

การสกัด การตรวจสอบสารพฤษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อแบคทีเรียของทุเรียนเทศ

วาทีณี เสถียรราษฎร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

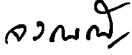
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตุลาคม 2559

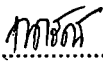
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

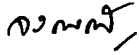
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ วาทีณี เสถ์ราษฎร์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

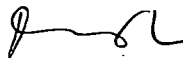

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

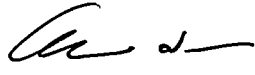

.....ประธาน
(ดร.เนาวรัตน์ กองคำ)


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


.....กรรมการ
(ดร.ศิริรัตน์ ชาญไวยวิทย์)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทวรรณ แสงแห)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา


.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 4 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือ ในทุกปัญหาการวิจัย พร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียด ถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณ เป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชา เคมีเป็นอย่างดี

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนจากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ภายใต้โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางด้าน วิทยาศาสตร์ และคณิตศาสตร์ (สควค.) และส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยบูรพา จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อห้าวโร่ไม คุณแม่มุ่เล้าะ เสถ์ราษฎร์ และสมาชิกในครอบครัว ทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูคุณเวทิตาแคว่ บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

วาทีณี เสถ์ราษฎร์

57920933: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)

คำสำคัญ: ทูเรียนเทศ/ สารสกัดหยาบ/ สารพฤกษเคมี/ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ/
การต้านเชื้อแบคทีเรีย

วาทีณี เศล่ำราษฎร์: การสกัด การตรวจสอบสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
และต้านเชื้อแบคทีเรียทูเรียนเทศ (EXTRACTION, PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTI-
OXIDANT AND ANTI-BACTERIA FORM *ANNONA MURICATA*).

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จงกมลณี จงอร่ามเรือง, Ph.D. 74 หน้า. ปี พ.ศ. 2559.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมี ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์
การต้านเชื้อแบคทีเรียจากส่วนใบและเปลือกต้นของทูเรียนเทศ (*Annona muricata*) โดยการแช่
หมักอย่างต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล ได้สาร
สกัดหยาบ 6 ตัวอย่าง นำไปศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีและการ
ตกตะกอน ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ DPPH (DPPH assay) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี
แผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) และศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้แบคทีเรีย
แกรมบวกและแกรมลบ 4 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia*
coli และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี Disc diffusion

จากการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบของทูเรียนเทศประกอบด้วยสารที่มีความสำคัญทาง
เภสัชวิทยา 7 กลุ่มคือ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และ
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ซึ่งสามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลายเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นได้สูงสุด
5 กลุ่ม ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบส่วนใบ
และเปลือกต้นของทูเรียนเทศทั้ง 6 ตัวอย่าง โดยพบได้มากที่สุดในการสกัดเมทานอลจากส่วนใบ
และเปลือกต้นตามลำดับ และจากการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดหยาบของ
ทูเรียนเทศไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้ ยกเว้น สารสกัดเมทานอล
จากส่วนเปลือกต้นของทูเรียนเทศ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* ได้ โดยให้ค่า
Inhibition zone เท่ากับ 6.66 ± 0.20 มิลลิเมตร ซึ่งแสดงค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้
น้อย เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ Chloramphenical ที่ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 25.58 ± 1.40
มิลลิเมตร ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทูเรียนเทศมี
องค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ

57920933: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)

KEYWORDS: *ANNONA MURICATA*/ CRUDE EXTRACT/ PHYTOCHEMICALS/
ANTIOXIDANT ACTIVITY/ ANTIBACTERIAL

WATINEE SALAYRAD: EXTRACTION, PHYTOCHEMICAL SCREENING,
ANTI-OXIDANT AND ANTI-BACTERIA FORM *ANNONA MURICATA*.

ADVISORY COMMITTEE: JONGKOLNEE JONGARAMRUONG, Ph.D. 74 P. 2016.

This research aimed to study phytochemicals screening, antioxidant activity and antibacterial activity of the leaves and bark of *Annona muricata*, with maceration sequential extraction, using three organic solvents, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. There were six crude extracts for phytochemical screening with changes color reaction and precipitation. Antioxidant activity (DPPH assay) studied by thin layer chromatography (TLC). Furthermore, the extracts were also assayed their antibacterial activities of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* by the disc diffusion method.

The study was found that, the extracts of *Annona muricata* contains seven groups of the important pharmacological, alkaloids, phenolics, coumarin, saponins, tannins and cardiac glycosides. Methanol is the most effective organic solvent. It can be extracted the important pharmacological the most up to five groups from the bark. The antioxidant activity were determined all extracts. The antioxidant activity was mostly found in methanol extracts of the leaves and bark respectively. Antibacterial activity found that, the extracts of *Annona muricata* could not inhibit the growth of bacteria, except the methanol extract of the bark of the *Annona muricata* inhibited the growth of *Bacillus subtilis* by the inhibition zone of 6.66 ± 0.20 mm, which is quite a few when compared to antibiotics Chloramphenical, with the inhibition zone of 25.58 ± 1.40 mm. The study concluded that methanol extracts from the bark of *Annona muricata* showed the highest of pharmacological groups and biological effect, when compared to other extracts.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของทุเรียนเทศ (<i>Annona muricata</i>).....	4
การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร.....	7
การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Extraction with solvent).....	10
การเลือกวิธีสกัด.....	11
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	12
พฤกษเคมีเบื้องต้น.....	13
อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ.....	22
แบคทีเรีย (Bacteria).....	29
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	32
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	35
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	35
แผนการดำเนินการวิจัย.....	36
วิธีการวิจัย.....	37

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	42
การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น.....	42
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง.....	44
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย.....	48
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	50
อภิปรายผลการทดลอง.....	51
สรุปผลการทดลอง.....	53
ข้อเสนอแนะ.....	54
บรรณานุกรม.....	55
ภาคผนวก.....	58
ภาคผนวก ก.....	59
ภาคผนวก ข.....	61
ภาคผนวก ค.....	67
ภาคผนวก ง.....	71
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	74

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 คุณค่าทางโภชนาการของทุเรียนเทศในส่วนที่กินได้ 100 กรัม.....	7
2-2 แสดงความมีขี้ของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ.....	11
2-3 การแบ่งกลุ่มสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites).....	14
4-1 ผลการตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศที่สกัดด้วย ตัวทำละลายต่าง ๆ.....	42
4-2 ค่า Rf ระบบตัวทำละลายของสารสกัดทุเรียนเทศที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ.....	45
4-3 ค่า Rf ระบบตัวทำละลายของสารสกัดเมทานอลในเปลือกต้นของทุเรียนเทศ.....	46
4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC).....	47
4-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Inhibition zone ของสารสกัดหยาบจากทุเรียนเทศด้วย ตัวทำละลายต่าง ๆ ความเข้มข้น 500 mg/mL และสารมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion.....	48

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะของต้นทุเรียนเทศ.....	5
2-2 เครื่องสกัดแบบชอกห์เลต.....	9
2-3 สูตรโครงสร้างของ Reserpine.....	15
2-4 สูตรโครงสร้างของ Quinine.....	15
2-5 สูตรโครงสร้างของ Morphine.....	15
2-6 สูตรโครงสร้างของ Quercetin.....	16
2-7 การเกิด lactone ring ของ สารคูมาริน.....	17
2-8 สูตรโครงสร้างของ Coumarin.....	17
2-9 สูตรโครงสร้างของ Santonin.....	17
2-10 สูตรโครงสร้างของ Dicoumarol.....	17
2-11 สูตรโครงสร้างของ Rutin.....	18
2-12 สูตรโครงสร้างของ Quercetin.....	18
2-13 สูตรโครงสร้างของ Tannin.....	19
2-14 สูตรโครงสร้างของ Quinone.....	20
2-15 สูตรโครงสร้างของ isoprene unit (C ₅ H ₈).....	20
2-16 สูตรโครงสร้างของ Cyclopentano perhydrophenanthrene.....	21
2-17 สูตรโครงสร้างของ Steroid skeleton.....	21
2-18 สูตรโครงสร้างของ Diosgenin.....	21
2-19 สูตรโครงสร้างของ Digitoxigenin.....	22
2-20 สูตรโครงสร้างของ Ouabagenin.....	22
2-21 กระบวนการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว.....	24
2-22 สูตรโครงสร้างของ Tocopherol-linoleic acid.....	26
2-23 สูตรโครงสร้างของ Tocopherol.....	27
2-24 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน DPPH ให้เป็น โมเลกุลที่ไม่อนุมูลอิสระ.....	28
2-22 สูตรโครงสร้างของ Tocopherol-linoleic acid.....	26

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย	36
3-2 การเก็บตัวอย่างทุเรียนเทศ	37
4-1 ตัวอย่างการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i> ของสารสกัดหยาบจากเอทิลอะซิเตด ทั้ง 4 ส่วนของชุมชนเห็ดเทศ	38
5-1 ภาพแสดงตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ด้วยสารสกัดจาก ส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศในตัวอย่างละลายต่าง ๆ	52
ก-1 การเก็บตัวอย่างใบและเปลือกของต้นทุเรียนเทศ	60
ก-2 ใบของทุเรียนเทศหลังการตากแห้ง	60
ข-1 ผลการตรวจสอบอัลคาลอยด์	62
ข-2 ผลการตรวจสอบฟีนอลิก และแทนนิน	62
ข-3 ผลการตรวจสอบฟลาโวนอยด์	63
ข-4 ผลการตรวจสอบแอนทราควิโนน	63
ข-5 ผลการตรวจสอบคูมาริน	64
ข-6 ผลการตรวจสอบซาโปนิน	64
ข-7 ผลการตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์	65
ข-8 ผลการตรวจสอบสเตอรอยด์	65
ข-9 ผลการตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์	66
ค-1 การหาระบบตัวทำละลาย TLC ของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตดกับเฮกเซน	68
ค-2 การหาระบบตัวทำละลาย TLC ของสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ	69
ค-3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดของทุเรียนเทศ	70
ง-1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ <i>B. subtilis</i>	72
ง-2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ <i>S. aureus</i>	72
ง-3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก <i>E. coli</i>	73
ง-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก <i>P. aeruginosa</i>	73

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พืชผักสมุนไพรเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญแหล่งหนึ่งของสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ซึ่งถูกใช้มาตั้งแต่สมัยโบราณเพื่อรักษาโรคต่าง ๆ และใช้บำรุงร่างกาย (Hassanpour, Maheri-Sis, Eshratkhan, & Baghbani, 2011) กระทั่งในปัจจุบันก็ยังได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสารสกัดในพืชผักสมุนไพร ซึ่งเป็นสารเคมีที่พบเฉพาะในพืชและได้จากธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพและประสิทธิภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เกิดผลข้างเคียงน้อย นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์และของเหลือทิ้งทางการเกษตร อีกทั้งเพื่อช่วยลดการนำเข้าของยาหรือสารเคมีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ ปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสำคัญต่อการนำพืชสมุนไพรมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่น ในอุตสาหกรรมยา มีการค้นพบยาชนิดใหม่จากการค้นพบองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาแล้วนำมาใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาและสังเคราะห์ยาตามกรรมวิธีทางเภสัชกรรม

สารพฤกษเคมีมีสรรพคุณทางยา มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และให้คุณสมบัติแตกต่างกันไป เช่น การออกฤทธิ์แบบฮอร์โมนของมนุษย์ การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ การออกฤทธิ์ในการจับเชื้อหุ้มเซลล์เพื่อป้องกันการจับติดของเชื้อโรค อีกทั้งยังทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ไม่ให้เสื่อมสภาพ รวมถึงการเป็นสารต้านมะเร็งในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคภัยที่ร้ายแรง (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008) โดยอนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารที่ไม่เสถียรสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างว่องไว สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกายได้ เช่น ไขมัน โปรตีน หรือสารพันธุกรรม ทำให้ภาวะที่อนุมูลอิสระมีปริมาณมากเกินไปอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย เรียกว่าภาวะที่ความเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคร้ายหลายชนิด

ทุเรียนเทศเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Annonaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Annona muricata* เป็นผลไม้ท้องถิ่นทางภาคใต้ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในทางการแพทย์ มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ มีส่วนประกอบของสารในกลุ่มอะซิโตจีนิน (Acetogenins) ซึ่งสามารถแยกได้จากหลายส่วนของพืช โดยสารกลุ่มนี้มีสมบัติเด่นคือความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จึงมีสรรพคุณมากมายในการรักษาโรค เช่น ภาวะแพ้ปัสสาวะอักเสบ โรคเบาหวาน ปวดหัว ความดันโลหิตสูง นอนไม่หลับ ปัญหาเกี่ยวกับตับ รักษาโรคบิด แก้อักเสบ คลายกล้ามเนื้อเกร็ง

เป็นต้น (Sousa, Vieira, Pinho, Yamamoto, & Alves, 2010) ทุเรียนเทศยังเป็นพืชสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคผิวหนังต่าง ๆ เช่น การนำสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากส่วนใบของทุเรียนเทศมาทดสอบฤทธิ์เร่งการรักษาบาดแผลในหนูทดลอง พบว่าสามารถเร่งการรักษาบาดแผลได้ดีเทียบเท่ากับการใช้ยาปฏิชีวนะในปัจจุบัน (Soheil et al., 2015) มีงานวิจัยในต่างประเทศที่ทำการศึกษากี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของทุเรียนเทศมากมาย แต่ยังคงมีการศึกษาค่อนข้างน้อยในประเทศไทย

ด้วยทุเรียนเทศเป็นพืชพื้นบ้านทางภาคใต้ของประเทศไทยที่นิยมนำมารับประทานในชีวิตประจำวันและใช้ประโยชน์ด้านยารักษาโรคตามภูมิปัญญาชาวบ้าน แต่ยังคงมีงานวิจัยที่ศึกษาในประเทศไทยน้อย อีกทั้งทุเรียนเทศที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน อาจส่งผลให้มีสารประกอบของพฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารพฤษเคมีจากส่วนใบ และเปลือกต้นของทุเรียนเทศที่พบในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยโดยใช้วิธีการสกัดสารจากทุเรียนเทศด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สกัดสารประกอบชีวภาพจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ โดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย
2. ศึกษาสารพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ
3. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการสกัดสารประกอบชีวภาพจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ ที่เก็บได้จากตำบลบ่อแสน อำเภอทับปุด จังหวัดพังงา โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล
2. ทดสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ โดย แบ่งการทดสอบเป็น 10 กลุ่ม คือ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

3. ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay)

4. ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Disc diffusion ในแบคทีเรียก่อโรค

4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบสรรพคุณเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหายาจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ
2. ทำให้ทราบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหายาจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ
3. เป็นแนวทางในการพัฒนาด้านการศึกษาสารเคมีที่สำคัญของพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไป
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอาง เป็นต้น

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. สารสกัดหายา หมายถึง สารที่ได้จากการนำใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศมาสกัดด้วยตัวทำละลาย และระเหยตัวทำละลายออก สารที่ได้ยังไม่ใช่สารบริสุทธิ์
2. สารพฤกษเคมี หมายถึง สารเคมีตามธรรมชาติที่พบในพืช เป็นสารที่ให้สี สัน รสชาติ เป็นสารปกป้องคุ้มกันโรคแก่พืช และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันโรคต่าง ๆ ในคน
3. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช (DPPH radical) ของสารสกัดหายาจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ
4. Inhibition zone หมายถึง บริเวณที่มีลักษณะใสที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Disc diffusion ซึ่งสามารถบอกถึงความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของทุเรียนเทศ (*Annona muricata*)

ทุเรียนเทศ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Annona muricata* และมีชื่อสามัญได้แก่ Soursop (English), Guanabanas Durian belanda (Malaysia), Ci guo fan li zhi (Chinese), Graviola (Spanish) เป็นต้น ทุเรียนเทศจัดอยู่ในอันดับ Magnoliales วงศ์ Anonaceae ทั่วโลกมีพืชในวงศ์นี้ 130 สกุล 2300 ชนิด ทุเรียนเทศเป็นพืชเขตร้อนของอเมริกาและเป็นพืชตระกูลเดียวกับน้อยหน่าและน้อยโหน่ง สันนิษฐานว่านำเข้ามาในประเทศแถบเอเชียครั้งแรกโดยชาวยุโรป และถูกนำเข้ามาแถบประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยชาวสเปน แต่ละท้องถิ่นเรียกทุเรียนเทศในชื่อที่แตกต่างกัน เช่น ทุเรียนแขก (ภาคกลาง) หมากเขียบหลดหรือหมากพิลด (ภาคอีสาน) ทุเรียนน้ำ (ภาคใต้) และมะทุเรียน (ภาคเหนือ) และยังมีชื่ออื่น ๆ เช่น ทุเรียนนก ทุเรียนเบา ทุเรียนรอปา รอปา เป็นต้น (อุไร จิรมงคลการ, 2547)

ทุเรียนเทศเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 5-10 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ก่อนข้างหนา เรียงสลับกันไปในระยะใบเดียวกับกิ่ง ผิวใบอ่อนเป็นมัน ดังภาพที่ 2-1 เมื่อฉีกใบจะได้กลิ่นเหม็นเขียวฉุน ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ห้อยลงที่ซอกใบ อยู่รวมกัน 3-4 ดอก กลีบเป็นรูปสามเหลี่ยมหนาแข็ง จำนวนหกกลีบ เรียงเป็นสองชั้น ๆ ละสามกลีบ มีสีเหลืองแกมเขียว ออกดอกตลอดทั้งปี มีกลิ่นหอมอมเปรี้ยวส่งกลิ่นหอมตั้งแต่ช่วงบ่าย ผลมีสีเขียวรูปกลมรี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-20 เซนติเมตร ยาว 15-20 เซนติเมตร มีน้ำหนักประมาณ 0.5-3.0 กิโลกรัม ภายในมีเนื้อคล้ายน้อยโหน่ง มีรสหวานอมเปรี้ยวเป็นเส้นใยเกาะกันเหนียวแน่น สีขาว ถ้าผลดิบมีรสอมเปรี้ยวและมีรสมันเล็กน้อย เมล็ดแก่มีสีน้ำตาลดำ หุ้มด้วยเนื้อสีขาว (วิวัฒน์ พันธวุฒิชยานนท์ และนันทสิทธิ์ บุญชะรัตเวช, 2540)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะของต้นทุเรียนเทศ

1. การขยายพันธุ์

ทุเรียนเทศเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนที่มีความชุ่มชื้นและระบายน้ำได้ดี มีแสงแดดถึงรำไร มีการปลูกเป็นการค้าในประเทศมาเลเซีย โดยมีระยะปลูก 4x4 เมตร ให้ผลได้ในปีที่สี่ ได้ผลผลิตประมาณ 1.5-2 ตันต่อไร่ต่อปี การเพาะเมล็ดทำได้โดยการนำเมล็ดมาเพาะ เมล็ดจะงอกภายใน 7 วัน แต่ต้นกล้าจะโตช้าและออกดอกเมื่ออายุไม่ต่ำกว่า 3 ปี จึงนิยมขยายพันธุ์ด้วยการเสียบยอด และทาบกิ่ง (อุไร จิรมงคลการ, 2547)

2. ถิ่นที่พบและการใช้ประโยชน์ทั้งในท้องถิ่นและต่างประเทศ

ทุเรียนเทศนับเป็นไม้ผลท้องถิ่นของภาคใต้ที่รู้จักกันมาช้านาน ชาวบ้านนิยมปลูกไว้เพื่อบริโภคในครัวเรือนเช่นเดียวกับผลน้อยหน่าหรือน้อยโหน่ง โดยปลูกเป็นพืชร่วมในสวนบ้าน ไม่มีการจัดระยะปลูกที่แน่นอน มีการกระจายตัวไปทั้งพื้นที่สวนและไม่มีการดูแลรักษาเป็นพิเศษ อายุของต้นทุเรียนเทศมีตั้งแต่ 2-60 ปี แม้ปลูกแซมกับพืชยืนต้นอื่น ๆ ได้แก่ มะพร้าว มะม่วง กัลยาสะเดาะซ่างและสะตอ หรือสภาพดินมีค่า pH 3-7 หรือปลูกบริเวณริมร่องสวนที่มีน้ำขัง รวมทั้งในพื้นที่ใกล้ชายทะเล แต่ต้นทุเรียนเทศก็สามารถปรับตัวได้ดี มีความทนต่อโรค เจริญเติบโตและให้ผลผลิตสม่ำเสมอ หากมีผลผลิตเกินความต้องการบริโภคในครัวเรือน ชาวบ้านก็จะแบ่งปันสู่เพื่อนบ้านหรือทำการซื้อขายเฉพาะในตลาดของท้องถิ่นเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาการเก็บรักษาหลังจากผลทุเรียนเทศสุกที่สั้นมาก (อุไร จิรมงคลการ, 2547)

ในด้านสรรพคุณทางสมุนไพรหรือภูมิปัญญาพื้นบ้านของชาวบ้านในภาคใต้ มีการใช้สรรพคุณทุเรียนเทศหลายอย่าง เช่น เมล็ดใช้เป็นยาแก้โรคบิด ยาสมาท ห้ามเลือด ทำให้อาเจียน ใช้เบื่อปลา ใช้ฆ่าแมลง ใบใช้รักษาโรคผิวหนัง แก้ไอ ปวดตามข้อ นำมาขยี้ผสมกับปูนใช้ทาแก้ท้องอืดนำไปต้มกับน้ำเกลือ เพื่อรักษาอาการปวดฟันได้ ใช้รากทุเรียนเทศทำให้ละเอียดผสมกับน้ำข้าวข้าวประคบจะช่วยให้หายจากอาการเจ็บปวดจากการโดนครีปลาแทง ผลทุเรียนสดจะช่วยรักษาโรคเบาหวานได้

นอกจากนี้ในประเทศแถบเขตร้อนซึ่งมีภูมิอากาศเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของทุเรียนเทศ ได้มีการนำผลไม้ท้องถิ่นชนิดนี้มาใช้ในการรักษาโรคตามปัญญาท้องถิ่น เช่น ประเทศบราซิล นำผลและคั้นน้ำคั้นด้านพยาธิ เพิ่มน้ำมันในสตรีหลังคลอด แก้อาการท้องร่วง เมล็ด นำมาบดใช้ถ่ายพยาธิ เปลือกคั้น ราก และใบใช้ด้านเชื่อมมาลาเรีย ใบ รักษาโรคตับอักเสบ น้ำมันจากใบและผลคิบผสมกับน้ำมันมะกอกใช้รักษาอาการปวด โรครูมาติก และโรคข้ออักเสบ ประเทศจาเมกา เฮติและหมู่เกาะอินเดียใต้ ใช้ผลและคั้นน้ำรักษาอาการท้องร่วง เปลือกคั้นและใบ ด้านพยาธิ ด้านเชื่อมมาลาเรีย แก้ไอ คั้นเพื่อให้คลอดบุตรง่าย โรคหอบหืด เป็นต้น (อุไร จิรมงคลการ, 2547)

เนื่องจากผลสุกของทุเรียนเทศเก็บรักษาได้ในระยะเวลาสั้น ชาวบ้านในภาคใต้จึงนิยมนำผลอ่อนมาทำแกงส้มและเชื่อมเป็นของหวาน รวมถึงปัจจุบันมีการแปรรูปผลทุเรียนเทศสุกเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น น้ำผลไม้พร้อมดื่มและไวน์ในท้องถิ่น เป็นต้น (พงษ์เทพ เกิดเนตร, 2551) ในประเทศฟิลิปปินส์และอินโดนีเซีย นิยมนำผลอ่อนที่เมล็ดยังไม่แข็งมารับประทานเป็นผัก ผลแก่นำมาทำขนมหวาน เช่น นำเนื้อมาผสมในไอศกรีม เครื่องดื่มนมผสมผลไม้รวม เยลลี่ น้ำผลไม้ ในประเทศมาเลเซีย มีการทำน้ำทุเรียนเทศอัดกระป๋อง ซึ่งได้รับความนิยมมาก

3. คุณค่าทางโภชนาการ

คุณค่าทางโภชนาการของทุเรียนเทศ โดยการตรวจวิเคราะห์ของกองโภชนาการกรมอนามัย เพื่อหาคุณค่าทางโภชนาการของผลไม้พื้นเมืองต่าง ๆ ในส่วนที่กินได้ 100 กรัม ดังตารางที่ 2-1 (วิวัฒน์ พันธวุฒยานนท์ และนันทสิทธิ์ บุญยะรัตเวช, 2540)

ตารางที่ 2-1 คุณค่าทางโภชนาการของทุเรียนเทศในส่วนที่กินได้ 100 กรัม

องค์ประกอบ	ปริมาณ
1. น้ำ	83.2 กรัม
2. ไขมัน	0.2 กรัม
3. คาร์โบไฮเดรต	15.1 กรัม
4. เส้นใย	0.6 กรัม
5. โปรตีน	1 กรัม
6. แคลเซียม	14 มิลลิกรัม
7. เหล็ก	0.5 มิลลิกรัม
8. วิตามิน B1	0.27 มิลลิกรัม
9. วิตามิน C	24 มิลลิกรัม

4. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

งานวิจัยจาก Universitas Federal da Paraiba ประเทศบราซิล จัดทุเรียนเทศซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Annonaceae อยู่ในกลุ่มพืชที่เป็นพิษเมื่อบริโภคหรือหายใจเข้าไป พืชหลายชนิดในกลุ่มของพืชมีพิษมักมีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์มากมาย สำหรับทุเรียนเทศมีการพบสารสำคัญครั้งแรกจากสารสกัดใบและเปลือกต้นในปี 1976 โดย National Cancer Institute (NCI, USA) เรียกสารนี้ว่าสารประกอบ acetogenins ซึ่งพบในพืชสกุลนี้เท่านั้น สารประกอบ acetogenins สามารถระงับเซลล์มะเร็งได้บางชนิด เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อการระงับการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ (วิวัฒน์ พันธวุฒิชยานนท์ และนันทสิทธิ์ บุญยะรัตเวช, 2540)

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีการใดหรือใช้ตัวทำละลายใด จะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดหยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพร โดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent) ซึ่งสารสกัดที่ได้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรซึ่งจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า สารสำคัญ และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่า สารเฉื่อย ซึ่งวิธีการสกัด

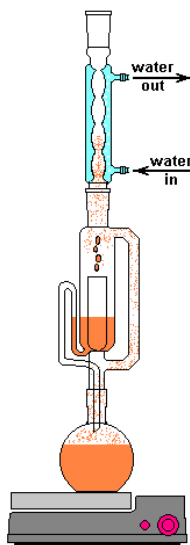
สารสำคัญขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ ได้แก่

1. มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรโดยการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิดจนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้ ในระหว่างที่หมักควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองเอาสารสกัดออกจากกากของพืชสมุนไพร ถ้าจะสกัดให้หมดจดอาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง วิธีนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน จึงเหมาะกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2. เพอร์โคเลชัน (Percolation) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่าเพอร์โคเลเตอร์ ซึ่งทำได้โดยการนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอขึ้น ทิ้งไว้หนึ่งชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อย ๆ บรรจุผงยาที่ละเอียดลงในเพอร์โคเลเตอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ปลายเปิดทั้งสองข้าง เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพรประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไหลเอาสารสกัดออก โดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัด จนการสกัดสมบูรณ์ นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกัน นำไปกรอง วิธีนี้จัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่มีข้อเสียคือ เปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน

3. การสกัดด้วยซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxhlet extractor) เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (Thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ น้ำยาสกัดจะผ่านผงสมุนไพรซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน มีข้อดีคือใช้ตัวทำละลายน้อย ไม่สิ้นเปลือง แต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และตัวทำละลายที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกของตัวทำละลายแต่ละชนิด เนื่องจากมีจุดเดือดต่างกัน จะมีผลให้สัดส่วนของตัวทำละลายแตกต่างกันไปจากเดิมและผลการสกัดไม่ดีเท่าที่คาดการณ์ไว้

(นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)



ภาพที่ 2-2 เครื่องสกัดแบบซอกท์เลต (อ้างอิงจาก <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d2/Soxhlet> วันที่ค้นข้อมูล 1 พฤษภาคม 2558)

4. การกลั่น (Distillation) ใช้สำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหย ในทางอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ

4.1 การกลั่นด้วยน้ำ (Water distillation) ใช้กับพืชแห้งซึ่งไม่ถูกทำลายเมื่อต้ม เนื่องจากพืชที่นำมากลั่นจะแช่อยู่ในน้ำเดือดทั้งหมดตลอดระยะเวลาการกลั่น วิธีนี้ใช้กลั่นน้ำมันจากเปลือกไม้ เช่น กลั่นน้ำมันสนจากยางสน

4.2 การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation) ใช้ได้กับพืชสดและแห้ง ซึ่งอาจทำลายได้ง่ายเมื่อถูกต้ม การกลั่นวิธีนี้สะดวกที่สุดและใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันทางการค้า

4.3 การกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) วิธีนี้ใช้กับพืชสด โดยนำพืชสดมาวางบนตะแกรง แล้วผ่านไอน้ำเข้าไปโดยตรง โดยไม่ต้องมีการหมักพืชด้วยน้ำก่อน จัดเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายน้อย

5. การบีบหรือการอัด (Expression)

ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้วิธีกลั่นไม่ได้ เนื่องจากถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม โดยนำผลไปบีบบนรางที่มีเข็มแหลม ๆ อยู่ เพื่อให้ต่อมน้ำมันแตกออก

6. วิธีเอ็นฟลอยเรนซ์ (Enfleurage)

ใช้กับน้ำมันหอมระเหยของกลีบดอกไม้ต่าง ๆ เป็นวิธีที่เก็บความหอมได้ดี วิธีนี้จะใช้ไขมันหรือน้ำมันไม่ระเหยที่ไม่มีกลิ่นเป็นตัวดูดซับ โดยนำมาแผ่เป็นแผ่นบาง ๆ แล้วเอากลีบดอกไม้มาวางเรียงบนตัวดูดซับนาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนกลีบดอกไม้ใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อย ๆ จนตัวดูดซับ ซับเอาน้ำมันหอมระเหยมากพอ จึงนำมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยออกด้วยแอลกอฮอล์ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Extraction with solvent)

ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุดคือปิโตรเลียมอีเทอร์ วิธีนี้จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จึงไม่ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลง จึงนำวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ต้นทุนการผลิตสูงกว่าวิธีการกลั่น

1. การเลือกตัวทำละลายในการสกัด

การสกัดนิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่าง ๆ กัน โดยอาจสกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำไปยังขั้วสูง ประสิทธิภาพของสารสกัดจะขึ้นอยู่กับ การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งควรมีคุณสมบัติในการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ ไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไป ไม่ติดไฟง่าย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เช่น เฮกเซน เป็นตัวทำละลายที่มีราคาถูกเหมาะสมสำหรับสกัดสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันออกจากสมุนไพร โดยตัวทำละลายที่ใช้กันมากได้แก่ เมทานอลและเอทานอล เนื่องจากมีความสามารถในการละลายกว้างและยังสามารถทำลายเอนไซม์ในพืชได้ (ประเสริฐ ศรีไพโรจน์, 2528)

ตารางที่ 2-2 แสดงความมีขี้ของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ความมีขี้	ตัวทำละลาย
มีขี้	Water
	Methanol
	Ethanol
	Acetone
	Ethyl acetate
	Ethyl ether
	Chloroform
	Dichloromethane
	Benzene
	Toluene
	Ethylene trichloride
	Carbon tetrachloride
ไม่มีขี้	Cyclohexane

การเลือกวิธีสกัด

การสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่

ธรรมชาติของพืชสมุนไพร โดยพิจารณาจาก (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

1. ลักษณะและโครงสร้างของเนื้อเยื่อ สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน หากเป็นสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2. ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในตัวทำละลาย ถ้าละลายได้ง่าย นิยมใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็ต้องจำเป็นต้องใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

3. ความคงตัวของสารสำคัญในพืชสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

4. คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญ และมีคุณค่าทางการรักษาน้อย ก็อาจใช้วิธีง่าย ๆ ที่ไม่ยุ่งยาก และคำนึงถึงค่าใช้จ่ายด้วยว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

5. ความต้องการที่จะให้ได้การสกัดที่สมบูรณ์ (Exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเจือจาง ควรใช้วิธีมาเซอร์ชัน แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการสกัดสารด้วยวิธีมาเซอร์ชัน และสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Extraction with solvent) 3 ชนิด ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้เรียงลำดับจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปสูงคือ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล ตามลำดับ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

โครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นวิธีการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันที่ได้ผลดีมากและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยความแตกต่างการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งอาจเป็นของเหลวหรืออาจเป็นแก๊ส กับอีกเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) หรือของเหลวที่เคลือบอยู่บนวัสดุช่วยพยุง ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2553)

ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟี คือ

1. ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม
2. ตรวจสอบความสม่ำเสมอของสารตัวอย่าง
3. ทำสารให้บริสุทธิ์
4. ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาร
5. ตรวจสอบวิเคราะห์หาปริมาณ
6. ตรวจสอบสารปนเปื้อน

1. **ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี** เป็นเทคนิคที่ใช้แยกและตรวจสอบสารปริมาณน้อย ๆ โดยใช้เฟสอยู่กับที่ ส่วนใหญ่นิยมใช้สารที่เป็นซิลิกาเจล อลูมินา หรือเซลลูโลส เมื่อหยดสารละลายตัวอย่างซึ่งเป็นสารผสมลงบนแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ไปลงในแทงก์ซึ่งบรรจุตัวทำละลาย ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ หรือระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่เรียกว่า Development จะเกิดการแยกสารประกอบต่าง ๆ ออกจากกัน

โดยอาศัยกลไกที่กล่าวมาแล้วข้างต้น อาจมีกลไกมากกว่าหนึ่งกลไก ขึ้นอยู่กับธรรมชาติและคุณสมบัติของเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2553)

2. แก๊สโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้แก๊สเฉื่อยทำหน้าที่เป็นแก๊สพา ซึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้แยกสารที่ระเหยง่าย และมีความเสถียรภาพทางความร้อน ในเทคนิคนี้ตัวอย่างจะถูกนำเข้าสู่ระบบและเกิดการระเหยเป็นไอที่จุดฉีดสาร โดยมีการใช้ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม และสื่อสารกับส่วนประกอบต่าง ๆ รับสัญญาณข้อมูลจากดีเทคเตอร์ตลอดจนใช้ประมวลผล และการออกรายงานผลไปที่เครื่องพิมพ์

3. แมสสเปกโตรเมตรี เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ไม่ทราบชนิด และใช้ในการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลได้เป็นอย่างดี โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของมวลที่มีประจุซึ่งหมายถึงไอออนในสนามไฟฟ้าหรือสนามแม่เหล็ก พฤติกรรมเคลื่อนที่ดังกล่าวขึ้นอยู่กับค่ามวลต่อประจุของไอออน นอกจากนี้การทราบประจุของไอออนจะทำให้สามารถทราบค่ามวลของไอออนนั้น ๆ ได้ (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2553)

พฤกษเคมีเบื้องต้น

พฤกษเคมี (Phytochemicals) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่พบในพืช โดยมีขอบเขตเกี่ยวกับการสกัดสารสำคัญจากพืช การแยกสารให้บริสุทธิ์ การหาสูตร โครงสร้าง และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารเคมีที่แยกได้จากพืช การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในพืช ตลอดจนการศึกษากระบวนการชีวสังเคราะห์ และกระบวนการสลายสารเคมีในพืช เป็นต้น (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

1. กลุ่มสารสำคัญในพืช

สารเคมีที่พบในพืชมีจำนวนมาก สามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้นของสารเหล่านี้ได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites)

1.1 สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) เป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูง โดยทั่วไป พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด เป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับเมตาโบลิซึมที่จำเป็นของเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช และกระบวนการชีวสังเคราะห์ กรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน กรดอะมิโน เอนไซม์ เป็นต้น

1.2 สารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้มักแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน สารทุติยภูมิสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ดังนี้

ตารางที่ 2-3 การแบ่งกลุ่มสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites)

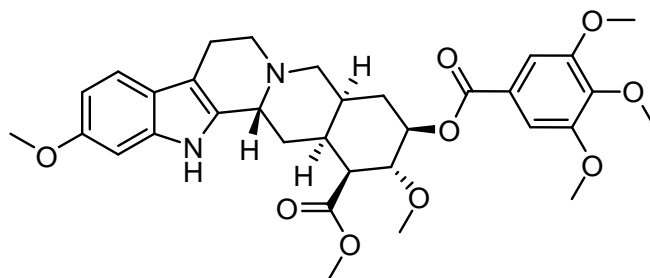
สารทุติยภูมิ	กลุ่มย่อยของสารทุติยภูมิ
1. อัลคาลอยด์ (Alcaloids)	-
2. สารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compounds)	- ฟีนอล และฟีนอลิกไกลโคไซด์ (Phenol and Phenolic Glycosides) - คูมาริน (Coumarins) - ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) - แทนนิน (Tannins) - ควิโนน (Quinone)
3. เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์ (Terpenoids and Steroids)	
3.1 กลุ่มเทอร์พีนอยด์	- ซาโปนิน (Saponins) - โมโนเทอร์พีน (Monoterpenes) - เซสควิเทอร์พีน (Sesquiterpenes) - ไดเทอร์พีน (Diterpenes) - ไตรเทอร์พีน (Triterpenes) - เตตราเทอร์พีน (Tetraterpenes) - น้ำมันหอมระเหย (Volatile oils) - เรซิน และ โอเลโอเรซิน (Resins and Oleoresins)
3.2 กลุ่มสเตอรอยด์	- ซาโปนิน (Saponins) - คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) - ไกลโคไซด์ชนิดอื่น ๆ (Other glycosides)
4. สารกลุ่มกลูโคซิโนเลท (Glucosinolate compounds)	-

ที่มา: นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ (2544)

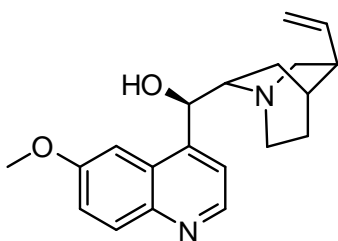
สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการศึกษาพฤกษเคมีที่เป็นสาระสำคัญของพืชในกลุ่มสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ได้แก่

1. อัลคาลอยด์ (Alcaloids)

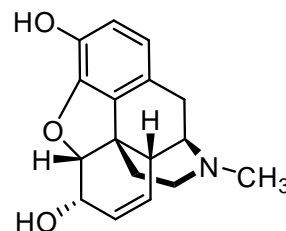
อัลคาลอยด์ เป็นสารอินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นด่าง และมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร แต่ปริมาณสารจะต่างกันไปตามฤดูกาล อัลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ แก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน ยาตา ตลอดจนยาที่ควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น Reserpine (ภาพที่ 2-3) ในรากชะเอม สรรพคุณลดความดันเลือด สาร Quinine (ภาพที่ 2-4) ในเปลือกต้นชิงโคนา (Cinchona) มีสรรพคุณรักษาโรคมาเลเรีย และสาร Morphine (ภาพที่ 2-5) ในยางของผลฝิ่น มีสรรพคุณระงับอาการปวด เป็นต้น นอกจากนี้ประโยชน์ในการรักษาแล้ว อัลคาลอยด์จำนวนไม่น้อยที่เป็นพิษต่อร่างกาย ใช้เป็นยาพิษ ยาม้าแมลง และใช้ในการล่าสัตว์



ภาพที่ 2-3 สูตรโครงสร้างของ Reserpine



ภาพที่ 2-4 สูตรโครงสร้างของ Quinine



ภาพที่ 2-5 สูตรโครงสร้างของ Morphine

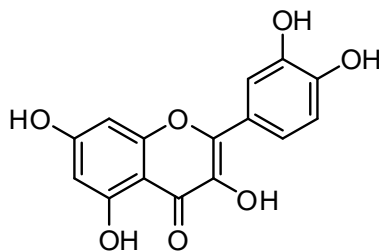
2. สารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compounds)

สารกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่มาก โดยทั่วไปโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ hydroxyl อย่างน้อยหนึ่งกลุ่ม ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปกลุ่ม -OH อิสระ หรือจับอยู่กับสารอื่นในรูปของอีเทอร์ หรือไกลโคไซด์ก็ได้ แต่เพื่อแยกสารกลุ่มฟีนอลิกออกจากอัลคาลอยด์และเทอร์พีน ดังนั้นสารกลุ่มฟีนอลิกในพืชจึงหมายถึงกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ hydroxyl อย่างน้อย 1 กลุ่ม โดยที่ไม่มีในโตรเจนในโมเลกุล การตรวจหา Phenolic hydroxyl group อาจทำได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์สีที่ เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนของ Phenolic hydroxyl group ที่มีอยู่ในสารนั้น เช่น

สารที่มี Phenolic hydroxyl group 1 กลุ่ม จะให้สีม่วง

สารที่มี Phenolic hydroxyl group 2 กลุ่ม จะให้สีเขียว

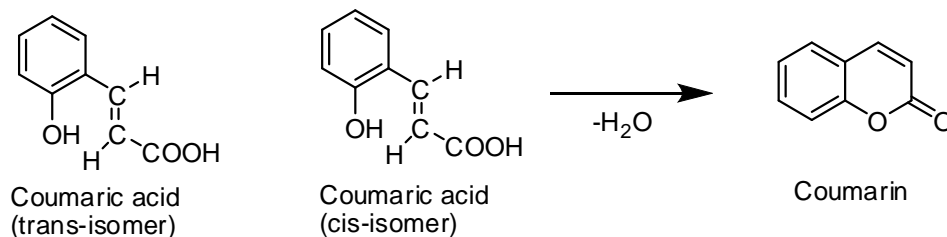
สารที่มี Phenolic hydroxyl group 3 กลุ่ม จะให้สีน้ำเงิน



ภาพที่ 2-6 สูตรโครงสร้างของ Quercetin

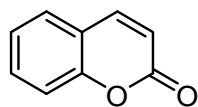
3. คูมาริน (Coumarins)

สารจำพวกคูมาริน เป็นแอลกอฮอล์ของ o-hydroxy cinamic acid ในพืชจะพบได้ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ คูมาริน เกือบทั้งหมดในธรรมชาติจะมีออกซิเจนที่ตำแหน่ง C-7 (อาจพบในรูปของ hydroxyl หรือ alkoxy) สารกลุ่มนี้อาจจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือได้จากการสังเคราะห์โดยทำให้เกิด cyclization เป็น lactone ring ขึ้น สารในกลุ่มคูมารินสามารถดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตได้ในช่วงคลื่นที่กว้างให้การเรืองแสงสีฟ้า สีเขียวอมเหลืองถึงเหลืองและม่วงแล้วแต่ชนิดของคูมาริน คูมารินที่มีกลุ่ม OH อิสระอยู่บน benzene ring จะมีคุณสมบัติเรืองแสงได้ในตัวเอง แต่สำหรับสารที่ไม่มี OH อิสระอยู่บน benzene ring เช่น ตัว Coumarin เองจะไม่เรืองแสง จะต้องนำมาทดสอบด้วยด่างเพื่อให้ lactone ring แตกออก ดังสมการในภาพที่ 2-8 แล้วจึงส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อเปลี่ยนจาก Cis-form ให้เป็น Trans-form จึงจะเกิดเรืองแสงสีเขียวอมเหลือง โดยจะเห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อมีแอมโมเนียอยู่ (รัตนาน อินทรานุปกรณ์, 2547)

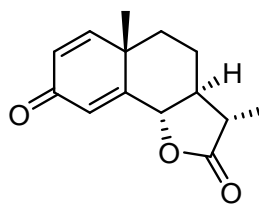


ภาพที่ 2-7 การเกิด lactone ring ของ สารคูมาริน

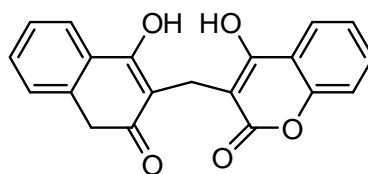
สารจำพวกคูมารินอาจใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น Coumarin (ภาพที่ 2-8) เองใช้เป็นสารแต่งกลิ่น สาร Santonin (ภาพที่ 2-9) เคยใช้เป็นยาขับพยาธิ แต่ปัจจุบันเลิกใช้แล้วเพราะมีพิษ Psoralen และ Bergapten ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้ผิวหนังไวต่อแสง ใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่างขา Visnadin ซึ่งเป็น Pyranocoumarin ใช้เป็นยาขยายหลอดเลือดหัวใจ Dicoumarol (ภาพที่ 2-10) มีฤทธิ์ป้องกันการแข็งตัวของเลือด เป็นต้น



ภาพที่ 2-8 สูตรโครงสร้างของ Coumarin



ภาพที่ 2-9 สูตร โครงสร้างของ Santonin



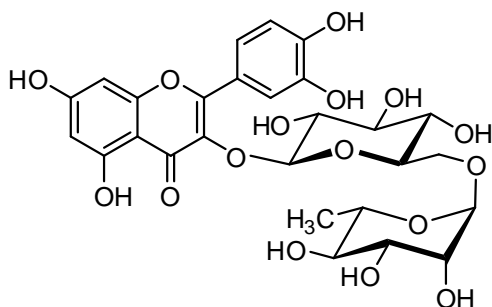
ภาพที่ 2-10 สูตร โครงสร้างของ Dicoumarol

4. ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

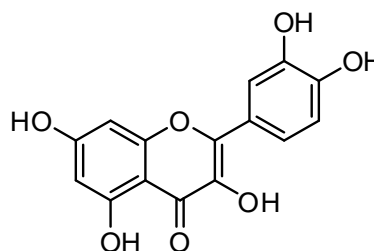
ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenolic compound) จำพวกฟีนิลโครโมน (Phenyl chromones) และอนุพันธ์ พบมากในธรรมชาติ โดยมักพบเป็นเม็ดสี (Pigment) ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เป็นสารประกอบที่ทำให้สีสันของดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้หลายชนิด

นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) จากดวงอาทิตย์ด้วย สีสีนจากสารสี (Pigment) บนกลีบดอกยังทำหน้าที่ล่อแมลงให้มาช่วยในการถ่ายเรณูอีกด้วย การสร้างสารกลุ่มนี้ในพืช ถูกสร้างขึ้นจากวิถีของกรดชิกิมิก (Shikimic acid pathway) และวิถีอะซีเตต (Acetate pathway) การสกัดฟลาโวนอยด์จากพืชสด นิยมสกัดด้วยเมทานอล หรือเอทานอล ทั้งฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์และอะไกลโคโคนจะไม่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ จึงมักสกัดพืชด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ก่อนเพื่อสกัดเอาไขมันออกก่อนที่จะสกัดด้วยแอลกอฮอล์ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

ฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น Rutin (ภาพที่ 2-11) ซึ่งพบได้ในพืชหลายชนิด ใช้รักษาโรคเส้นเลือดฝอยเปราะ Quercetin (ภาพที่ 2-12) มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านไวรัสโดยออกฤทธิ์เป็นทั้ง Anti-infective และ Antireplicative ของไวรัสหลายชนิด นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์บางชนิดยังมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย เช่น Oligomer proanthocyanidin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในเมล็ดองุ่นและไวน์แดง เป็นต้น



ภาพที่ 2-11 สูตร โครงสร้างของ Rutin



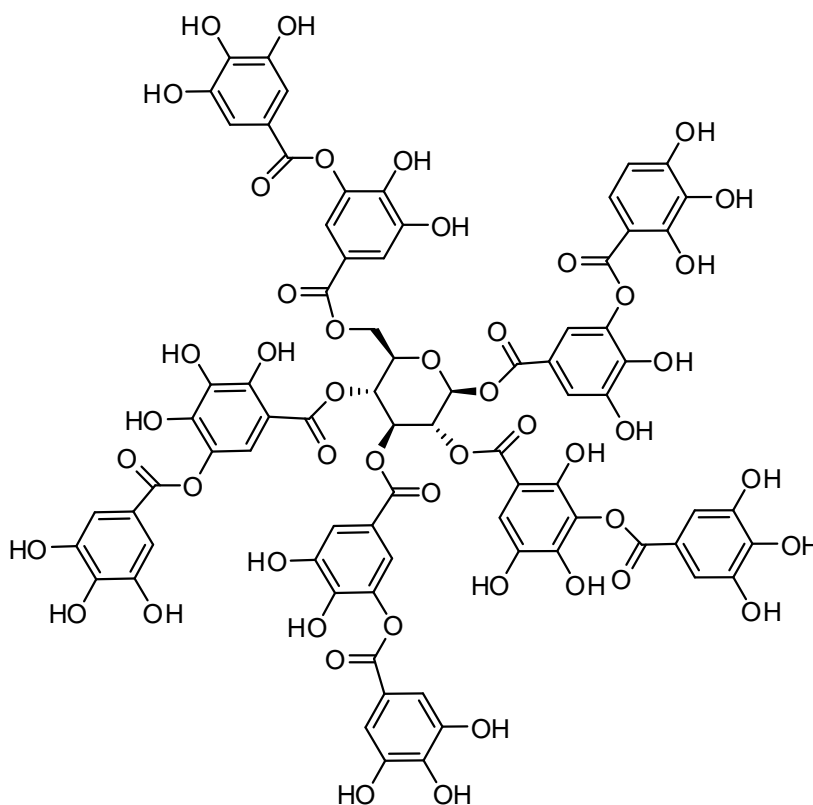
ภาพที่ 2-12 สูตร โครงสร้างของ Quercetin

5. แทนนิน (Tannins)

แทนนินเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลซับซ้อน มักเป็นสารผสมของสารจำพวก โพลีฟีนอล ประกอบด้วยเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดกัลลิก (Gallic acid) หรือสารประกอบพอลิไฮดรริก (Polyhydric compound) จับกับน้ำตาลกลูโคส หรือเกิดจากสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) จับกับสารคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน ได้แก่ กรดแทนนิก (Tannic acid) และ ฮามามิแทนนิน (Hamamelitannin) แทนนินสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบจำพวกโปรตีน สามารถดูดซับสีย้อมและใช้ในการฟอกหนังสัตว์ แทนนินเป็นสารประกอบที่พบในพืชหลายชนิด การตรวจสอบแทนนินในพืชทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา Gelatin-salt block test ทั้ง Hydrolysable tannin และ Condensed tannin จะตกตะกอน นอกจากนี้ยังอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแทนนินกับ เฟอร์ริกคลอไรด์ ให้สีน้ำเงิน-ดำ-เขียว เพื่อใช้เป็นการยืนยันว่ามีแทนนินอยู่จริง

ประโยชน์และโทษของแทนนิน

1. แทนนินใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนังเนื่องจากแทนนินสามารถตกตะกอนโปรตีนที่หนังสัตว์ได้
2. ใช้เป็นยาฝาดสมาน เช่น Tannic acid ใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยาแก้ท้องเสีย หรือใช้กับบาดแผลที่ผิวหนัง เพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น
3. แทนนินอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ จึงควรระวังในการรับประทานแทนนินเป็นประจำ พบว่าในหมากซึ่งมีแทนนินและอัลคาลอยด์ Arecoline จะทำให้คนกินหมากเป็นเวลานาน ๆ เป็นมะเร็งในช่องปากและลำคอได้



ภาพที่ 2-13 สูตรโครงสร้างของ Tannin

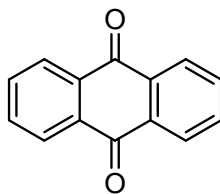
6. ควิโนน (Quinone)

ควิโนนเป็นสารฟีนอลิกที่ประกอบด้วย 1,4-diketo-cyclohexa-2,5-diene (เรียกว่า Para-quinone) หรือ 1,2-diketo-cyclohexa-3,5-diene (เรียกว่า Ortho-quinone) ควิโนนที่พบในธรรมชาติมักพบเป็นเบนโซควิโนน (Benzoquinones) แนพโทควิโนน (Naphthoquinones)

แอนทราควิโนน (Anthraquinones) เป็นต้น

สารกลุ่มควิโนนที่ผู้วิจัยทดสอบคือ แอนทราควิโนน (Anthraquinone)

แอนทราควิโนน (Anthraquinone) เป็นสารควิโนนที่พบมากที่สุด พบได้ทั้งในรูปอิสระและไกลโคไซด์ โดยมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยระบบสามวงแหวนเป็นสารที่มีสีแดง-ส้ม แต่อาจจะพบได้ตั้งแต่สีเหลือง-น้ำตาล ส่วน อะไกลโคนของแอนทราควิโนนละลายได้ดีในด่างให้สีชมพู-แดง ละลายได้ในตัวทำละลาย เช่น เบนซีน อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม สารจำพวกแอนทราควิโนนนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาระบายและยาถ่ายอย่างกว้างขวาง โดยออกฤทธิ์เป็น Stimulant cathartics นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์เป็นสีย้อม ใช้เป็นยารักษาเชื้อราที่ผิวหนัง และมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อไวรัส Herpes simplex type 1 อีกด้วย (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

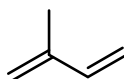


ภาพที่ 2-14 สูตรโครงสร้างของ Quinone

7. เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์ (Terpenoids and Steroids)

7.1 กลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

เทอร์พีนอยด์ หรือเทอร์พีน เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยเล็กที่สุด เรียกว่า Isoprene unit ซึ่งเป็น branch chain ของคาร์บอน 5 อะตอม และมีพันธะคู่



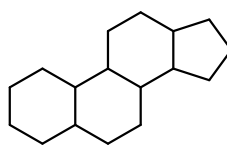
ภาพที่ 2-15 สูตรโครงสร้างของ isoprene unit (C₅H₈)

เทอร์พีนอยด์ ส่วนใหญ่ละลายได้ดีในไขมัน ไม่มีสี (ยกเว้น Carotenoid) พบได้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ หรือในเนื้อเยื่อพิเศษ เช่น น้ำมันหอมระเหย พบได้ในเซลล์ต่อมของผิวใบ การสกัดสารเทอร์พีนอยด์จากพืชทำได้โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ อีเทอร์ หรือคลอโรฟอร์ม และสามารถแยกได้โดยวิธีทางโครมาโตกราฟี สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์มีประโยชน์

มากมาย เช่น มหาหิงษ์ (Asafetida) ใช้เป็นยาช่วยขับลม ยาขับเสมหะ ยาคลายตัวของกล้ามเนื้อ
ยางสน (Turpentine) ใช้เป็นยาภายนอก มีฤทธิ์ทำให้ผิวหนังร้อนแดง เป็นต้น

7.2 กลุ่มสเตอรอยด์ (Steroids)

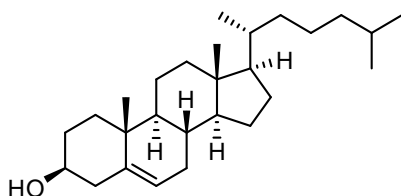
สเตอรอยด์ เป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น Cyclopentano perhydrophenanthrene nucleus เป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญ เนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาลดการอักเสบ ยารักษา
โรคหัวใจ ยาขับปัสสาวะ ตลอดจนนำมาสังเคราะห์เป็นฮอร์โมนเพศ และยากุมกำเนิดหลายชนิด
สารในกลุ่มสเตอรอยด์ที่สำคัญ ซึ่งจะกล่าวต่อไปคือ ซาโปนิน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์



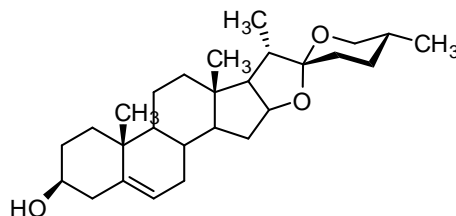
ภาพที่ 2-16 สูตรโครงสร้างของ Cyclopentano perhydrophenanthrene

8. ซาโปนิน (Saponins)

ซาโปนิน หรือซาโปนินไกลโคไซด์ เป็นไกลโคไซด์ ที่มีส่วนอะไกลโคน (Sapogenin)
เป็นสารจำพวกสเตอรอยด์ หรือ ไตรเทอร์พีนอยด์ ส่วนนี้จะจับกับน้ำตาล หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลที่
ตำแหน่ง C₃ ได้เป็น o-glycoside ซาโปนินไกลโคไซด์ มีคุณสมบัติบางอย่างคล้ายสบู่ เช่น สามารถ
เกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี และทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ ซาโปนินจึงสามารถ
ใช้เป็นสารชะล้างแทนสบู่ได้ คุณสมบัติที่เป็นฟอง ทำให้ใช้เป็นสารฟ้นดับไฟได้ มีความเป็นพิษต่อ
สัตว์เลือดเย็น จึงใช้เป็นสารเบื่อปลา และประโยชน์ที่สำคัญที่สุดคือ ใช้เป็นสารตั้งต้นในการ
สังเคราะห์ยาจำพวก Steroid hormones



ภาพที่ 2-17 สูตรโครงสร้างของ Steroid skeleton

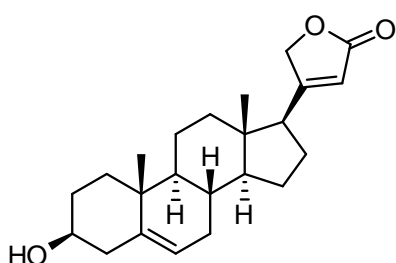


ภาพที่ 2-18 สูตรโครงสร้างของ Diosgenin

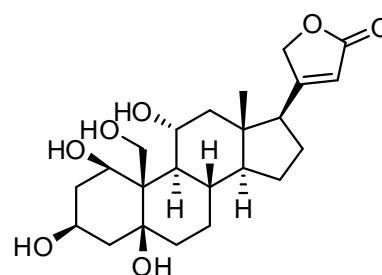
9. คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycoside)

คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ อาจเรียกว่า Cardiotonic glycosides เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อหัวใจ โดยไปเพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ใช้รักษาโรคหัวใจวาย ผลในการรักษาขึ้นอยู่กับชนิดของอะไกลโคโคน และชนิดของน้ำตาล น้ำตาลจะช่วยให้อะไกลโคโคนละลายได้ดีขึ้น เป็นผลให้การดูดซึมและการกระจายตัวของสารในร่างกายเพิ่มขึ้น จึงช่วยให้การออกฤทธิ์ของสารดียิ่งขึ้น (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

ไกลโคไซด์จากพืชที่นำมาใช้รักษาโรคหัวใจ



ภาพที่ 2-19 สูตร โครงสร้างของ Digitoxigenin



ภาพที่ 2-20 สูตร โครงสร้างของ Ouabagenin

อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

1. อนุมูลอิสระ (Free radical)

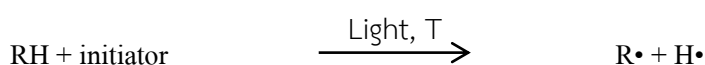
อนุมูลอิสระ หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electrons) ในอะตอม หรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามากและสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิด ความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่าง ต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ดังนี้

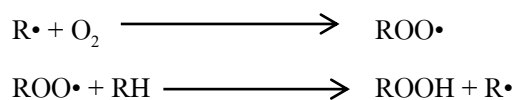
1.1. ปัจจัยภายในร่างกาย

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสารที่เรียกว่า กระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (Auto-oxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

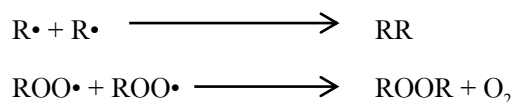
1.1.1 ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (Initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ โดยมีแสงหรืออนุมูลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ



1.1.2 ระยะเพิ่มจำนวน (Propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (Peroxy radical) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydro peroxide) ซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งก็จะเกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ดังสมการ

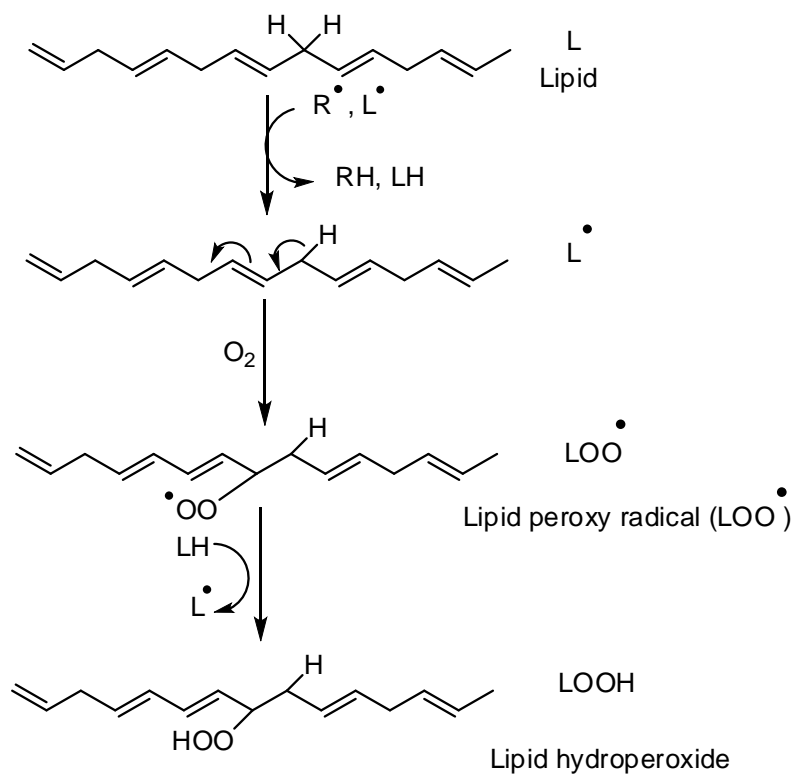


1.1.3 ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ



ตัวอย่างเช่น กลไกการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เริ่มต้นเมื่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว (LH) ถูกอนุมูลอิสระ (R•) ดังไฮดรเจนออก ทำให้เกิดอนุมูลอิสระบนอะตอมคาร์บอนของลิพิด และเกิดอนุมูลลิพิด (L•) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้อย่างรวดเร็วเกิดเป็นอนุมูลลิพิดเปอร์ออกซี (LOO•) และทำปฏิกิริยาต่อไปกับลิพิดโมเลกุลอื่น ๆ เกิดลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (LOOH) กับอนุมูลลิพิด (L•) ใหม่ ๆ เพิ่มเข้าสู่วงจร และอนุมูลลิพิดที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่กับ

ลิปิดโมเลกุลอื่น ๆ ต่อไปเรื่อย ๆ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) ในที่สุด



ภาพที่ 2-21 กระบวนการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว

1.2 ปัจจัยภายนอกในร่างกาย

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็งเช่น Bleomycin, Anthracyclines และ Methotrexate เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Prooxidation)

รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (X-ray), รังสีแกมมา (γ -ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นต่อไป (Secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้ อนุมูลอิสระเกิดขึ้น

ควันทูหรี ในควันทูหรีมีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO) ในโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของ

เอ็นไซม์ ไซโตโครม P-450 ไฮดรอกซีเลส (Cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับ และพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ภายในเซลล์ดังกล่าว

โอโซน ไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูป เป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง

อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเอง อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ Oxygen radical, อนุพันธ์ของ Oxygen radical (เช่น Superoxide radical และ Hydroxyl radical), Hydrogen peroxide, Transition metals (โลหะ ทรานซิชัน), Carbonate radical ($\text{CO}_3 \cdot$), Nitrate radical ($\text{NO}_3 \cdot$), Methyl radical ($\text{CH}_3 \cdot$), Superoxide radical ($\text{O}_2 \cdot$), Peroxyl radical ($\text{ROO} \cdot$), Reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษโดยในภาวะที่ผิดปกติ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นร่างกายจำเป็นต้องหาทาง ป้องกันการ โดนทำลายจากอนุมูลอิสระเหล่านั้น โดยสิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเอง ก็คือ ระบบแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidants) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ ก็สามารถจะชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (Substrate) ที่ไวต่อการ เกิดปฏิกิริยา โดยสาร (Substrate) เหล่านี้รวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ระบบ แอนติออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า Oxidative stress ขึ้นมาซึ่งจะส่งผลกระทบต่อ ต่าง ๆ ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น การทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายของกลุ่มโมเลกุลที่มีพันธะ S-H และเชื่อมุ่เซลล์ ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และ การทำลายเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการแก่ (Aging) และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรกภัยไข้เจ็บต่าง ๆ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune disease) โรคที่เกิดจากการที่เลือดกลับไป เลี้ยงอวัยวะที่เคยมีการตีบตันของเส้นเลือดในระยะสั้น ๆ มาก่อน (Reoxygenation injury, Reperfusion injury) รวมไปถึงโรคมะเร็ง เป็นต้น (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557)

2. สารต้านอนุมูลอิสระ

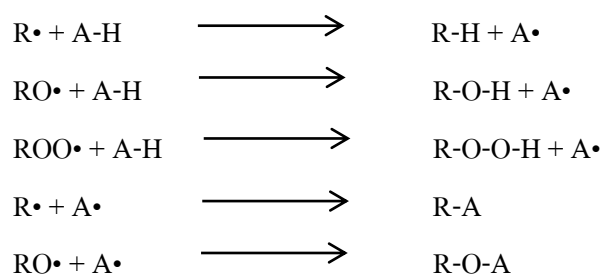
อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดความชรา จึงมีการป้องกันอันตรายจากสารนี้โดย ทดลองใช้สารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อชะลอความชราและการเกิดโรคต่าง ๆ สารต้าน อนุมูลอิสระมีสมบัติป้องกันหรือช่วยทำให้ไขมันหรือน้ำมันเกิดการหืนได้ช้าลง จึงเป็นสารที่มัก นำมาเติมลงในไขมัน น้ำมัน ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันและเครื่องสำอาง เพื่อยับยั้ง

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ไขมัน น้ำมัน และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันมีความคงตัว รักษาคุณลักษณะ กลิ่นและรสชาติไว้ได้นานขึ้น

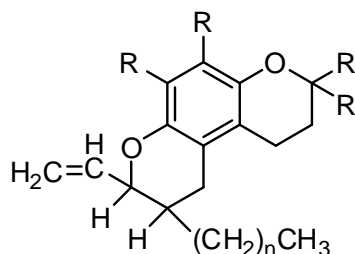
กลไกการทำงานของสารต้านออกซิเดชัน

หน้าที่สำคัญที่สุดของสารต้านออกซิเดชันในอาหาร คือ ชะลอหรือยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง ในกรณีที่ไม่ใช่อาหาร เช่น ในน้ำมันรถยนต์ (Gasoline) น้ำมันหล่อลื่น (Lubrications) ยาง (Rubber) และสารอื่น ๆ สารต้านออกซิเดชันจะทำหน้าที่เป็น Peroxide decomposers

สารต้านออกซิเดชันบางชนิด เช่น วิตามินซีจะทำหน้าที่ต้านออกซิเดชัน โดยวิตามินซีจะถูกออกซิไดส์ก่อนสารอื่น ตัวอย่างการทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Autoxidation) ของสารต้านออกซิเดชันมีดังสมการ โดยกำหนดให้สารต้านออกซิเดชันมีสูตรเป็น AH จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระต่างๆ เพื่อหยุดปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่องได้ดังนี้

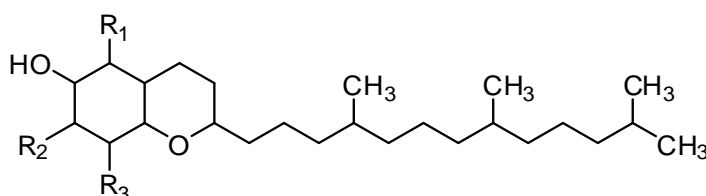


จากสมการของปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าสารต้านออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้มีปริมาณอนุมูลอิสระลดน้อยลง และมีสารประกอบที่เกิดขึ้นใหม่ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันกับออกซิไดส์ลิพิด ตัวอย่างเช่น การใช้วิตามินอีหรือโทโคฟีรอลเป็นสารต้านออกซิเดชันให้แก่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวในน้ำมัน จะพบว่ามีการประกอบของ Tocopherol-linoleic acid ดังภาพที่ 2-22



ภาพที่ 2-22 สูตรโครงสร้างของ Tocopherol-linoleic acid

สำหรับสารต้านออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก กรดซิตริก กรดคาร์ตริก เลซิทีน วิตามินอี (โทโคฟีรอล) ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ โทโคฟีรอล ชนิดแอลฟา-บีตา-แกมมา-และเดลตา-โทโคฟีรอล ดังภาพที่ 2-23



ภาพที่ 2-23 สูตรโครงสร้างของ Tocopherol

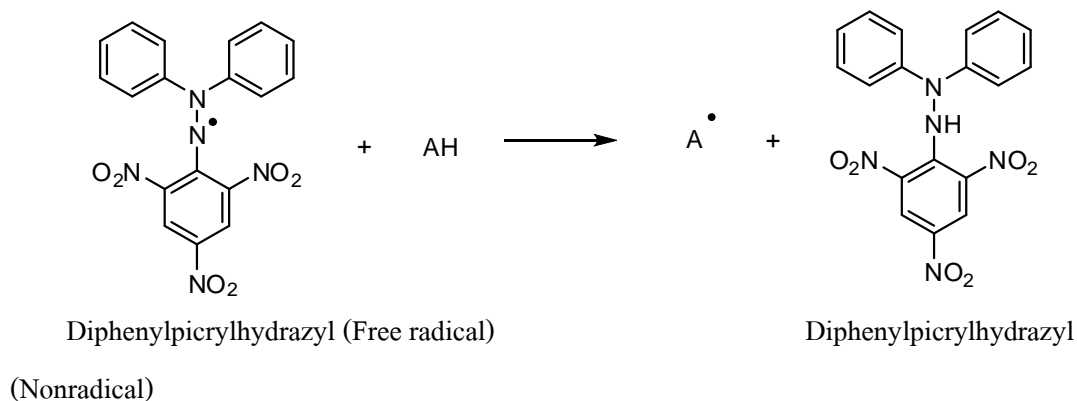
โทโคฟีรอล ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติ ให้กับสิ่งมีชีวิตในเซลล์ และเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ ปริมาณโทโคฟีรอลที่เหลืออยู่ในน้ำมันพืชภายหลังจากกระบวนการทำให้บริสุทธิ์จะทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันให้แก่น้ำมัน นอกจากนี้สารพวกเลซิทีน และฟอสฟาไต์ก็สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ด้วย รวมทั้งสารพวกฟลาโวน (Flavones) สเตอรอล และ Sulfhydryl compounds

3. การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธี แต่ในที่นี้จะขอล่าถึง คือ DPPH assay 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPPH assay (โอภา วัชรคุปต์, 2549) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้สารตัวอย่างคือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น Stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง คูคกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

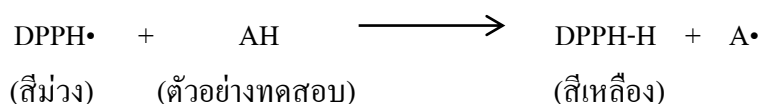
DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจาก โมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 2-24 ปฏิกริยาการเปลี่ยน DPPH ให้เป็นโมเลกุลที่ไม่อนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดการลดลงของ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีความเสถียร สามารถนำไปใช้ในการวัดความสามารถของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอาศัยการจับอิเล็กตรอนให้แก่อนุมูลอิสระ DPPH จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ DPPH ที่มีความคงตัว ทำให้ DPPH ซึ่งมีสีม่วงแดงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ดังสมการ) และทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นที่ 517 นาโนเมตร มีค่าลดลง หากสารตัวอย่างใดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระหรือสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี จะทำให้สีม่วงแดงของ DPPH จางลงได้มากกว่าสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้น้อย และมักเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT), Butylated hydroxyanisole (BHA) หรือ Alpha-Tocopherol เป็นต้น โดยแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระ

ปฏิกริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ DPPH โดย DPPH \cdot จะเกิดปฏิกริยากับ antioxidant (AH) แสดงดังสมการ



ข้อดีของวิธีนี้คือ ทำได้ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อด้อยของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH \cdot มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH \cdot ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วย

วงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรทำให้สารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาจับอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาได้ซ้ำกว่าความเป็นจริง ทั้ง ๆ ที่สารต้านออกซิเดชันนั้นมีฤทธิ์ที่ดีในการจับอนุมูลเปอร์ออกซี (Jaramillo, Arango, Gonzalez, Robledo, & Velez, 2000)

แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรคาริโอต ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่พบจำนวนมากและความหลากหลายมากที่สุดในโลก สามารถแบ่งตามลักษณะของผนังเซลล์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

1. แบคทีเรียแกรมลบ
2. แบคทีเรียแกรมบวก
3. แบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ ได้แก่ ไมโคพลาสมา
4. แบคทีเรียที่ผนังเซลล์ไม่มีเปปติโดไกลแคน ได้แก่ Archaea

แบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกเป็นกลุ่มประชากรเด่นในดิน น้ำและบริเวณใต้พื้นผิวดินลงไป ในขณะที่พวก Archaea พบในสิ่งแวดล้อมที่บีบคั้น สิ่งมีชีวิตจำพวกโพรคาริโอตทั้ง 4 กลุ่มนี้ถูกจัดเป็นพวกที่มีการเจริญและแบ่งตัวรวดเร็ว ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม นั่นหมายถึง ความสามารถที่จะปรับตัวอย่างรวดเร็วต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการกลายพันธุ์จึงมักเพิ่มขึ้นเมื่อมีสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกระตุ้น (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก 4 ชนิดคือ

1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน ส่วนปลายเป็นสี่เหลี่ยม ซึ่งพบมากในดิน น้ำและอากาศ หรือบนผัก ผลไม้ เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถสลายซากพืช ซากสัตว์ และสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี โดยสปอร์ของ *B. subtilis* จะทนสภาพ ร้อนขึ้นได้ถึง 100 °C และต้องใช้เวลา 20-30 นาที จึงจะทำให้ความสามารถในการมีชีวิตของมันลดจำนวนลงได้ แต่ถ้าเป็นสภาวะที่ร้อนแห้ง ความสามารถในการมีชีวิตจะเพิ่มขึ้นอีกถึง 1000 เท่า จึงนิยมใช้เป็นตัวแทนจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความทนทานสูงในสิ่งแวดล้อม โดยคลอรีนไม่สามารถกำจัดได้แม้จะใช้ความเข้มข้นสูงถึง 100 ppm เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วก็ตาม

2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) จัดอยู่ในวงศ์ Micrococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มักพบในคนที่ผิวหนังผิดปกติ เช่น เป็นฝี แผลผ่าตัด แผลอักเสบ เป็นต้น เชื้อนี้ยังแยกได้จาก

สัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข เป็ด ไก่ โค กระบือ สุกร ห่าน และในอาหารสัตว์ เป็นเชื้อที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีมาก ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่ภายนอกร่างกายสัตว์ได้ดี และสามารถพบเชื้อแพร่กระจายอยู่รอบสิ่งแวดลอมในโรงงานผลิตอาหาร เช่น ในโรงงานบรรจุหีบห่อสัตว์ปีก โดยเชื้อสามารถเกาะติดอยู่กับเครื่องมือเครื่องใช้และปนเปื้อนลงในสัตว์ปีกขณะบรรจุหีบห่อได้ คนเป็นพาหะของ *S. aureus* ได้มากพอที่พบเชื้อในอาหาร ถ้าผู้เป็นพาหะจับต้องอาหารด้วยมือ จะทำให้เชื้อปนเปื้อนลงไปและอาจก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษเมื่อบริโภคอาหารได้

S. aureus เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญที่ผิวหนัง เช่น ฝี การติดเชื้อของแผลผ่าตัด แผลอักเสบ เป็นต้น คนที่เป็นพาหะของเชื้อนี้ไม่ได้พบเฉพาะคนที่กำลังเป็นโรคเนื่องจากติดเชื้อนี้เท่านั้น แต่พบในคนที่มีความสุขภาพดีด้วย นอกจากนี้ยังพบตามส่วนอื่น ๆ ของร่างกายได้อีก เช่น ผิวหนัง ในจมูก คอ และผม บางครั้งพบในอุจจาระด้วย (สุจิตรา ทองประดิษฐ์โชติ, 2553)

3. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (Gram negative rod) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ปกติอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบเป็นจำนวนมากในอุจจาระ แต่ไม่พบในปัสสาวะ ด้วยเหตุนี้ทำให้ *E. coli* มีความสำคัญ ในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่บ่งบอกว่าผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของสิ่งปนเปื้อนหรือไม่ ในภาวะร่างกายปกติ เชื้อ *E. coli* ไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะก่อให้เกิดโรคได้ในกรณีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือในสภาวะที่ร่างกายอ่อนแอ เรียกว่า เชื้อฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Secondary infection) กลุ่มผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อที่สำคัญคือ ผู้ที่ต้องทำงานเกี่ยวข้องกับเชื้อโรค ทำให้เกิดการติดเชื้อ จากการทำงาน (Occupational infection) ได้แก่ บุคลากรทางการแพทย์ที่สัมผัสกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ และผู้ทำงานในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ซึ่งต้องสัมผัสกับสารคัดหลั่งจากร่างกายผู้ที่ติดเชื้อ เป็นต้น

E. coli ทำให้เกิดการติดเชื้อโดยเกาะกับผนังเซลล์ของอวัยวะส่วนต่าง ๆ เช่น ไต กระเพาะ ปัสสาวะ จะสร้างสารช่วยในการยึดเกาะให้เชื้ออยู่ในบริเวณนั้นได้ และจะสร้างสารต่าง ๆ ออกมาเพื่อ ทำลายเซลล์ ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อขึ้น *E. coli* ทำให้เกิดกลุ่มอาการที่สำคัญ คือ การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ เชื้อหุ้มสมองอักเสบในทารก และท้องร่วง

4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง จัดอยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae จะพบกระจายในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช สามารถทำให้เกิดโรคในคน สัตว์

แมลง และต้นไม้ได้ เป็นเชื้อโรคฉวยโอกาส จะมีการติดเชื้อกับผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมาก ๆ หรือผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล

P. aeruginosa สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้หลายส่วนของร่างกาย เช่น เกิดการติดเชื้อที่แผลไฟไหม้ โดยจะเกิดเป็นหนองสีเขียว น้ำเงิน ถ้าติดเชื้อจากการเจาะเข้าที่บริเวณเอว จะเกิดเชื้อหุ้มสมองอักเสบ ถ้าติดเชื้อจากสายหรือท่อสวน จะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ ส่วนการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะจากเครื่องช่วยหายใจที่ปนเปื้อน จะทำให้เกิดปอดบวม บางครั้งเชื้ออาจทำให้เกิดการอักเสบของหูชั้นนอกแบบไม่รุนแรงในนักว่ายน้ำ นอกจากนี้อาจทำให้เกิดการอักเสบของหูชั้นนอกชนิดรุนแรงในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน การติดเชื้อที่บริเวณตาจะทำให้เกิดการทำลายอย่างรวดเร็ว ผู้ป่วยที่รักษาด้วยเคมีบำบัด ผู้ที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว ผู้ที่ฉายรังสี ผู้ที่มีแผลไฟไหม้ที่รุนแรง เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดและทำให้ตายได้ เป็นต้น (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากสมุนไพร แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ

1. Dilution method

Dilution method เป็นวิธีหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเรียกความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นี้ว่า Minimal inhibition concentration หรือ MIC ซึ่งการวิเคราะห์หา MIC สามารถทำได้โดยการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ ในของเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง (Agar dilution method) ซึ่ง Dilution Method จะให้ผลที่ละเอียดกว่า Diffusion method แต่ขณะเดียวกันก็ต้องใช้เวลา เครื่องมือ และแรงงานในการทำการทดลองมากกว่า (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

2. Diffusion method

Diffusion method เป็นวิธีการทดสอบความไวของสารต้านจุลินทรีย์ ในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะอาศัยหลักการที่ว่าสารจะซึมจากที่มีความเข้มข้นสูง ไปยังที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงนำสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งอยู่ในรูปแผ่นยาที่เป็นกระดาษกรองหรือเม็ดยาวงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด นั่นคือวิธีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method หรือ Filler paper disc) และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น สามารถสังเกตได้จากการที่จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณโดยรอบที่มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่เป็นที่นิยมกันมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้เวลาทดลองน้อย แต่วิธีนี้ไม่

สามารถอ่านผลได้โดยตรงเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

จากที่กล่าวมาแล้วนั้น จะเห็นได้ว่าการที่จะเลือกการทดสอบวิธีใดนั้น จะต้องพิจารณาจากความละเอียดที่ผู้ทดลองต้องการจำนวนสารสกัดที่จะทดสอบหาปริมาณของสารสกัดที่มีอยู่นั้น ตลอดจนแรงงาน งบประมาณที่ใช้ในการทดลอง โดยการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกวิธีที่เหมาะสมกับการทดลองคือ Diffusion method

หลักการทั่วไป Disc diffusion method คือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (Paper disc) ที่เตรียมไว้ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (Spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบ ๆ แผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือ ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ณัฐธยา ชูสิงห์ ฟาน เบม (2554) ได้ศึกษาผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดทุเรียนเทศ (*Annona muricata*) ต่อเซลล์มะเร็งบางชนิด แบคทีเรียก่อโรคและลูกน้ำยุงลาย ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทุเรียนเทศส่วนต่าง ๆ ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดเมล็ดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งรังไข่ได้ต่ำสุดคือ 6 ชั่วโมง และยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้สูงสุดคือ 18 ชั่วโมง โดยมีค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) เท่ากับ 1.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 938.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ของสารสกัดทุเรียนเทศส่วนต่าง ๆ โดยใช้วิธี Disc-diffusion method (Kirby-Bauer) พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้สูงสุดและต่ำสุด คือ สารสกัดไคคลอโรมีเทนในส่วนใบและสารสกัด 95% เอทานอล ในผลอ่อนของทุเรียนเทศ ตามลำดับ สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้สูงสุดและ

ต่ำสุด คือ สารสกัด 95% เอทานอล จากส่วนใบ และสารสกัด 95% เอทานอล จากเปลือกต้นกับผลอ่อน ตามลำดับ ส่วนผลการทดสอบสารสกัดส่วนต่าง ๆ กับไรทะเลและลูกน้ำยุงลาย พบว่าสารสกัดเฮกเซนจากส่วนเปลือกต้นให้ค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) สูงสุดคือ 985.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อไรทะเล และ 851.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อลูกน้ำยุงลาย ส่วนค่า LC_{50} ต่ำสุดที่มีต่อไรทะเลเท่ากับ 71.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารสกัดเมทานอลในผลแก่ และมีผลต่อลูกน้ำยุงลายเท่ากับ 21.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารสกัด 95% เอทานอลในผลแก่ของทุเรียนเทศ

Sousa et al. (2010) ศึกษาสารสกัดเอทานอลในใบของทุเรียนเทศต่อฤทธิ์ด้านการเจ็บปวดและด้านการอักเสบในหนูทดลองที่เกิดความเจ็บปวดจากสารเคมีและความร้อน ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านความเจ็บปวดในหนูทดลองด้วยการทดสอบ Writhing Test และการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดที่สัมพันธ์กับการอักเสบจากการฉีดฟอร์มอลิน และการทดลองด้วยความสามารถในการทนต่อความร้อน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลในใบของทุเรียนเทศมีฤทธิ์ด้านอาการเจ็บปวดและด้านการอักเสบในหนูทดลองได้

Prasad, Amruta, Sanjay, and Prakash (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดเมทานอลในรากของต้นน้อยโหน่ง ซึ่งเป็นพืชวงศ์ Annonaceae เช่นเดียวกับทุเรียนน้ำ โดยตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระที่ถูกสกัดออกมาด้วยวิธี DPPH และการตรวจวัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar cup method ซึ่งผลการศึกษาพบว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาต้านจุลินทรีย์ และมีประโยชน์ต่อสุขภาพเนื่องจากมีสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้

Soheil, Habsah, Mohammadjavad, Elham, and Hamed (2014) ศึกษาสารสกัดต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตด และ เมทานอล จากส่วนใบของทุเรียนเทศ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ได้ดีที่สุด โดยมีกลไกหยุดยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell cycle arrest) และทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) โดยผ่านกระบวนการ mitochondrial-mediated signaling pathway

Soheil et al. (2015) ศึกษาความสามารถในการสมานรอยแผลของหนูโดยใช้สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากใบทุเรียนเทศ (EEAM) โดยแบ่งกลุ่มของหนูทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ EEAM ปริมาณต่ำ (5% w/w) กลุ่มที่ได้รับ EEAM ปริมาณสูง (10% w/w) และกลุ่มควบคุมทางบวก เมื่อสร้างบาดแผลให้เกิดขึ้นในหนูแต่ละกลุ่ม แล้วรักษาบาดแผลโดยการทายาวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นประเมินผลที่เกิดขึ้น โดยใช้วิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี การตรวจทางเนื้อเยื่อ การศึกษาการออกฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของ Catalase, Glutathione peroxidase และ

Superoxide dismutase (SOD) รวมทั้งการวัดค่าของ Malondialdehyde (MDA) ผลการศึกษาพบว่า การรักษาแผลด้วยยาที่มีสารสกัด EEAM ทั้งสองความเข้มข้นให้ผลที่แตกต่างกัน โดยปริมาณที่ เพิ่มขึ้นของ EEAM ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และ MDA ลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับ เนื้อเยื่อแผลของกลุ่มควบคุม ส่วนการประเมินผลด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีพบว่า การแสดงออกของ Hsp70 เพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้กระบวนการรักษาบาดแผลรวดเร็วยิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 อ่างควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Grant, England
- 1.2 เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น AB204-S
- 1.3 เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) บริษัท Buchi

รุ่น R- 100

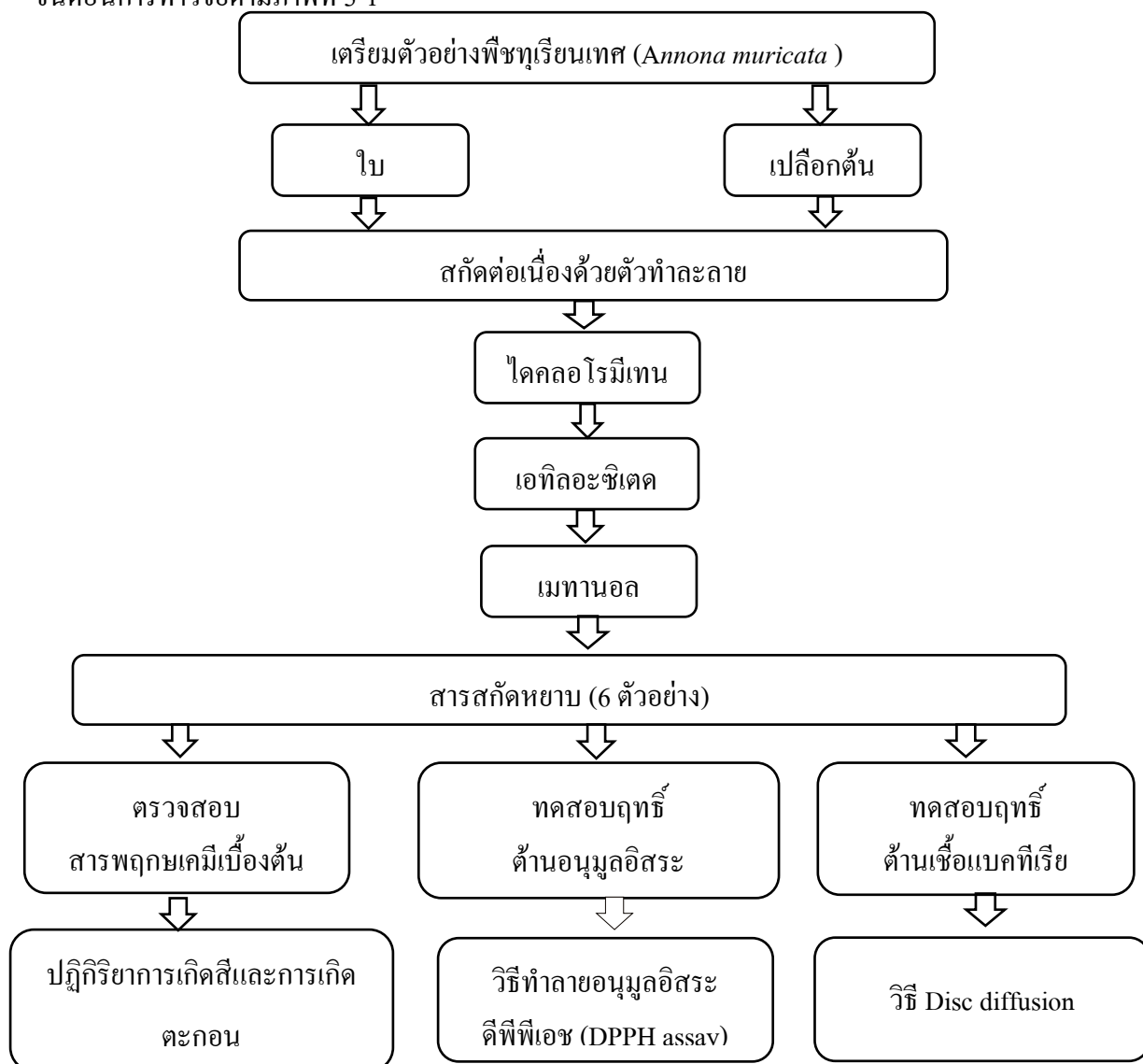
- 1.4 เครื่องส่องรังสีเหนือม่วง ((UV-Light) ยี่ห้อ EUROX V70

2. สารเคมี

- 2.1 Hexane: C_6H_{12} , commercial grade บริษัท J. T. Baker, Germany
- 2.2 Dichloromethane: CH_2Cl_2 , commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA
- 2.3 Ethyl acetate: AtOAc, commercial grade บริษัท J. T. Baker, USA
- 2.4 Methanol: CH_3OH , commercial grade บริษัท J. T. Baker, Germany
- 2.5 Ethanol: C_2H_5OH , AR grade บริษัท J. T. Baker, Germany
- 2.6 Ferric chloride: $FeCl_3$, Laboratory unilab reagent Ajax Finechem
- 2.7 Iodine: I_2 , Analytical univar reagent Ajax Finechem
- 2.8 Sodium hydroxide: NaOH, GR grade, บริษัท Merck.
- 2.9 Glacial acetic acid: CH_3COOH บริษัท Sigma-Aldrich
- 2.10 Hydrochloric acid: HCl, บริษัท Ajax Finechem, New Zealand
- 2.11 Sulfuric acid: H_2SO_4 , บริษัท Ajax Finechem, New Zealand
- 2.12 Ammonia: NH_3 , บริษัท Ajax Finechem, New Zealand
- 2.13 ลวดแมกนีเซียม: Mg, บริษัท Ajax Finechem, New Zealand
- 2.14 Potassium iodide: KI, Analytical univar reagent Ajax Finechem
- 2.15 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท Fuka, Germany

แผนการดำเนินการวิจัย

ทำการสกัดสารสำคัญจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ โดยการแช่หมักในตัวทำละลายตามลำดับคือ ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล เพื่อทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และส่งสารสกัด เพื่อตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีแผนผังขั้นตอนการทำวิจัยตามภาพที่ 3-1



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างทุเรียนเทศ

พืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ ทุเรียนเทศ (*Annona muricata*) ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ใบ และ เปลือกต้น โดยผู้วิจัยเก็บตัวอย่างทุเรียนเทศ จากหมู่บ้านในตำบลบ่อแสน อำเภอทับปุด จังหวัดพังงา ในช่วงเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559



ภาพที่ 3-2 การเก็บตัวอย่างทุเรียนเทศ

2. วิธีการสกัดสารสำคัญจากทุเรียนเทศ

นำตัวอย่างทุเรียนเทศทั้ง 2 ส่วน ได้แก่ ใบ และ เปลือกต้น ที่ตากจนแห้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น และนำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ให้มีน้ำหนัก 500 กรัม นำตัวอย่างทั้งสองส่วนมาสกัดต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1200 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการแช่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่างด้วยกรวยแก้วและกระดาษกรอง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน นำตัวอย่างส่วนที่เหลือจากการกรอง ซึ่งผ่านการหมักด้วยไดคลอโรมีเทนแล้ว สกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตต และเมทานอล โดยใช้วิธีการแช่หมักเป็นเวลา 3 วัน กรองสารละลายที่ได้ และระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ จะได้สารสกัดเอทิลอะซิเตต และสารสกัดเมทานอลตามลำดับ เก็บสารสกัดหยาบที่ได้เพื่อตรวจสอบสารฟลักซ์เคมีเบื้องต้น การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อไป

3. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล จากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ (*Annona muricata*) โดยแบ่งการทดสอบสารพฤกษเคมี ออกเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ดังนี้ (Ayoola et al., 2008)

3.1 การตรวจสอบสารอัลคาลอยด์ (Alkaloids)

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

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 1.5% v/v HCl ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่านำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (Water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปหยดสารละลายแวกเนอร์ (Wagner's reagent) จำนวน 5 หยด เขย่าถ้าปรากฏตะกอนสีเหลืองแสดงว่าพบอัลคาลอยด์

3.2 การตรวจสอบสารฟีนอลิก (Phenolic)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl₃) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบสารในกลุ่มฟีนอลิก

3.3 การตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็กๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl) จำนวน 5 หยด เขย่าและไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่า พบฟลาโวนอยด์

3.4 การตรวจสอบสารแอนทราควิโนน (Anthraquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H₂SO₄ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่านำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่ อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH₃) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบสารแอนทราควิโนน

3.5 การตรวจสอบคูมาริน (Coumarins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำละลาย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่ากรอง ส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง เติมน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6 M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบสารคูมาริน

3.6 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง โดยการชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่าแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลอง แสดงว่าพบซาโปนิน

3.7 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง เติมน้ำละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl₃) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบสารแทนนิน

3.8 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรอง ส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H₂SO₄) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

3.9 การตรวจสอบสเตอรอยด์ (Steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรอง ส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง ค่อย ๆ เติมกรดกลacialแอซิดิก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H₂SO₄) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสารสเตอรอยด์

3.10 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรอง ส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง เติมน้ำละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl₃) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดกลacialแอซิดิก (Glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H₂SO₄) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

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

4.1 การหาระบบตัวทำละลาย

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร ด้วยเทคนิค TLC โดยนำตัวทำละลายมาผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วนำไปใส่ใน Chamber ปิดฝาทิ้งไว้ให้อิ่มตัวซึ่งทำได้โดยแบ่งส่วนสกัดทุเรียนเทศด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ออกมาเพียงเล็กน้อยใส่ใน Vial แล้วเติมตัวทำละลาย จากนั้นทำการ Spot สารลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ แล้วนำ แผ่น TLC ไปจุ่มลงใน Chamber ที่เตรียมไว้ ปิดฝา ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระดับที่กำหนดไว้ นำแผ่น TLC ออกมารองแห้งแล้วนำไปตรวจสอบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV)

4.2 การเตรียมโครมาโทแกรม

4.2.1 เตรียมแผ่นโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ใช้ดินสอดสีขีดเส้นให้ห่างจากขอบด้านหนึ่งประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อเป็นแนวจุดสารเริ่มต้น โดยเส้นนี้ต้องอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย นำสารสกัดหยาบของพืชตัวอย่างมาจุดบนแผ่น TLC

4.2.2 เตรียมระบบตัวทำละลาย TLC เตรียมสารละลายผสมประกอบด้วย เอทิลอะซิเตต: เฮกเซน (1: 3) นำหลอดคเคปิลารีมาจุ่มสารส่วนสกัดหยาบแล้วนำมาจุดบน TLC ตรงตำแหน่งบนเส้นดินสอด ปล่อยให้แห้ง แล้วจุดสารลงไปซ้ำ หลายครั้งจนได้สารสกัดเข้มข้น ใช้ดินสอดกำหนดตำแหน่งระดับตัวทำละลายสิ้นสุดขอบบนแล้วนำ แผ่น TLC ที่จุดสารแล้วไปจุ่มในขวดที่บรรจุตัวทำละลาย ระวังให้สารต้องอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย ปิดฝา แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมผ่านแผ่น TLC จนถึงตำแหน่งสิ้นสุดของตัวทำละลาย ให้นำ แผ่น TLC ออกมาผึ่งให้แห้ง สังเกตและบันทึกโครมาโทแกรม

4.2.3 นำแผ่นโครมาโทแกรมมาตรวจสอบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ด้วยเครื่องส่องรังสีเหนือม่วง (UV-Light) มองที่แผ่น TLC ระวังอย่ามองหลอดแสง UV โดยตรง บันทึกภาพโครมาโทแกรมภายใต้แสง UV

4.2.4 ทำการทดลองหาระบบตัวทำละลายอื่นๆ ที่สามารถแยกสารได้ดีที่สุด โดยปรับระบบตัวทำละลาย พิจารณาเพิ่มความเข้มข้น โดยปรับอัตราส่วน เอทิลอะซิเตต: เฮกเซน เป็น 2: 3 หรือ 1: 1 หรือ ใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน ที่อัตราส่วนต่าง ๆ เป็นต้น

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

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี Disc diffusion โดยส่งทดสอบที่ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งมีวิธีการทดสอบ

5.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

5.1.1 เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.1.2 ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อทดสอบประมาณ 5 โคโลนี เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

5.1.3 ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และทำการนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีการ drop plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)

5.2 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น โดยวิธี disc diffusion

5.2.1 ละลายสารสกัดจากทุเรียนเทศด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นหยดสารสกัดทุเรียนเทศลงในดิสก์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหยด DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายลงในดิสก์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Negative control) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที

5.2.2 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อที่เตรียมไว้ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นป้ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) ให้ทั่ว (อาหาร MHA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร) โดยป้ายในแนว 3 ระบาย และใช้ปากคีบปราศจากเชื้อ คีบแผ่นดิสก์ที่บรรจุสารสกัด (Paper disc) คือ ดิสก์ยาคลอแรมฟิโนคอกอล ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อดิสก์ (Positive control) และดิสก์บรรจุสารละลาย DMSO (Negative control) วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำจานเพาะเชื้อ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการนำใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ มาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล จากนั้นนำไปประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่าง นำสารสกัดที่ได้ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อแบคทีเรีย มีผลการทดสอบเป็นดังนี้

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

นำสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศไปตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น โดยใช้ปฏิบัติการเปลี่ยนสีและการตกตะกอน ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

สารพฤกษเคมีเบื้องต้น	สารสกัด		สารสกัด		สารสกัด	
	ไดคลอโรมีเทน		เอทิลอะซิเตด		เมทานอล	
	ใบ	เปลือก	ใบ	เปลือก	ใบ	เปลือก
1. อัลคาลอยด์	-	+	+	+	+	+
2. ฟีนอลิก	-	-	+	+	+	+
3. ฟลาโวนอยด์	-	+	-	-	-	-
4. แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-	-
5. คูมาริน	-	-	+	+	+	-
6. ซาโปนิน	+	+	+	+	+	+
7. แทนนิน	-	-	-	-	-	+
8. เทอร์ปีนอยด์	-	-	-	-	-	-
9. สเตอรอยด์	-	-	-	-	-	-
10. คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ (-) ไม่พบสารพฤกษเคมี, (+) พบสารพฤกษเคมี

จากการทดสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น 10 กลุ่ม คือ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีและการตกตะกอน พบสารพฤษเคมีเบื้องต้น 7 กลุ่มคือ อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แต่ไม่พบสารในกลุ่ม แอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์ โดยให้ผลการทดสอบดังนี้

1.1 การตรวจสอบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตด และเมทานอล จากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ รวมทั้งสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ เกิดการตกตะกอนสีเหลืองด้วยสารละลายแวกเนอร์ แสดงว่ามีสารในกลุ่มอัลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

1.2 การตรวจสอบสารในกลุ่มฟีนอลิกและแทนนิน พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตด และเมทานอลจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ เกิดการเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเขียวดำ หรือน้ำเงินดำด้วยเฟอร์ริกคลอไรด์ แสดงว่ามีสารในกลุ่มฟีนอลิก และสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ เกิดการเปลี่ยนสีสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำเข้มด้วยเฟอร์ริกคลอไรด์ แสดงว่ามีสารแทนนินเป็นองค์ประกอบ โดยแทนนินเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มฟีนอลิกด้วย

1.3 การตรวจสอบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบการเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเหลืองเข้มด้วยกรดไฮโดรคลอริก เฉพาะสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ แสดงว่ามีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ

1.4 การตรวจสอบสารในกลุ่มคูมาริน พบการเปลี่ยนสีสารละลายเป็นสีเหลืองเข้มในสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ และสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบของทุเรียนเทศ แสดงว่ามีสารในกลุ่มคูมารินเป็นองค์ประกอบ

1.5 การตรวจสอบสารในกลุ่มซาโปนิน พบการเกิดฟองถาวร ลักษณะคล้ายรังผึ้ง ในสารสกัดไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอลจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ แสดงว่าสารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่างที่ศึกษา มีสารในกลุ่มซาโปนินเป็นองค์ประกอบ

1.6 การตรวจสอบสารในกลุ่มคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ พบวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารสกัดกับกรดซัลฟูริกในสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ แสดงว่ามีสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์เป็นองค์ประกอบ

1.7 การตรวจสอบสารในกลุ่มแอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยากับสารที่ทดสอบในสารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่างที่ศึกษา แสดงว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล จากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ ไม่มีสารในกลุ่มแอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์เป็นองค์ประกอบ

โดยพบว่าสารสกัดจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศมีกลุ่มของสารพฤษเคมีมากกว่า สารสกัดจากส่วนใบของทุเรียนเทศ และตัวทำละลายเมทานอลสามารถสกัดสารพฤษเคมี จากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศได้ดีที่สุด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

1. การหาระบบตัวทำละลาย TLC

ในการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดทุเรียนเทศ จากวิธีการสกัด ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ ไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล โดยใช้ระบบตัวทำละลาย คือ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน ในอัตราส่วน 1: 5, 1: 4, 1: 3, 1: 2 และ 1: 1 ตามลำดับ นำผลการ ตรวจสอบระบบตัวทำละลาย TLC หาค่า R_f (Rate of flow) ขององค์ประกอบสารสกัดทุเรียนเทศ ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ค่า R_f ระบบตัวทำละลายของสารสกัดทุเรียนเทศที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

ระบบตัวทำละลาย TLC	ค่า R_f ของสารสกัดทุเรียนเทศ					
	ไดคลอโรมีเทน		เอทิลอะซิเตด		เมทานอล	
	ใบ	เปลือก	ใบ	เปลือก	ใบ	เปลือก
1: 1 EtOAc: Hexane	0.10	0.09	0.10	0.08	0.08	0.10
	0.82	0.81	0.68	0.67	0.69	0.93
	0.86	0.87	0.91	0.90	0.85	
	0.92		0.95	0.94		
1: 2 EtOAc: Hexane	0.70	0.15	0.16	0.17	0.22	-
	0.82	0.69	0.37	0.70	0.37	
		0.91	0.60	0.81	0.61	
			0.80		0.69	
1: 3 EtOAc: Hexane	0.85	0.80	0.82	0.82	0.84	-
	1.00	0.97	0.96	0.97	1.00	
1: 4 EtOAc: Hexane	0.18	0.18	0.18	0.17	0.08	-
	0.41	0.40	0.40	0.40	0.16	
	0.55	0.52	0.53	0.53	0.31	
		0.65			0.37	
1: 5 EtOAc: Hexane		0.87			0.51	
	0.30	0.30	0.30	0.31	0.34	-
	0.46	0.43	0.45	0.46	0.47	

หมายเหตุ EtOAc: Hexane คืออัตราส่วนระหว่างเอทิลอะซิเตดต่อเฮกเซน

- คือ มองไม่เห็นจุดของสารบนแผ่น TLC ที่ส่องผ่านแสง UV

ในการทดลอง ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารสกัดจากใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ คือ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน ในอัตราส่วน 1: 4 แต่ระบบตัวทำละลายดังกล่าวไม่สามารถแยกสารสกัดเมทานอลในเปลือกต้นของทุเรียนเทศได้ จึงต้องทดลองหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดเมทานอลในเปลือกต้นของทุเรียนเทศ

โดยใช้ระบบตัวทำละลาย คือ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน อัตราส่วน 10: 1 และเอทิลอะซิเตด: เฮกเซน: เมทานอล อัตราส่วน 10: 1: 5, 10: 1: 10, 10: 1: 15, 10: 1: 20 และ 10: 1: 30 ตามลำดับ นำผลการตรวจสอบระบบตัวทำละลาย TLC หาค่า R_f ขององค์ประกอบสารสกัดเมทานอลในเปลือกต้นของทุเรียนเทศ ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ค่า R_f ระบบตัวทำละลายของสารสกัดเมทานอลในเปลือกต้นของทุเรียนเทศ

ระบบตัวทำละลาย TLC	อัตราส่วน	ค่า R_f ของสารสกัดเมทานอล ในเปลือกต้นของทุเรียนเทศ
EtOAc: Hexane	10: 1	0.06 0.15 0.52
EtOAc: Hexane: MeOH	10: 1: 5	0.06 0.58
EtOAc: Hexane: MeOH	10: 1: 10	0.06 0.31 0.62
EtOAc: Hexane: MeOH	10: 1: 15	0.06 0.49 0.71
EtOAc: Hexane: MeOH	10: 1: 20	0.06 0.15 0.52 0.69 0.79
EtOAc: Hexane: MeOH	10: 1: 30	0.06 0.2 0.72 0.95

หมายเหตุ EtOAc: Hexane คืออัตราส่วนระหว่างเอทิลอะซิเตดต่อเฮกเซน

EtOAc: Hexane: MeOH คืออัตราส่วนระหว่างเอทิลอะซิเตดต่อเฮกเซนต่อเมทานอล

ในการทดลองระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศคือ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน: เมทานอล อัตราส่วน 10: 1: 20

ผลการทดสอบหาระบบตัวทำละลายของเอทิลอะซิเตดและเฮกเซน พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการแยกองค์ประกอบของสารสกัดโคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตดและเมทานอลจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศคือ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน ในอัตราส่วน 1: 4 ยกเว้นสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ มีระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดคือ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน: เมทานอล ในอัตราส่วน 10: 1: 20 เนื่องจากระบบตัวทำละลายนี้ทำให้เกิดการแยกสารบนแผ่น TLC ตรงกลางแผ่น และแยกจากกันได้ชัดเจนกว่าระบบตัวทำละลายอื่น โดยระบบตัวทำละลายอื่น ๆ สารบางตัวอยู่ในระยะทางที่สูงเกินไป สารบางตัวอาจถูกชะพาขึ้นไปอยู่ที่แถบด้านบนบนแผ่น TLC บางระบบสารอยู่ในระยะทางที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสารบางตัวอาจยังไม่ถูกพาออกมา หรือสารถูกชะพาขึ้นไปเป็นแถบบนแผ่น TLC ระบบตัวทำละลายเหล่านี้บ่งบอกถึงระบบการแยกสารที่ไม่ดี

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) พบว่าระบบตัวทำละลายที่แยกองค์ประกอบของสารได้ดีที่สุดคือ ระบบตัวทำละลายของ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน ในอัตราส่วน 1: 4 ยกเว้นสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ มีระบบตัวทำละลายที่แยกองค์ประกอบของสารได้ดีที่สุดเป็น เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน: เมทานอล อัตราส่วน 10: 1: 20 นำสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในแต่ละสารสกัด ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) ให้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC)

สารสกัด	ส่วนสกัด ทุเรียนเทศ	สารที่เกิดการแยกบน แผ่น TLC	สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH บนแผ่น TLC
ไคคโลโรมีเทน	ใบ	3 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง
	เปลือกต้น	5 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง
เอทิลอะซิเตด	ใบ	3 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง
	เปลือกต้น	3 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง
เมทานอล	ใบ	5 ตำแหน่ง	5 ตำแหน่ง
	เปลือกต้น	5 ตำแหน่ง	4 ตำแหน่ง

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH พบว่าสารสกัดไคคโลโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล จากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ ทั้ง 6 ตัวอย่าง สามารถต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารสกัดสามารถฟอกสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้ ซึ่งจากการทดลอง พบสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด จำนวน 5 ตำแหน่งบนแผ่น TLC ในสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบของทุเรียนเทศ และ 4 ตำแหน่งบนแผ่น TLC ในสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ ส่วนสารสกัดอื่น ๆ พบสารต้านอนุมูลอิสระจำนวน 3 ตำแหน่งบนแผ่น TLC ซึ่งมีค่า R_f ของสารต้านอนุมูลอิสระดังนี้ สารสกัดเมทานอลจากส่วนใบของทุเรียนเทศให้ค่า R_f เท่ากับ 0.08, 0.16, 0.31, 0.37 และ 0.51 สารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศให้ค่า R_f เท่ากับ 0.06, 0.15, 0.52 และ 0.69 สารสกัดไคคโลโรมีเทนจากส่วนใบของทุเรียนเทศ ให้ค่า R_f

เท่ากับ 0.18, 0.41 และ 0.55 สารสกัดไคคลอโรมีเทนจากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.18, 0.40 และ 0.52 สารสกัดเอทิลอะซิเตดจากส่วนใบของทุเรียนเทศ ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.18, 0.41 และ 0.53 ส่วนสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ ให้ค่า R_f เท่ากับ 0.17, 0.40 และ 0.53

จากการทดลอง พบสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด จำนวน 5 ตำแหน่งบนแผ่น TLC ในสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบของทุเรียนเทศ และ 4 ตำแหน่งบนแผ่น TLC ในสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ ส่วนสารสกัดอื่น ๆ พบสารต้านอนุมูลอิสระจำนวน 3 ตำแหน่งบนแผ่น TLC แสดงว่าสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบของทุเรียนเทศประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

นำสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis*, *S. aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Disc diffusion เทียบกับสารมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) โดยส่งทดสอบที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Inhibition zone ของสารสกัดหยาบจากทุเรียนเทศด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ความเข้มข้น 500 mg/mL และสารมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion

แบคทีเรีย ทดสอบ	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร) \pm SD*						ดิสก์ยาปฏิชีวนะ คลอแรมเฟนิคอล (30 μ g /disc)	DMSO
	สารสกัด ไคคลอโรมีเทน		สารสกัด เอทิลอะซิเตด		สารสกัด เมทานอล			
	ใบ	เปลือก	ใบ	เปลือก	ใบ	เปลือก		
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	6.66 \pm 0.20	25.58 \pm 1.40	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	25.50 \pm 0.63	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	26.00 \pm 0.70	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ (-) ไม่มี Inhibition zone

(*) ค่าที่ได้มาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Disc diffusion ในสารสกัดหยาบของทุเรียนเทศ พบว่าไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ศึกษาได้ ยกเว้นสารสกัดเมทานอลในเปลือกต้นของทุเรียนเทศสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้เล็กน้อย โดยมีค่า Inhibition zone เท่ากับ 6.66 ± 0.20 มิลลิเมตร

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมี ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ (*Annona muricata*) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ซึ่งคาดว่าส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศที่นำมาศึกษามีสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้นขั้นตอนของการสกัดสารสำคัญทางชีวภาพจากตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของทุเรียนเทศ จึงต้องใช้ตัวทำละลายที่มีความต่างขั้วจากขั้วน้อยไปจนถึงสารที่มีขั้วมาก ได้แก่ ไดคลอโรโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ แล้วนำสารสกัดแต่ละส่วนสกัดไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวข้น และหนืด

1. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

จากผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่าในแต่ละส่วนของทุเรียนเทศ และตัวทำละลายที่แตกต่างกันให้ผลการทดสอบที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศมีสารพฤกษเคมีที่แตกต่างกันเป็นองค์ประกอบ โดยสารสกัดจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศมีกลุ่มของสารพฤกษเคมีมากกว่าสารสกัดจากส่วนใบของทุเรียนเทศ และสารละลายเมทานอลสามารถสกัดสารพฤกษเคมีจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศได้มากที่สุด เนื่องจากสารที่สกัดได้ส่วนใหญ่อยู่ในชั้นของเมทานอล แสดงว่าสารที่สกัดมาได้มีสมบัติความมีขั้วสูง ทั้งนี้อาจเกิดจากสารละลายเมทานอลสามารถสกัดสารได้หลายชนิดปนกัน เกิดการจับกันอย่างหลวม ๆ ซึ่งในการหาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารได้ทุกชนิด ส่วนใหญ่นิยมใช้แอลกอฮอล์หรือส่วนผสมของแอลกอฮอล์และน้ำ เนื่องจากสามารถละลายได้ทั้งสารมีขั้ว (Polar) และไม่มีขั้ว (Non-polar) แม้ไม่ใช่ตัวทำละลายที่ดีที่สุดของทุกกลุ่ม แต่ก็สามารถสกัดได้มากกลุ่มและจำนวนมากพอที่จะทำการตรวจสอบเบื้องต้นได้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

Sousa et al. (2010) ได้รายงานว่าทุเรียนเทศมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ มีส่วนประกอบของสารในกลุ่มอะซีโตนิน ซึ่งสามารถแยกได้จากหลายส่วนของพืช โดยสารกลุ่มนี้มีสมบัติเด่นคือความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อพิจารณาสมบัติความมีขั้วของกลุ่มอะซีโตนินพบว่าใกล้เคียงกับสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ แต่จากการศึกษาไม่พบสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ทั้งนี้การสกัดสารขึ้นกับเทคนิคในการสกัด และตัวทำละลายที่ใช้สกัดด้วย

ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น มีความสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Víctor et al. (2014) ซึ่งได้ทำการแยกสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Mass spectrometric ในสารสกัดของน้ำและเอทิลอะซิเตดจากส่วนผลของทุเรียนเทศ พบว่าสามารถแยกสารประกอบฟีนอลิกได้จำนวน 16 สาร ซึ่งสารกลุ่มนี้มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH พบว่าสารสกัดไคคลอโรมีเทนเอทิลอะซิเตด และเมทานอล จากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ ทั้ง 6 ตัวอย่าง สามารถต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารสกัดสามารถฟอกสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้ โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดที่เกิดการแยกบนแผ่น TLC ในสารสกัดของเมทานอล สอดคล้องกับการศึกษาทางพฤกษเคมี คือพบสารพฤกษเคมีมากที่สุดในสารสกัดของเมทานอล แสดงว่าสารพฤกษเคมีที่พบสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ เมื่อพิจารณาค่า R_f ของสารที่เกิดการแยกบนแผ่น TLC ในสารสกัดของไคคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตด พบว่ามีค่า R_f ใกล้เคียงกันมากในระบบตัวทำละลายเดียวกัน แสดงว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากการสกัดต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายต่างๆ สารที่ละลายในตัวทำละลายไคคลอโรมีเทน ที่ยังคงเหลืออยู่ในพืชตัวอย่าง จะถูกละลายออกมาได้อีกเมื่อนำไปละลายต่อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตดและเมทานอล เนื่องจากค่า R_f ที่เท่ากันในระบบตัวทำละลายเดียวกันบ่งบอกว่าสารที่สกัดได้เป็นสารเดียวกัน

จากผลการทดลองเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยของ Prasad et al. (2014) มีความสอดคล้องกัน กล่าวคือ ผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารสกัดเมทานอลจากส่วนรากของต้นน้อยโหน่ง ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Annonaceae เช่นเดียวกับทุเรียนเทศ โดยตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ เนื่องจากมีสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ อีกทั้งยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Soheil et al. (2015) โดยพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตดจากส่วนใบของทุเรียนเทศ ทำให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในหนูทดลองเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จึงส่งผลให้การสมานรอยแผลเกิดได้เร็วขึ้น

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Disc diffusion ในสารสกัดไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และ เมทานอลจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ เทียบกับสารมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล และ DMSO ใช้แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ 4 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบโดยทั่วไป ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น การติดเชื้อของแผลผ่าตัด แผลอักเสบ การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ เชื้อหุ้มสมองอักเสบในทารก ท้องร่วง เป็นต้น พบว่าไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ที่ศึกษาได้ โดยไม่เกิด inhibition zone ยกเว้นสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* ได้ โดยให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 6.66 ± 0.20 มิลลิเมตร ซึ่งแสดงค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เรียกได้น้อย เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน คลอแรมเฟนิคอล ที่ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 25.58 ± 1.40 มิลลิเมตร ดังตัวอย่างภาพที่ 5-1



ภาพที่ 5-1 ภาพแสดงตัวอย่างผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยสารสกัดจาก ส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศในตัวทำละลายต่าง ๆ

เนื่องจากสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* แสดงว่าสารพฤษเคมีที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* ได้คือ แทนนิน และคาร์ดิเอ็กไกลโคไซด์ เนื่องจากพบสารพฤษเคมีทั้งสองกลุ่มในสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศเท่านั้น

จากผลการทดลองสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Mario et al. (2015) ซึ่งได้ศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียในสารสกัดส่วนผลของทุเรียนเทศด้วยวิธี Disc diffusion โดยศึกษาในแบคทีเรียแกรมลบ 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Salmonella sp.* รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* พบว่าไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ คือไม่เกิด Inhibition zone ยกเว้นแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *L. monocytogenes* ให้ค่า inhibition zone เท่ากับ 10.0 ± 0.5 แต่ไม่สอดคล้องกับผลงานวิจัยของฉัฐธยาน์ ชูสิงห์ ฟาน เบน (2554) ซึ่งได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ของสารสกัดทุเรียนเทศส่วนต่าง ๆ โดยใช้วิธี Disc diffusion พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้สูงสุดและต่ำสุดคือ สารสกัดไคคลอโรมีเทนจากส่วนใบและสารสกัด 95% เอทานอลจากผลอ่อน ทุเรียนเทศตามลำดับ ทั้งนี้อาจเกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดที่มีปริมาณน้อยเกินไปหรืออาจเกิด

จากตัวทำละลายที่ใช้ทำให้คุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปลี่ยนแปลงไป แสดงให้เห็นว่าสมุนไพรชนิดเดียวกัน อาจมีประสิทธิภาพของสารสกัดที่ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ไม่เท่ากัน เนื่องจากสมุนไพรชนิดเดียวกันอาจมีสารสำคัญไม่เหมือนกัน และมีปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด พันธุ์ สภาพแวดล้อมในการปลูก อายุ และช่วงการเก็บเกี่ยว

จากการวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดเมทานอลทั้งส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ สามารถสกัดสารพฤษเคมีได้หลายกลุ่ม และเป็นสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก อีกทั้งสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศยังสามารถออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ จึงสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น การถนอมอาหาร ที่มีองค์ประกอบของไขมัน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ใช้เป็นส่วนผสมในการทำเครื่องสำอาง และสามารถพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคหัวใจ โรคกระเพาะ และโรคความจำเสื่อม เป็นต้น ทั้งนี้ในการนำไปใช้ประโยชน์ต้องคำนึงถึงความเป็นพิษ ขนาดที่ใช้ และการใช้ในระยะเวลา เนื่องจากมีรายงานว่าทุเรียนเทศประกอบด้วยสารที่เป็นพิษต่อร่างกายเช่นกัน

สรุปผลการทดลอง

จากการนำส่วนใบ และเปลือกต้นของทุเรียนเทศ มาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดทั้งหมด 6 ตัวอย่าง นำสารสกัดที่ได้ศึกษาสารพฤษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ พบสารในกลุ่ม อัลคาลอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แต่ไม่พบสารในกลุ่มแอนทราควิโนน เทอร์ปีนอยด์ และสเตอรอยด์ โดยพบสารพฤษเคมีได้มากที่สุดในสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ และพบสารพฤษเคมีน้อยที่สุดในสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากส่วนใบของทุเรียนเทศ

2. ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการแยกองค์ประกอบของสารสกัด ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอล จากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ คือ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน ในอัตราส่วน 1: 4 ยกเว้นสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ มีระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดคือ เอทิลอะซิเตด: เฮกเซน: เมทานอล ในอัตราส่วน 10: 1: 20

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารละลาย DPPH ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) พบว่าสารสกัดไคคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตด และเมทานอลจากส่วนใบและเปลือกต้นของทุเรียนเทศ ทั้ง 6 ตัวอย่าง สามารถต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ได้ โดยพบสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด จำนวน 5 ตำแหน่งบนแผ่น TLC ในสารสกัดไคคลอโรมีเทนจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ และ 4 ตำแหน่งบนแผ่น TLC ในสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis*, *S. aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี Disc diffusion เทียบกับสารมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล และ DMSO ของสารสกัดทุเรียนเทศ จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ โดยไม่เกิด inhibition zone ยกเว้นสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* ได้ ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 6.66 ± 0.20 มิลลิเมตร ซึ่งแสดงค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้น้อย เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานคลอแรมเฟนิคอล ที่ให้ค่า Inhibition zone เท่ากับ 25.58 ± 1.40 มิลลิเมตร

5. สารพฤษเคมีที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* ได้คือ แทนนิน และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ เนื่องจากพบสารพฤษเคมีทั้งสองกลุ่มในสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกต้นของทุเรียนเทศเท่านั้น

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถนำผลการศึกษาที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานในอุตสาหกรรมการผลิตยาและเครื่องสำอางได้
2. สามารถนำวิธีการศึกษานี้ไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ต่อไปได้
3. สารสกัดที่ได้สามารถนำไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี และสารตัวอย่างที่ไม่ทราบชื่อ
4. ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดในระดับต่ำสุด (MIC) ต่อการยับยั้งแบคทีเรียด้วยได้
5. งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงคุณภาพ สามารถศึกษาต่อในเชิงปริมาณของสารพฤษเคมี และปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดหยาบได้

บรรณานุกรม

- ณัฐชยา ชูสิงห์ ฟาน เบม. (2554). *ผลทางชีวภาพของสารสกัดหยาบทุเรียนเทศต่อเซลล์มะเร็งแบคทีเรีย และลูกน้ำยุงลาย*. สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2544). *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2536). *จุลชีววิทยา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. (2528). *เทคนิคทางเคมี*. มหาสารคาม: ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม.
- ปริญนันท์ บัวสด. (2549). *การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พงษ์เทพ เกิดเนตร. (2551). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์ทุเรียนเทศเพื่อการพัฒนาชุมชน*. *วารสารวิจัยรามคำแหง*, 11(1), 47-56.
- แม่น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสดงวณิช, ภควี สุทธิไวยกิจ, มานพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลี้ยวเรืองรัตน์, อุมภาพร สุขม่วง และวิญเพ็ญ ซ้อนแก้ว. (2553). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์.
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). *การตรวจสอบและการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิวัฒน์ พันธวุฒิชยานนท์ และนันทสิทธิ์ บุญยะรัตเวช. (2540). *ผลไม้พื้นบ้านภาคใต้*. *วารสารสารคดี*, 11(14), 54-72.
- สุจิตรา ทองประดิษฐ์โชติ. (2553). *มาตรฐานการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและพิษวิทยาของสารสกัดจากใบมะรุม*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- สุรางค์รัตน์ แดงจิระ. (2558). *องค์ประกอบทางเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของบอนหอม*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ศิริธร ศิริอมรพรรณ. (2557). *สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- อุไร จิรมงคลการ. (2547). *ผักพื้นบ้าน 2*. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.

- โสภา วัชรกุลปต์. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. กรุงเทพฯ: พีเอสพีริ้นท์.
- Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019-1024.
- Ginda, H., Niky, P. U., & Erly, S. (2014). Study of the antibacterial activities of soursop (*Annona muricata*) leaves. *International Journal of PharmTech Research*, 6(2), 575-581.
- Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhan, B., & Baghbani F. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A review. *International Journal of Forest Soil and Erosion*, 1(1), 47-53.
- Jaramillo, M. C., Arango, G. J., Gonzalez, M. C., Robledo, S. M., & Velez, I. D. (2000). Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, 71(2), 183-189.
- Mario, P., Patricia, G., Fatima, B., Ana, P. C., Valentina, F. D., Ana, M. G., Helena, B., Elisane, L., & Cristina, D. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172, 462-468.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, D. (2008). Free radicals antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.
- Prasad, G. J., Amruta, S. W., Sanjay, S. P., & Prakash, G. C. (2014). Antioxidant, antimicrobial activity and in silico PASS prediction of *Annona reticulata* Linn. root extract. *Beni-suef university journal of basic and applied sciences*, 3, 140-148.
- Sousa, O. V., Vieira, G. D., Pinho, J. J. R. G., Yamamoto, C. H., & Alves, M. S. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 2067-2078.
- Soheil, Z. M., Elham, R., Maryam, H., Hamed, K., Mahmood, A. A., & Habsah, A. K. (2015). *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. *International Journal of Surgery*, 18, 110-117.

Soheil, Z. M., Habsah, A. K. H. A., Mohammadjavad, P., Elham, R., & Hamed, K. (2014).

Annona muricata leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- κ B. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 299.

Víctor, M. J., Maike, G., Ralf, M. S., Reinhold, C., & Patricia, E. (2014). Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International*, 65, 42-46.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ภาพการเตรียมตัวอย่างพืช



ภาพที่ ก-1 การเก็บตัวอย่างใบและเปลือกของต้นทุเรียนเทศ



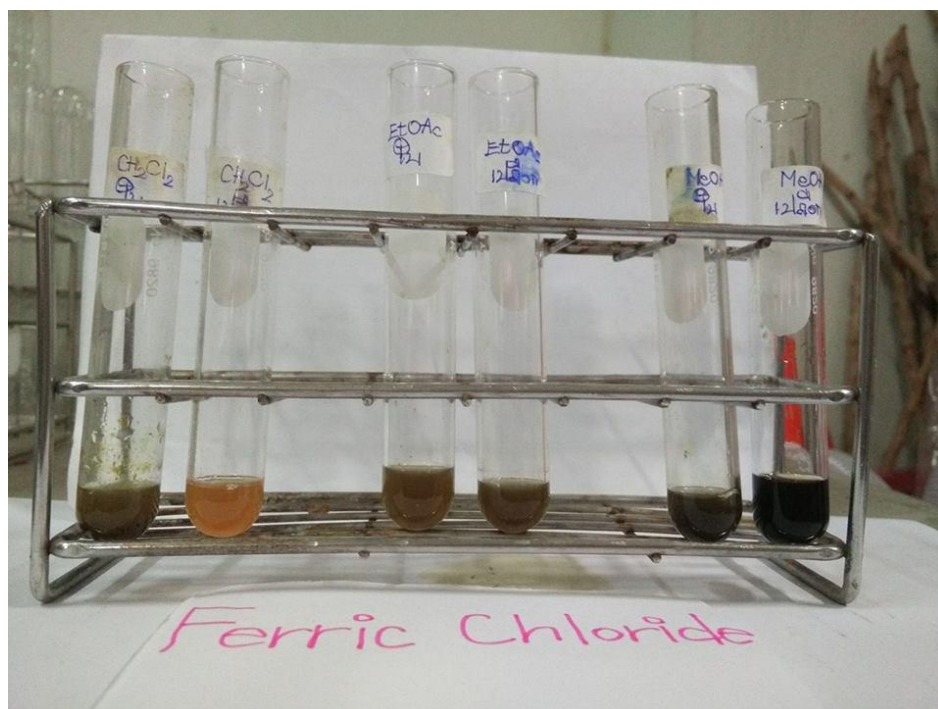
ภาพที่ ก-2 ใบของทุเรียนเทศหลังการตากแห้ง

ภาคผนวก ข

ภาพผลการทดสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น



ภาพที่ ข-1 ผลการตรวจสอบอัลคาลอยด์



ภาพที่ ข-2 ผลการตรวจสอบฟีนอลิก และแทนนิน



ภาพที่ ข-3 ผลการตรวจสอบฟลาโวนอยด์



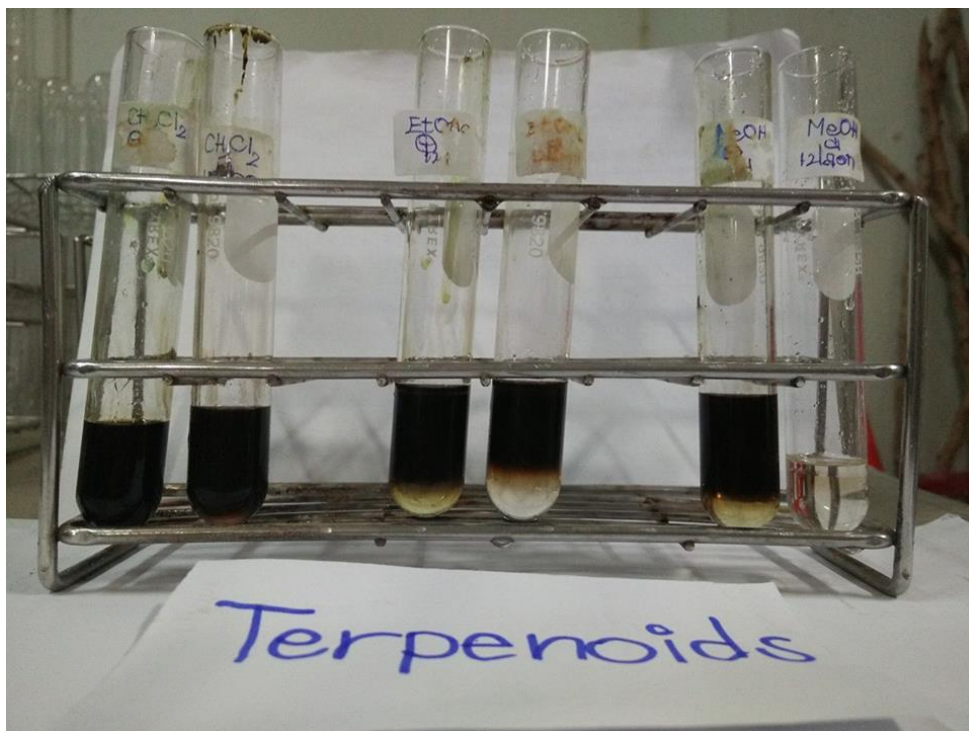
ภาพที่ ข-4 ผลการตรวจสอบแอนทราควิโนน



ภาพที่ ข-5 ผลการตรวจสอบคูมาริน



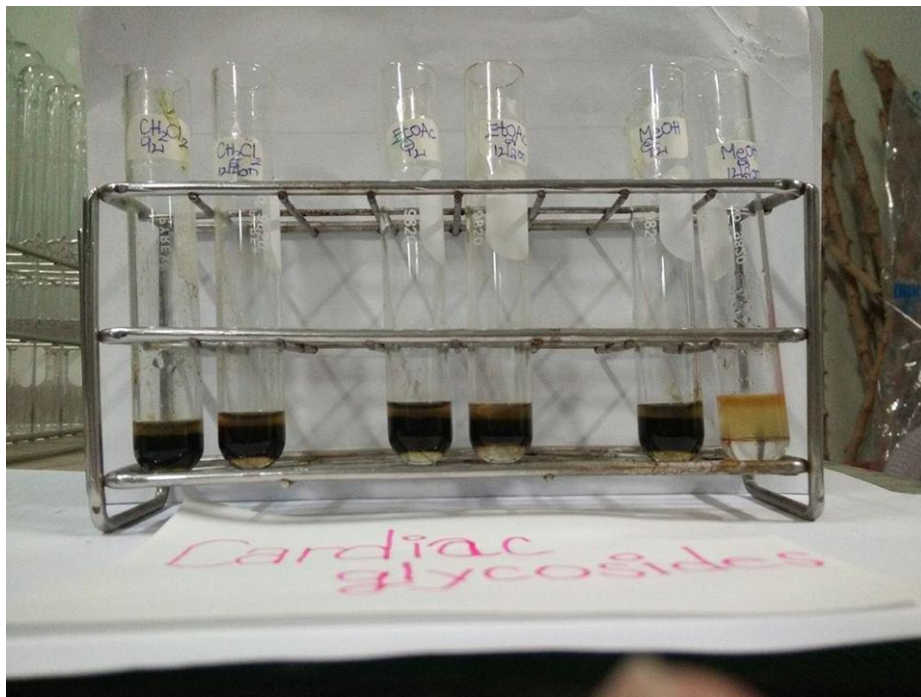
ภาพที่ ข-6 ผลการตรวจสอบซาโปนิน



ภาพที่ ข-7 ผลการตรวจสอบเทอร์พีนอยด์



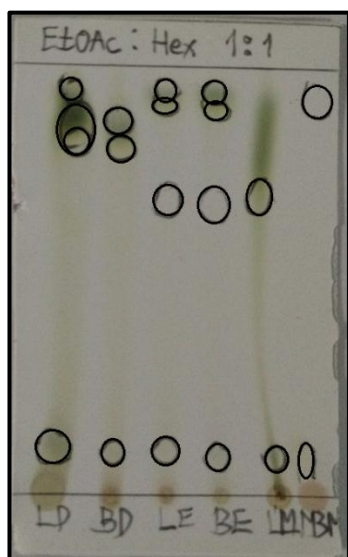
ภาพที่ ข-8 ผลการตรวจสอบสเตอรอยด์



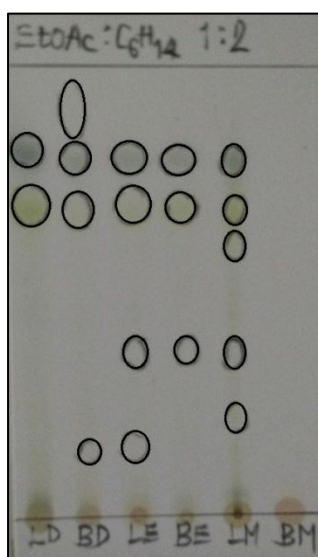
ภาพที่ ข-9 ผลการตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ภาคผนวก ค

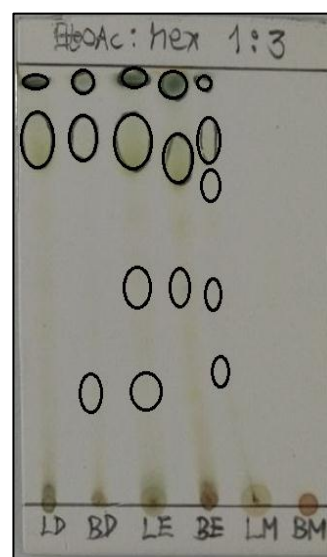
ภาพการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิค TLC



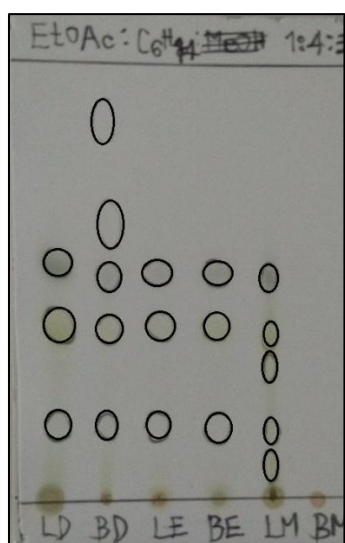
EtOAc: Hexane (1: 1)



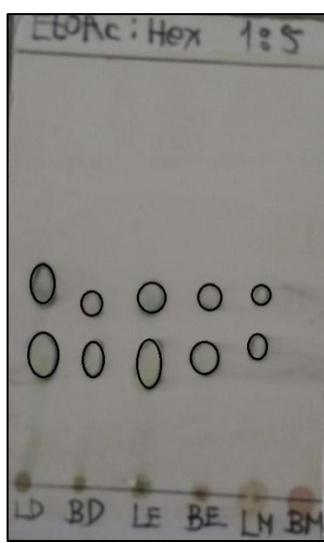
EtOAc: Hexane (1: 2)



EtOAc: Hexane (1: 3)



EtOAc: Hexane (1: 4)



EtOAc: Hexane (1: 5)

ภาพที่ ค-1 การหาระบบตัวทำละลาย TLC ของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตกับเฮกเซน

หมายเหตุ LD คือ สารสกัด CH₂Cl₂ จากส่วนใบ

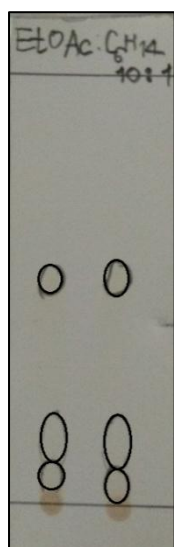
BD คือ สารสกัด CH₂Cl₂ จากส่วนเปลือก

LE คือ สารสกัด EtOAc จากส่วนใบ

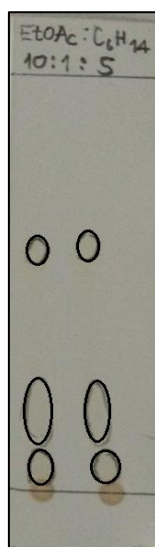
BE คือ สารสกัด EtOAc จากส่วนเปลือก

LM คือ สารสกัด MeOH จากส่วนใบ

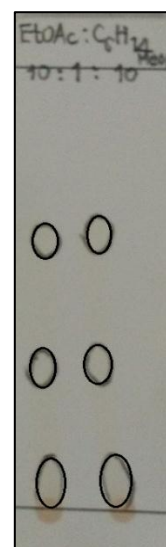
BM คือ สารสกัด MeOH จากส่วนเปลือก



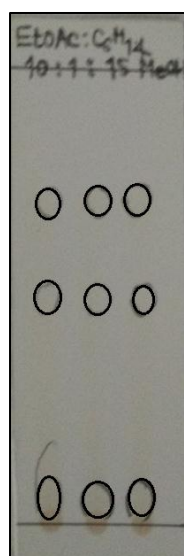
EtOAc: Hexane
(10: 1)



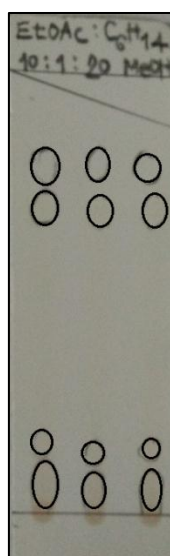
EtOAc: Hexane: MeOH
(10: 1: 5)



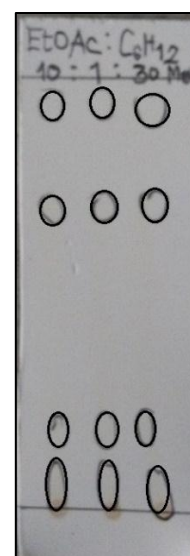
EtOAc: Hexane: MeOH
(10: 1: 10)



EtOAc: Hexane: MeOH
(10: 1: 15)

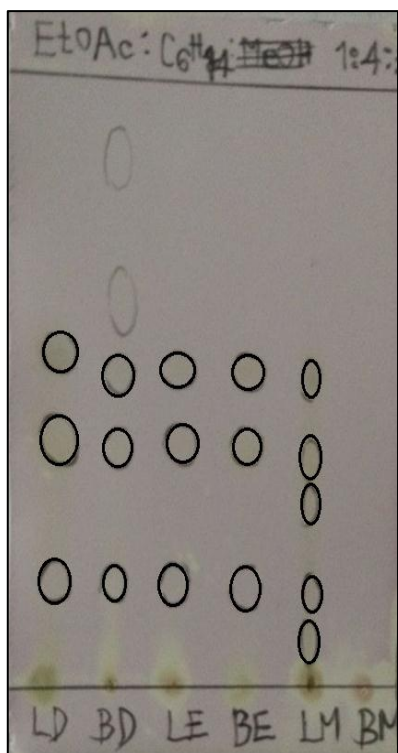


EtOAc: Hexane: MeOH
(10: 1: 20)

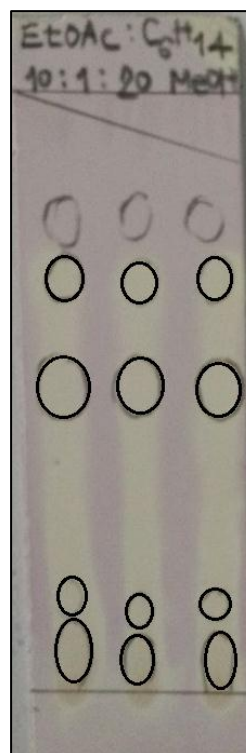


EtOAc: Hexane: MeOH
(10: 1: 30)

ภาพที่ ค-2 การหาระบบตัวทำละลาย TLC ของสารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ



สารสกัดทุเรียนเทศในตัวทำละลายต่าง ๆ



สารสกัดเมทานอลจากส่วนเปลือก

ภาพที่ ค-3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดของทุเรียนเทศ

หมายเหตุ LD คือ สารสกัด CH_2Cl_2 จากส่วนใบ

LE คือ สารสกัด EtOAc จากส่วนใบ

LM คือ สารสกัด MeOH จากส่วนใบ

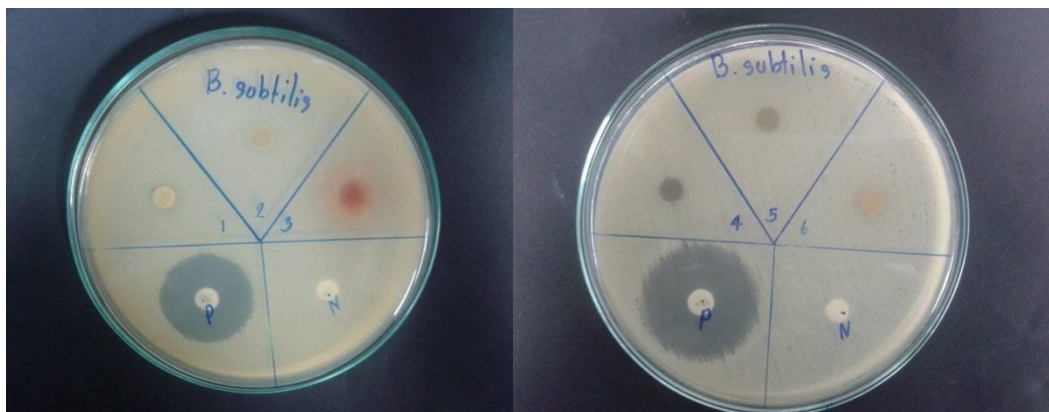
BD คือ สารสกัด CH_2Cl_2 จากส่วนเปลือก

BE คือ สารสกัด EtOAc จากส่วนเปลือก

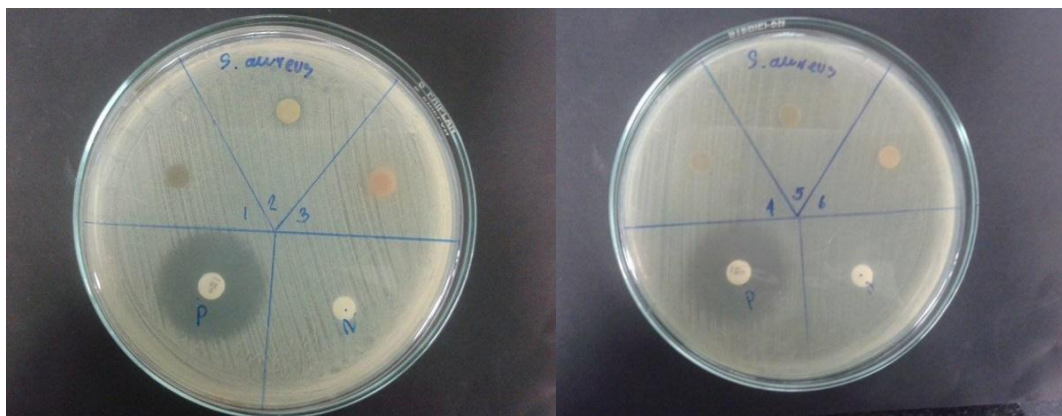
BM คือ สารสกัด MeOH จากส่วนเปลือก

ภาคผนวก ง

ภาพการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค Dics diffusion

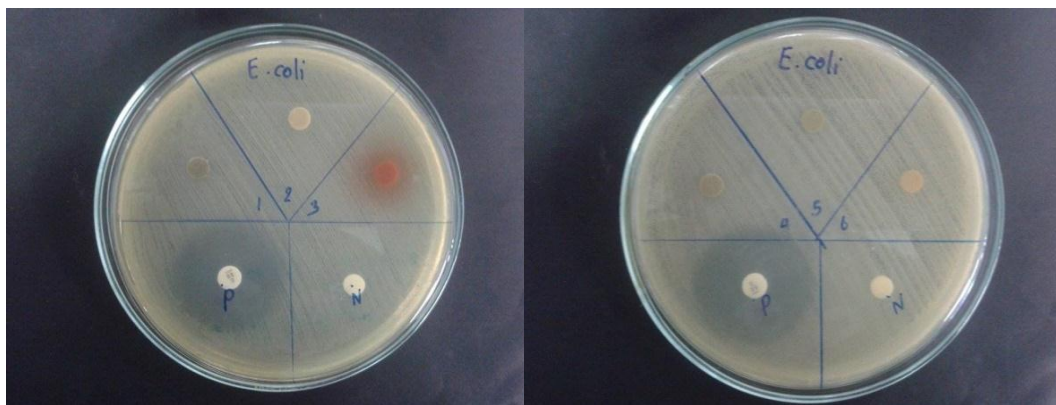


ภาพที่ ง-1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *B. subtilis*

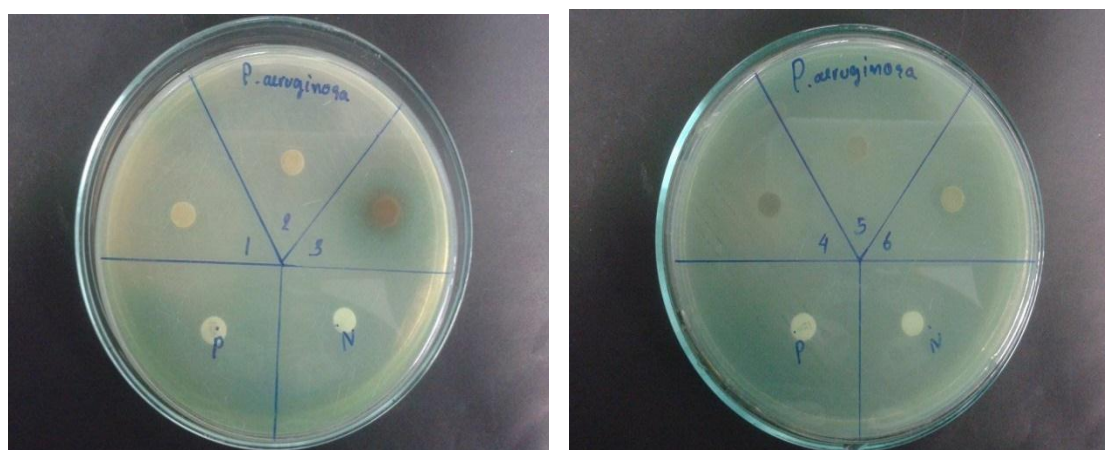


ภาพที่ ง-2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *S. aureus*

- หมายเหตุ**
- 1: สารสกัด CH_2Cl_2 จากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ
 - 2: สารสกัด EtOAc จากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ
 - 3: สารสกัด MeOH จากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ
 - 4: สารสกัด CH_2Cl_2 จากส่วนใบของทุเรียนเทศ
 - 5: สารสกัด EtOAc จากส่วนใบของทุเรียนเทศ
 - 6: สารสกัด MeOH จากส่วนใบของทุเรียนเทศ



ภาพที่ ง-3 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *E. coli*



ภาพที่ ง-4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *P. aeruginosa*

- หมายเหตุ
- 1: สารสกัด CH_2Cl_2 จากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ
 - 2: สารสกัด EtOAc จากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ
 - 3: สารสกัด MeOH จากส่วนเปลือกของทุเรียนเทศ
 - 4: สารสกัด CH_2Cl_2 จากส่วนใบของทุเรียนเทศ
 - 5: สารสกัด EtOAc จากส่วนใบของทุเรียนเทศ
 - 6: สารสกัด MeOH จากส่วนใบของทุเรียนเทศ