Chotchoungchatchai et al. ศึกษาเรื่อง Medicinal plants used with Thai Traditional Medicine in modern healthcare services: A case study in Kabchoeng Hospital, Surin Province, Thailand พบว่ามีโรงพยาบาลใช้สมุนไพรในการรักษา 10 กลุ่มอาการของโรค ได้การรักษาความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ,กล้ามเนื้อและกระดูกผิดปกติของระบบและความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ปัจจัยความสำเร็จคือการอำนวยความสะดวก การใช้ยาสมุนไพรที่โรงพยาบาล รวมถึงเข้าใจที่ถูกต้องของการใช้ยาสมุนไพร และมีการสนับสนุนของการเพาะปลูกสมุนไพร การเก็บ โดยได้รับการยอมรับจากคนในท้องถิ่น

Arunporn Itharat et al. 2004 ศึกษาเรื่อง In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer โดยทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 สายพันธุ์ด้วยพืชสมุนไพรไทย 11 ชนิดที่ใช้โดยหมอพื้นบ้านในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งขั้นตอนการสกัดที่ใช้มีความคล้ายคลึงวิธีดังเดิมโดยสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ สารสกัดถูกนำมาทดสอบ มีพืชจำนวน 3 ชนิดแสดงผลต่อเซลล์มะเร็ง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนดำเนินการวิจัยดังนี้

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2 พืชและจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

3.3 วิธีการทดลอง

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5 ระยะเวลาทำการวิจัย

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องบดไฟฟ้า (Blender)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
3. ตู้อบ
4. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
5. เครื่องทำแสง UV
6. เตาไฟฟ้า
7. ชุดคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)
8. ชุด TLC
9. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
10. อัลตราไวโอเลต วิสเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer)
11. เครื่องวัดความชื้น (IR Sartorius Model รุ่น MA150C)
12. เครื่องวัดค่า พีเอช (pH-paper)
13. ตู้อบ (Hot air oven)
14. เตาเผา (Furnace)

3.1.2 สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane)
2. เอทานอล (Ethanol)
3. เมทานอล Methanol)
4. เอทิลอะซีเตต (Ethylacetate)
5. ไดคลอโรมีเทน (Dichlorometane)
6.. อะซีโตน (Acetone)
7. ซิลิกาเจล
8. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)
9. BHT (2, 6 – ditertiary –butyl-4-methyl phenol)
10. BHA (Butylated hydroxyanisole)
11. โซเดียมซัลเฟต (Na2SO4 anhydous)
12. กรดแทนนิค (Tannic acid)
13. กรดแกลลิค (Gallic acid)
14. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
15. สารละลายฟอร์ลิน (Folin ciocalteu reagent)
16. กลุ่มสารทดสอบพฤกษเคมี

3.2 พืชสมุนไพรและจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 พืชสมุนไพร

มะดูก ชื่อวิทยาศาสตร์ *Siphonodon celastrineus* Griff. จัดอยู่ในวงศ์ CELASTRACEAE

สมุนไพรมะดูก มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ว่า ยายปลวก (สุราษฎร์ธานี), ไม้มะดูก (คนเมือง), บั๊กโค้ก (เขมร-สุรินทร์) เป็นต้น

ต้น จัดเป็นพรรณไม้ยืนต้นขนาดกลาง ไม่ผลัดใบ ลำต้นมีความสูงได้ประมาณ 20-35 เมตร แตกกิ่งก้านทึบ เรือนยอดมีลักษณะกลมทึบ เปลือกต้นเป็นสีเทาอมดำแตกเป็นร่องตามยาว ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด การตอนกิ่ง และการปักชำกิ่ง จัดเป็นพรรณไม้กลางแจ้งที่เจริญเติบโตได้ดีในดินทุกสภาพ ชอบดินร่วนที่ระบายน้ำได้ดี มีแสงแดดเต็มวัน เป็นพรรณไม้ที่มักพบขึ้นตามบริเวณป่าราบ ป่าโปร่งที่ค่อนข้างชื้น โดยเฉพาะทางภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทย ที่ระดับความสูงไม่เกิน 800 เมตร จากระดับน้ำทะเล

ใบ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกัน ลักษณะของใบเป็นรูปค่อนข้างรีหรือรูปขอบขนาน ปลายใบแหลม โคนใบสอบแถบเข้าหากัน ส่วนขอบใบเป็นหยักหรือจักเป็นซี่ฟันตื้น ๆ จักห่างหรือแทบมองเห็นไม่ชัด ใบมีขนาดกว้างประมาณ 1-3.5 นิ้ว และยาวประมาณ 1.5-9 นิ้ว แผ่นใบค่อนข้างหนาคล้ายแผ่นหนัง ผิวใบด้านบนเป็นสีเขียวเข้ม เส้นแขนงใบมีข้างละ 6-10 เส้น ก้านใบยาวประมาณ 0.5-2 เซนติเมตร ใบอ่อนเป็นสีเขียวแก่ เมื่อแห้งแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอกหรือสีเขียวอมเทา

ดอก ออกดอกเป็นช่อกระจุกตามซอกใบ มีประมาณ 2-3 ดอก ก้านช่อดอกยาวประมาณ 0.5-1.5 เซนติเมตร ส่วนก้านดอกย่อยยาวประมาณ 5-11 มิลลิเมตร บางทีมีจุดสีน้ำตาลแดง ดอกเป็นสีขาวนวลหรือสีเหลืองอมส้ม กลีบดอกเป็นรูปไข่หรือรูปรี มี 5 กลีบ ซ้อนทับกัน มีขนาดกว้างประมาณ 1.7-2.5 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 2.2-3.5 มิลลิเมตร ปลายกลีบมน ส่วนกลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ โคนกลีบเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นรูปไจหรือกึ่งกลม ค่อนข้างมน ยาวได้ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร กลางดอกมีเกสรเชื่อมติดกับกลีบดอกข้างใน ดอกมีเกสรเพศผู้ 5 อัน ก้านเกสรเพศผู้แบนยาวได้ประมาณ 1 มิลลิเมตร เชื่อมติดกันที่ครึ่งหนึ่งหรือใกล้ ๆ โคนดอก ออกดอกในช่วงประมาณเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน

ผล ผลมีลักษณะเป็นรูปกลมหรือรูปรี ผลมีขนาดกว้างประมาณ 1-2.5 นิ้ว และยาวประมาณ 1.5-3 นิ้ว ผลอ่อนเป็นสีเขียว เมื่อแก่หรือสุกเต็มที่แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง ภายในมีเมล็ดรูปไข่หลายเมล็ด เป็นผลในช่วงประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ (https://medthai.com)

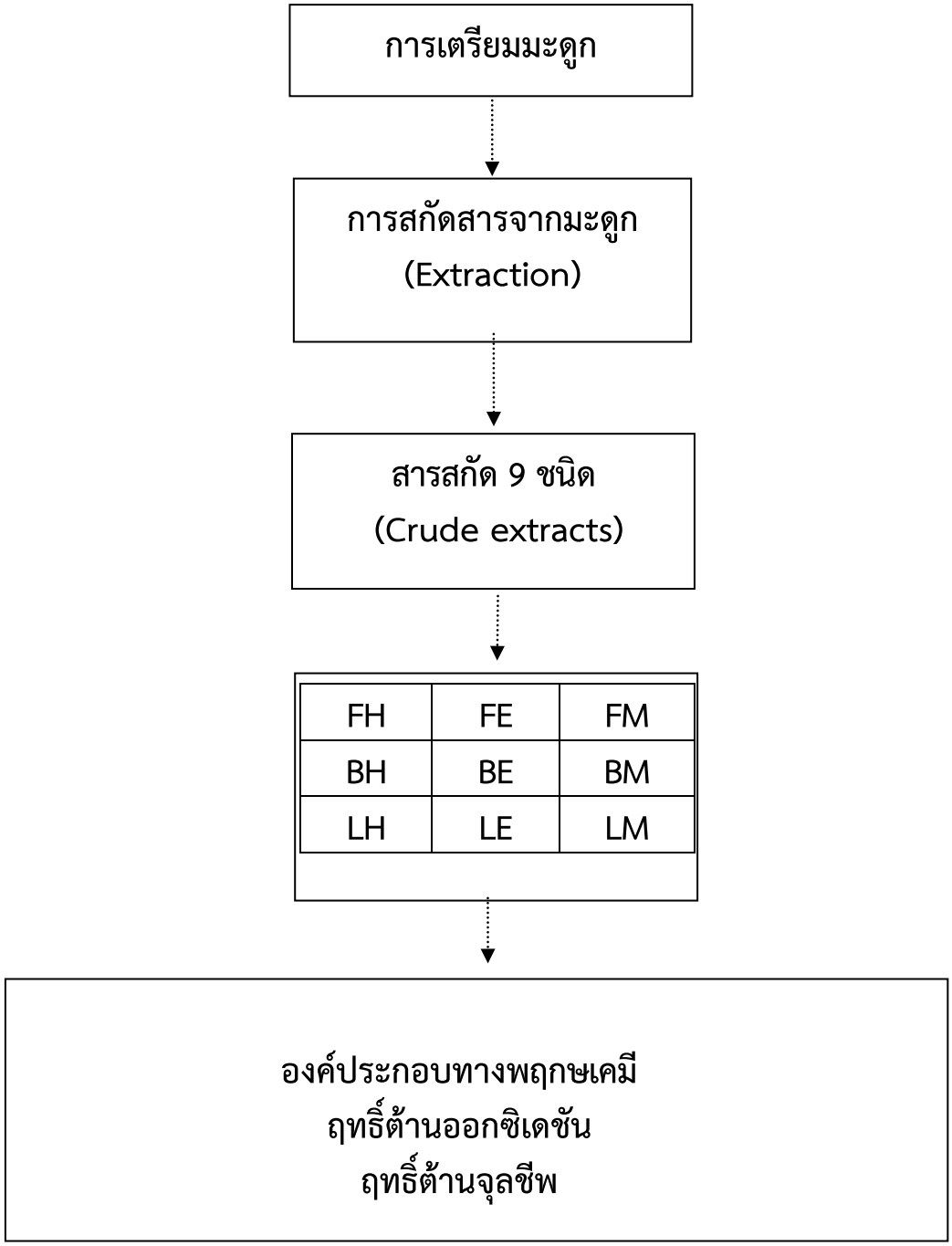
3.2.2 จุลชีพที่ใช้ในการวิจัย

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
2. Streptococcus mutans ATCC27175
3. *Vibrio cholera*
4. Vibrio paraheamolyticus

ตารางที่ 3.1 ชนิด ลักษณะโดยทั่วไป และการก่อโรคของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

ชนิด	ลักษณะ	การก่อโรค
1. Staphylococcus aureus ATCC 25923	แบคทีเรียทรงกลม เรียงตัวเป็นลักษณะ คล้ายพวงองุ่น แกรมบวก	เป็นสาเหตุของโรคฝี หนอง กุ้งยิง การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด กลุ่มอาการผิวหนังกำพร้าหลุดลอกหรือRitt's disease และอาหารเป็นพิษ
2. Streptococcus mutans ATCC27175	แบคทีเรียทรงกลม แกรมบวก	เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในช่องปาก ทำให้เกิดโรคฟันผุ
3. Vibrio cholerae	แบคทีเรียรูปท่อนโค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอหิวาห์ตกโรค เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้ในลำไส้เล็ก และสร้างสารพิษที่เรียกว่าcholera toxin บนเยื่อบุเซลล์ของผนังลำไส้ทำให้เกิดการขับเกลือแร่ โพแทสเซียม โซเดียมคลอไรด์ ไบคาร์บอเนต และน้ำออก จาก เซลล์สู่โพรงลำไส้ ทำให้ผู้ป่วยคลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วงอย่างรุนแรง
4. Vibrio paraheamolyticus	แบคทีเรียรูปท่อนโค้งงอ แกรมลบ	ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ กระเพาะอาหาร- ลำไส้อักเสบเชื้อนี้มักปนเปื้อนไปกับอาหารทะเลพวก กุ้ง ปู ปลา หอย จะเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุกๆ 10 ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ ทำให้มีอาการท้องร่วงรุนแรง มีอุจจาระเหลวเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือน กุ้งเน่า มักมีอาการปวดเกร็งที่ท้อง ครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยมีอาการอาเจียนร่วมด้วย มีระยะฟักตัวค่อนข้างสั้น คืออาจเกิดอาการในประมาณ 15-24 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหาร

3.3 วิธีการทดลอง



รูปที่ 3.1 แผนผังขั้นตอนการทดลอง

การวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน โดยการนำผลมะดูก เปลือกมะดูกและใบมะพอกมาสกัดโดยนำมาหมักด้วยวิธี Maceration และทำการสกัดด้วยเทคนิค Sequential Extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extracts) ทั้งหมด 9 ชนิด แสดงดังตารางที่ 3.1 ประกอบด้วย สารสกัดหยาบจากผลชั้นเฮกเซน (FH) สารสกัดหยาบจากผลชั้นเอทิลแอซิเตต (FE) สารสกัดหยาบจากผลชั้นเมทานอล (FM) สารสกัดหยาบจากเปลือกชั้นเฮกเซน (BH) สารสกัดหยาบจากเปลือกชั้นเอทิลแอซิเตต (BE) สารสกัดหยาบจากเปลือชั้นเมทานอล (BM) สารสกัดหยาบจากใบชั้นเฮกเซน (LH) สารสกัดหยาบจากใบชั้นเอทิลแอซิเตต (LE) และ สารสกัดหยาบจากใบชั้นเมทานอล (LM)

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ทั้งหมด

ส่วนที่ทดลอง	Crude extracts		
	Hexane	**Ethylacetate**	**Methanol**
Fruits	FH	FE	FM
Barks	BH	BE	BM
Leaves	LH	LE	LM

3.3.1 การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

1. ทำการเปรียบเทียบอนุกรมวิธานของพืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือมะดูกโดยรับรองพืชตัวอย่างโดยผู้เชี่ยวชาญทางพฤกษศาสตร์ (Voucher Specimens)

2. นำผล เปลือก และใบของมะดูกมาทำความสะอาด หั่นให้เล็กแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

3. นำผล เปลือก และใบของมะพอกที่แห้งแล้ว ไปบดให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดไฟฟ้า (Blender)

3.3.2 การสกัดสารจากตัวอย่าง

การสกัดสารที่มีองค์ประกอบสำคัญจากมะพอกใช้เทคนิคการสกัดแบบ Sequential Extraction โดยการหมัก(Maceration) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังมีขั้วสูงคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับดังนี้

1. นำผล เปลือก และใบของมะพอกที่บดละเอียดมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน 4 กิโลกรัม แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายคือ เฮกเซน ในภาชนะปิด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2. นำของผสมมากรองแยกสารสกัดและกากออกจากกัน โดยส่วนที่เป็นสารสกัดนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ของชั้นเฮกเซน ชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. ส่วนที่เป็นกากนำไปผึ่งลมให้แห้ง แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้นคือเอทิลอะซิเตตและเมทานอล ตามลำดับ และทำการสกัดสารโดยใช้วิธีเดียวกันกับตัวทำละลายเฮกเซน

3.3.3 การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมี

นำสารสกัดหยาบที่สกัดได้ไปทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ ดังนี้

1. Alkaloids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 5% HCl 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ทดสอบกับ Dragendorff's test, Marme's test, Mayer's test, Wanger's test, และ Kruat' s test สังเกตสีและตะกอนที่เกิดขึ้น

2. Tannins และ phenolic compounds สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายในน้ำ 20 ml อุ่น 15 นาที กรอง ถ้าขุ่นหยด 4-5 หยด 10% NaCl กรอง นำมาทดสอบกับ gelatin solution, gelatin salt solution, 1% $FeCl_3$, Br_2 water, Vanilin, 40% Formalin / HCl, และ Lime water

3. Triterpenes และ Steroids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายด้วย $CHCl_3$ 1-2 ml นำมาทดสอบวิธี Liebermann Burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H_2SO_4 1 หยด ลงในหลอดทดลอง สังเกตวงแหวนที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

4. Flavonoids สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน Petoleum ether 4 ml กรอง แล้วเอา residue ละลายใน 80 % ethanol 8 ml นำมาทดสอบ Cyadinin test โดยนำลวด Mg มาใส่ ในหลอดทดลอง 3-4 ชิ้น แล้วค่อยหยด conc. HCl 3 หยด สังเกตฟองที่เกิด ทิ้งไว้ให้ละลายจนหมด จากนั้น เติมน้ำ 1 ml และ Octyl alcohol 1 ml สังเกตสีในชั้นของ Octyl alcohol

5. Antraquinones สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 0.5 M KOH 10 ml แล้วเติม 3% H_2O_2 1ml ต้มบนหม้ออังไอน้ำ 10 นาที กรอง ทิ้งให้เย็น หยด CH_3COOH จนเป็นกรดสกัด ด้วย C_6H_6 10 ml นำมาทดสอบ Modified Borntragers test โดยนำชั้นของ C_6H_6 ไปหยด NH_3 T.S. ตั้งทิ้งไว้

6. Cardiac glycosides สารสกัด MeOH (ประมาณ 0.5 กรัม) ละลายใน 10% Lead acetate 10 ml อุ่น 15 นาที ทิ้งให้เย็น กรอง สกัดด้วย $CHCl_3$ 5ml 3 ครั้ง นำมาทดสอบวิธี Liebermann burchard test โดย หยด Acetic anhydride 3 หยด จากนั้นค่อยๆ หยด conc. H_2SO_4 1-2 หยด ลงใน หลอดทดลอง สังเกตสีที่เกิดขึ้นและเขย่าดูสีที่เกิดขึ้น

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพสำหรับโดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราในที่นี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bauerและคณะ(1966) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์)มีวิธีการทดสอบดังนี้นำแบคทีเรียชนิดต่างๆที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Broth บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ที่บ่มเพาะได้มาปรับความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนแบคทีเรีย 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำแบคทีเรียที่เตรียมได้ไปเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่ว 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียชนิดต่างๆ บนหน้าวุ้น หลังจากนั้นนำแผ่นดิสต์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งละลายด้วย DMSO(Dimethyl sulfoxide) (เจือจางลง 2 เท่า

ตามลำดับ) วางบนผิววุ้นที่มีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ บ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย แต่ถ้าเป็นราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง แล้วแต่ชนิดของรา

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบด้วย สาร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยการนำสารสกัดมาทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ตามวิธีของ Brand-Williams และคณะ(1995) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์) มีวิธีการทดสอบดังนี้ นำสารละลายตัวอย่าง 100 ml ผสมกับ DPPH solution (4.5 mg DPPH in 100 ml absolute methanol) ปริมาตร 2.9 ml และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร DPPH ที่เหลือ ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยรายงานเป็นค่า EC_{50} ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการลดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร $DPPH_{เริ่มต้น}$ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) เป็น positive control สารตัวอย่างและ BHT ละลายใน DMSO โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ตามวิธีของ Javanmardi และคณะ (2003) (อ้างจาก นันทนา อรุณฤกษ์) มีวิธีการทดสอบดังนี้นำสารสกัดที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (3 ซ้ำ) ผสมกับ Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 2.5 ml และสารละลาย Na_2CO_3 (7.5%, w/v) ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วัดค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ปริมาณสารประกอบฟีนอล รายงานเป็น มิลลิกรัมที่เทียบเท่ากับกรดแกลลิคต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ 1 กรัม

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละ

3.5 ระยะเวลาการทดลอง

1 ตุลาคม 2561 – 30 กันยายน 2562

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ทำการทดลองโดยใช้เปลือก ใบและผลของมะดูกมาทำการแยกสารโดยการหมักและสกัดตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์จำนวน 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ ทั้งหมด 9 ชนิด นำมาทดสอบข้อมูลทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน
4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

Phytochemical screening	ผลการทดสอบ		
	เปลือก	ใบ	ผล
1. alkaloids	+++	+	+
2. condensed tannins	+	+	-
3. phenolic compounds	+	+	+
4. flavonoids	+	+	-
5. triterpenes	-	+	+
6. steroids	++	+	++
7. cardiac glycosides	-	-	+
8. antraquinones	++	+	+

จากตารางที่ 4.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

1. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากเปลือกพบสารกลุ่ม alkaloids tannins phenolic compounds flavonoids steroids และ antraquinones

2. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบพบสารกลุ่ม alkaloids tannins phenolic compounds flavonoids triterpenes steroids และ antraquinones

3. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากผลพบสารกลุ่ม alkaloids phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides และ antraquinones

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.2.1 ทดสอบด้วย 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

นำสารสกัดหยาบ จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือก ใบและผลของมะดูก มาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเรียงลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปยังตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณสาร 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

สารสกัด	**DPPH EC_{50} (μg/ml)**		
	Hexane	**Ethylacetate**	**Methanol**
Standard (BHT)	8.9		
เปลือก	> 1000	527	98
ใบ	> 1000	> 1000	137
ผล	> 1000	205	31

จากตารางที่ 4.2 การลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดูกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50}เท่ากับ 98 μg/ml
2. สารสกัดจากใบของมะดูกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50}เท่ากับ 137 μg/ml
3. สารสกัดจากผลของมะดูกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50}เท่ากับ 31 μg/ml

4.2.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

นำสารสกัดหยาบ จำนวน 9 ชนิด ที่ได้จากการนำเปลือก ใบและผลของมะดูก มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยการใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

สารสกัด	Total Phenolic (mg GAE/g dw)		
	Hexane	Ethylacetate	Methanol
เปลือก	5.25	25.77	71.87
ใบ	4.91	12.59	48.11
ผล	7.89	31.63	95.23

จากตารางที่ 4.3 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดูกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า61.87 mg GAE/g dw
2. สารสกัดจากใบของมะดูกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 48.11 mg GAE/g dw
3. สารสกัดจากผลของมะดูกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 95.23 mg GAE/g dw

4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสารสกัดจากเปลือก ใบ และ ผลของมะดูกที่ได้สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (Minimal Inhibitory Concentration ; MIC) ของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 4 ชนิด ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.4 - 4.6

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพจากเปลือกของมะดูก

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกของมะดูก

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (μg/ml)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	125.00	31.25	15.60
2	*Streptococcus mutans* ATCC 27175	31.25	125.00	125.00
3	*Vibrio cholerae*	>1000	1000	1000
4	*Vibrio paraheamolyticus*	1000	31.25	7.80

จากตารางที่ 4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกของมะดูก

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดูกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตต แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25μg/ml

3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดูกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 μg/ml

4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพจากใบของมะดูก

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบของมะดูก

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (μg/ml)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	125.00	250	250
2	*Streptococcus mutans* ATCC 27175	1000	125.00	1000
3	*Vibrio cholerae*	31.25	31.25	125.00
4	*Vibrio paraheamolyticus*	125.00	125.00	1000

จากตารางที่ 4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบของมะดูก

1. สารสกัดจากใบของมะดูกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml
2. สารสกัดจากใบของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml
3. สารสกัดจากใบของมะดูกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125.00 μg/ml

4.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพจากผลของมะดูก

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากผลของมะดูก

ลำดับที่	จุลชีพ	MIC (μg/ml)		
		Hexane	Ethylacetate	Methanol
1	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	31.25	31.25	125.00
2	*Streptococcus mutans* ATCC 27175	>1000	1000	1000
3	*Vibrio cholerae*	1000	125.00	1000
4	*Vibrio paraheamolyticus*	125.00	15.60	>1000

จากตารางที่ 4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากผลของมะดูก

1. สารสกัดจากผลของมะดูกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml

2. สารสกัดจากผลของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 μg/ml

3. สารสกัดจากผลของมะดูกด้วยเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125.00 μg/ml

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ ดังนี้

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การตรวจสอบเบื้องตนทางพฤกษเคมี

1. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากเปลือกพบสารกลุ่ม alkaloids tannins phenolic compounds flavonoids steroids และ antraquinones

2. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบพบสารกลุ่ม alkaloids tannins phenolic compounds flavonoids triterpenes steroids และ antraquinones

3. การทดสอบพฤกษเคมีของสารสกัดจากผลพบสารกลุ่ม alkaloids phenolic compounds triterpenes steroids cardiac glycosides และ antraquinones

5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

5.1.2.1 การทดสอบ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดูกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50}เท่ากับ 98 μg/ml

2. สารสกัดจากใบของมะดูกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50}เท่ากับ 137 μg/ml

3. สารสกัดจากผลของมะดูกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50}เท่ากับ 31 μg/ml

5.1.2.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดูกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า61.87 mg GAE/g dw

2. สารสกัดจากใบของมะดูกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 48.11 mg GAE/g dw

3. สารสกัดจากผลของมะดูกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 95.23 mg GAE/g dw

5.1.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดูก

1. สารสกัดจากเปลือกของมะดูกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml

2. สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตต แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Streptococcus mutans* ATCC 27175 และ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25μg/ml

3. สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดูกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 μg/ml

5.1.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากใบของมะดูก

1. สารสกัดจากใบของมะดูกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml

2. สารสกัดจากใบของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml

3. สารสกัดจากใบของมะดูกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125.00 μg/ml

5.1.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากผลของมะดูก

1. สารสกัดจากผลของมะดูกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml

2. สารสกัดจากผลของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 μg/ml

3. สารสกัดจากผลของมะดูกด้วยเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 125.00 μg/ml

5.2 อภิปรายผล

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาศักยภาพของมะดูกพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรค เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ของภูมิปัญญาท้องถิ่นไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ทำการทดลองโดยใช้เปลือก ใบและผลของมะดูกมาทำการแยกสารโดยการหมักและสกัดตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์จำนวน 3 ชนิดคือเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล จะได้สารสกัดหยาบ ทั้งหมด 9 ชนิด นำมาทดสอบข้อมูลทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ จากผลการศึกษาค้นพบประเด็นที่สำคัญดังนี้

5.2.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการลดปริมาณ DPPH พบว่าสารสกัดจากผลของมะดูกชั้นที่แสดงการลดปริมาณของ 1,1-diphenl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สูงที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า EC_{50}เท่ากับ 31 μg/ml ส่วนการทดสอบปริมาณสารประกอบ ฟีนอลrพบว่าสารสกัดจากผลของมะดูกที่มีปริมาณฟีนอลมากที่สุดคือสารสกัดชั้นเมทานอล มีค่า 95.23 mg GAE/g dw

5.2.2 ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

สารสกัดหยาบจากเปลือกของมะดูกด้วยเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 μg/ml สารสกัดจากใบของมะดูกที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml และสารสกัดจากใบของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ เติบโตของ *Vibrio cholerae* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 μg/ml และ สารสกัดจากผลของมะดูกด้วยเอทิลแอซิเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Vibrio paraheamolyticus* ได้มากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 15.60 μg/ml

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านมะเร็ง ของสารบริสุทธิ์ในระดับโครงสร้างโมเลกุลเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการต่อยอดการวิจัยต่อไป

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

ชฎารัตน์. 2544. **ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในหลอดทดลองของสารสกัดจากต้นกระทุ่มน้ำ.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เชฏฐ รัตนาจารย์. 2548. **ผลของสารสกัดไพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธีรศักดิ์ โรจนาราธา และคณะ. 2551. **การประชุมวิชาการจับกระแสการรักษาและยาใหม่ 3**. คณะเภสัชศาสตร์ และชมรมศิษย์เก่าคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

นริศา คำแก่น . 2551. **การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : ก็อปปี้บอกซ์.

เต็ม สมิตินันท์ และวีระชัย ณ นคร. 2534. **พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน.** กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวัฒนธรรมแห่งชาติ.

บุญส่ง คงคาทิพย์ และคณะ. 2545. **การสกัด การแยกสารออกฤทธิ์จากต้นเบาหวาน.** รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ปัทมาวดี เสตะกัณณะ. **การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสมุนไพรไทย** วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 44, 2 (2545) : 110-124

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ สุมาลี พฤกษากร และไชยวัฒน์ ไชสุต.2549. **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิวของสารสกัดและน้ำหมักของพืชไทย.** รายงานการวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ นิสิต กิตติพงษ์พัฒนาและจตุรงค์ รจนากุล.2547. **การศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดมะเกี๋ยงเพื่อใช้ทางยา เสริมอาหารและเครื่องสำอาง**.รายงานการวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และ ทรงพร จึงมั่นคง. 2546. **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดสาระสำคัญจากสมุนไพร.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ราชบัณฑิตยสถานจัดพิมพ์. 2538. **อนุกรมวิธานพืช อักษร ก ฉบับราชบัณฑิตยสถาน.** เพื่อนพิมพ์.

วาทินี จตุรพรชัย. 2546. **การสกัดและผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศไทย.** บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรี คุณกิตติ และคณะ. 2547. **การพัฒนาและประเมินผลทางคลินิกของเวชภัณฑ์จากวุ้นว่านหางจรเข้ ส่วนสกัดจากใบบัวบก ใบฝรั่ง และใบข่อยเพื่อใช้รักษาโรคในช่องปาก.** รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วันดี กฤษณพันธ์. 2529. **พฤกษเคมีเบื้องต้น. เภสัชวินิจฉัย. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1**. หน้า 37-100 กรุงเทพ. Text Journal Corporation Co., ltd.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. **เภสัชกรรมไทย รวมสมุนไพร.** พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

ศรีสมพร ปรีเปรม. **รูปแบบของยาที่เตรียมจากพืชสมุนไพร ในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง "สมุนไพรกับการพึ่งตนเอง"** มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 2536.

สุภาพ บุณยะรัตเวช. 2523. **การทดสอบประเภทของสารเคมีในพืชสมุนไพร.** วารสารวิจัยจุฬา. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.2546. **ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 12 (1) . พืชสมุนไพรและพืชมีพิษ เล่ม 1** : ซีเอ็ดยูเคชั่น จำกัด.

สรศักดิ์ เหลี่ยวไชยพันธุ์ และ ดวงพร เหลี่ยวไชยพันธุ์. 2548. **การแยกและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจากผลมะแกว๋นป่า**. รายงานการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อาทร ริ้วไพบูลย์. 2538. พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน สยามไภษัชพฤกษ์ ภูมิปัญญาของชาติ (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์, ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Brien JO, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem,* 267, 2000, 5421-5426

Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. American Journal Clinical Pathology 45:493-6.

Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Food Science Technology 28:25-30.

B. Pratumvinit, T. Srisapoomi, P. Worawattananon , N. Opartkiattikul, W. Jiratchariyakul and T. Kummalue., 2009. *In vitro* antineoplastic effect of *Ficus hispida* L. plant against breast cancer cell lines. Journal of Medicinal Plants Research 3(4), 255-261

Changsen C, Franzblau SG, Palittapongarnpim P. **Improved green fluorescent protein reporter gene based microplate screeinig for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter**. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, 2003, 3682-3687.

Javanmardi, J., C. Stushnoff, E. Locke, and J. M. Vivanco. 2003. **Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions**. Food Chemistry 83:547-550

Sithisarn,P., Supabphol,R. and Gritsanapan,W.,2005. **Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209)**, Journal of Ethnopharmacology, 99,109–112.

Julie Nguyen-Pouplin , Hop Tran , Hung Tran , Tuyet Anh Phan, Christiane Dolecek , Jeremy Farrar , Tinh Hien Tran, Philippe Caron , Bernard Bodo, Philippe Grellier .,2007. **Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam**. Journal of Ethnopharmacology 109, 417–427.

Krishna Murti, Vijay Lambole, Mayank Panchal., 2011. **Effect of *Ficus hispida* L. on normal and dexamethasone suppressed wound healing**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 47,

N. Swathi, A. Sreedevi and K. Bharathi.,2011. **Evaluation of Nephroprotective Activity of Fruits of Ficus hispida on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity**. Pharmacognosy Journal 3, 62-68.

Pravin Suresh Jogi., 2012. **Evaluation of phytochemical constituents and biological screening of Ficus hispida leaves in Chandrapur forest region**.International Journal of Research in Plant Science 2, 59-61

Wirongrong Kaweetripob , Chulabhorn Mahidol, Sanit Thongnest, Hunsa Prawat , Somsak Ruchirawat. 2016. **Polyoxygenated ursane and oleanane triterpenes from *Siphonodon celastrineus*** . Phytochemistry 129, 58-67.

Wirongrong Kaweetripob , Chulabhorn Mahidol , Hunsa Prawat , Somsak Ruchirawat. 2013. **Lupane, friedelane, oleanane, and ursane triterpenes from the Stem of *Siphonodon celastrineus* Griff.** Phytochemistry 96, 404–417.