รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชุดโครงการวิจัย
การวิจัยและพัฒนาหมากจองเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้ชุมชน

โครงการวิจัยย่อยที่ 2
การศึกษาคุณค่าทางสมุนไพรและองค์ประกอบทางเคมีของหมากจอง
(Studies of medicinal properties and chemical compositions of *Scaphium affine* (Mast.) Pierre)

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ — ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
2. ผศ.ดร.ชริดา ปุกหุติ — ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผู้อำนวยการชุดโครงการ

ผศ.ดร.อรัญญา พิมพ์มงคล
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ
ประจำปีงบประมาณ 2548 – 2549

สารบัญ

เรื่อง	**หน้า**
บทคัดย่อ	82
บทที่ 1 บทนำ	83
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	98
บทที่ 3 ผลการทดลอง สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	108
เอกสารอ้างอิง	128

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเนื้อเจลหมากจอง (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) โดยเทคนิคต่างๆ คือ การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสี การวิเคราะห์แถบสีบน TLC และการทดสอบทางสเปคโทรสโกปี พบว่า เนื้อเจลหมากจองมีองค์ประกอบเคมีเป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยา คือ สเตอรอยด์ (steroid) โดยจากการวิเคราะห์แถบสีบน TLC พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และสารสกัดหยาบเมทานอล ให้แถบเรืองแสงที่ตรงกับสารมาตรฐานสเตอรอยด์ และจากการทดสอบด้วยเทคนิค 1H-NMR สเปคโตรสโกปี พบว่าสเปกตรัม 1H-NMR ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตใกล้เคียงกับสารมาตรฐานสเตอรอยด์ วุ้นจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่พองตัวในน้ำกลั่นของหมากจองสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ที่ใช้ในการทดสอบได้บางชนิด คือ 1) *Staphylococcus aureus* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขและสายพันธุ์จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และ 2) *Bacillus cereus* สายพันธุ์จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) คือ 1) *E. coli* 2) *Pseudomonas aeruginosa* 3) *Salmonella enteritidis* รวมทั้งไม่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ก่อโรคที่ทดสอบ คือ *Candida tropicalis* และ *C. albicans*

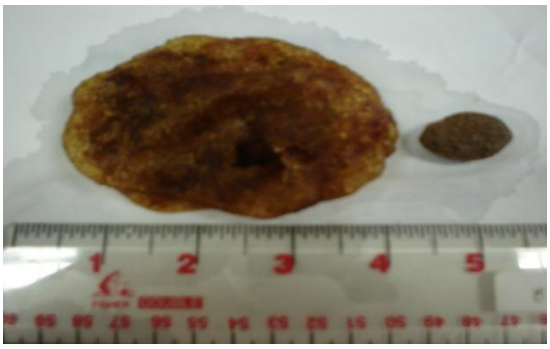
บทที่ 1
บทนำ

รูปที่ 1.1 ต้นและผลหมากจอง (สำรอง) แห้ง

1.1 ความสำคัญและที่มา

ปัจจุบันความนิยมผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งภายในประเทศและต่างประเทศมีเพิ่มขึ้นทุกปีซึ่งบริษัทผู้ผลิตได้ผลิตขึ้นทั้งรูปของยา อาหารเสริม เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มต่างๆ ดังนั้นการวิจัยและการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรและตำหรับยาไทยจึงมีความจำเป็นเพื่อใช้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการยืนยันผลจากภูมิปัญญาดั้งเดิมที่มีการบอกกล่าวสืบต่อมา [1]

หมากจอง (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) หรือสำรอง พุงทะลาย หรือท้ายเภา (รูปที่ 1.1) เป็นพืชวงศ์ Sterculiaceae กระจายตัวอยู่ทั่วไปในหลายประเทศ อาทิ พม่า จีน มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ลาว กัมพูชา และไทย ลำต้นของหมากจองสูงมากถึง 45 เมตร แตกกิ่งที่เรือนยอด เมล็ดหมากจองเมื่อแช่น้ำจะพองตัวคล้ายวุ้น สามารถนำไปประกอบอาหาร ทำเครื่องดื่ม และใช้เป็นสมุนไพร จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าเจลหมากจองพองตัวสูงถึง 10 เท่าตัวเมื่อแช่น้ำ ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 ผลหมากจองแห้ง (ขวา) และผลหมากจองที่พองตัวเมื่อแช่น้ำ (ซ้าย)

หมากจองจะออกผลดกทุกๆ 3-4 ปี และราคาขายปลีกเมล็ดแห้งหมากจองสูงถึง 150-200 บาทต่อกิโลกรัม ทำให้ประชาชนบริเวณที่มีต้นหมากจอง เช่น ที่จังหวัดอุบลราชธานี จันทบุรี และตราด รวมถึงประเทศใกล้เคียง เช่น ลาวและกัมพูชา เก็บผลหมากจองไปขายทั้งชนิดขายปลีก และขายส่ง พบว่าตลาดรับซื้อหมากจองรายใหญ่คือ จีนและญี่ปุ่น โดยมีการรับซื้อปริมาณมากเป็นพันตันต่อปี คิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 100 ล้านบาท [2] เชื่อว่าน่าจะนำไปใช้ในด้านสมุนไพร ดังนั้นการศึกษาลู่ทางการใช้ประโยชน์จากหมากจองในด้านสมุนไพรจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับนักวิจัย

เนื่องด้วยลักษณะต้นที่สูง ผลเกิดที่เรือนยอดและราคาสูง ทำให้ประชากรทั้งในประเทศไทย ลาวและกัมพูชา เก็บผลหมากจองโดยการโค่นต้น ทำให้ได้ทั้งผลอ่อนและผลแก่ ซึ่งเกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา ทำให้ราคาตกต่ำ และเก็บได้ไม่นาน และหากมีการโค่นต้นหมากจองต่อไปเรื่อยๆ ประกอบกับการเก็บเมล็ดหมากจองออกจากป่าไปขายปริมาณมากในแต่ละปี ทำให้ต้นกล้าใหม่ที่เกิดจากเมล็ดมีจำนวนลดลงอาจส่งผลให้ต้นหมากจองหมดไปจากป่าในอนาคต

ความสำคัญของคุณลักษณะของเจลหมากจองที่มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านอาหาร ปัจจุบันใช้เป็นอาหารเส้นใยเพื่อสุขภาพสำหรับลดความอ้วน ซึ่งเจลหมากจองเป็นสารจากธรรมชาติและสามารถย่อยสลายได้ง่ายกว่าสารสังเคราะห์ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบและสมบัติทางกายภาพของเจลหมากจองแห้ง [3] โดยเน้นการศึกษาชนิดของโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ อย่างไรก็ตามจากการค้นคว้าโดยละเอียดพบว่า มีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของหมากจองน้อยมากทั้งๆ ที่มีรายงานมากมายในด้านสรรพคุณทางสมุนไพรของสำรองหรือหมากจอง คือ ผลหรือเนื้อหุ้มเมล็ดใช้แก้ร้อนใน แก้กระหายน้ำ เมล็ดใช้แก้ร้อนใน กระหายน้ำ แก้โรคตาแดง แก้อักเสบ แก้โรคปอดบวมซึ่งเป็นภูมิปัญญาที่บอกกล่าวกันมา [4] แต่ประเทศไทยยังขาดข้อมูลการวิจัยที่สำคัญเกี่ยวกับคุณค่าทางสมุนไพรของหมากจองทั้งทางด้านเภสัชกรรมและองค์ประกอบทางเคมี องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของหมากจองที่รายงาน คือ ฮีสตามีน (histamine) ซึ่ง Hayman [5] และคณะได้ทำการแยกจากส่วนของเมล็ดในส่วนของการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และทราบแต่เพียงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง [6] และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับ platelet activation factor receptor. [7] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการวิเคราะห์หากลุ่มสารที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยา คือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แอลคาลอยด์ (alkaloids) และ สเตอรอยด์ (steroids) โดยเริ่มจากการทำ TLC (Thin Layer Chromatography) fingerprints และตรวจสอบด้วยน้ำยาที่เกิดสี รวมไปถึงการยืนยันผลด้วย NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

1.2 การสกัดแยกสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ [8,9]

การสกัดสารเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยเฉพาะการสกัดสารอกฤทธิ์ที่เป็นยาจากพืชสมุนไพร ในการสกัดนั้นนิยมทำให้บริสุทธิ์ ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักๆ

1.2.1 การเตรียมสมุนไพรก่อนการสกัด เริ่มตั้งแต่การเก็บพืช นำมาทำความสะอาดอย่าให้มีสิ่งปนเปื้อน การสกัดอาจใช้พืชสดได้ แต่นิยมนำพืชมาทำให้แห้งเสียก่อน โดยการตากในที่ร่มหรืออบในตู้อบไฟฟ้า หลังจากนั้นจะต้องลดขนาดของพืชให้เป็นชิ้นเล็กๆหรือเป็นผงเพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพ

1.2.2 การเตรียมสารสกัดรวม สารสกัดรวม (crude extract) หมายถึงสารสกัดที่ยังไม่ผ่านกระบวนการที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้น สารสกัดที่ได้จะประกอบด้วยสารเคมีต่างๆมากมาย การเตรียมสารสกัดรวมทำได้โดยการสกัดผงพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งการสกัดสารจากผงพืชทำได้หลายวิธี เช่น

1.2.2.1 การสกัด (extraction) ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมีหลายชนิด การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารที่จะสกัด ที่นิยมใช้ได้แก่ แอลกอฮอล์ ที่มีคาร์บอน 1-2 อะตอม คือ เมทานอล (methanol) และเอทานอล (ethanol) ซึ่งตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีพลังการสกัด (extractive power) สูง โดยเมทานอลจัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ที่มีพลังการสกัดสูงสุด สามารถสกัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากพืชได้ทุกชนิด ส่วนเอทานอลแม้จะมีความปลอดภัยมากกว่าแต่พลังการสกัดไม่มากเท่า การใช้เมทานอล และเอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีพลังการสกัดจะสกัดสารที่ต้องการได้มากแต่ในขณะเดียวกันก็จะสกัดสารอื่นๆที่ไม่ต้องการออกมาได้มากด้วยเช่นเดียวกัน ในกรณีที่ทราบระดับความมีขั้ว (polarity) ของสารที่ต้องการก็สามารถใช้หลักการ like dissolve like เลือกตัวทำละลายที่มีระดับความมีขั้วใกล้เคียงมาสกัดหรือถ้าทราบความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ก็เลือกใช้ตัวทำละลายที่ให้ค่าการละลายสูงสุด จะสามารถลดจำนวนและปริมาณของสารอื่นที่ไม่ต้องการได้

ตารางที่ 1.1 ระดับความมีขั้ว (polarity) ของตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สามารถเรียงลำดับได้ดังนี้ [9]

ตัวทำละลายอินทรีย์	ระดับความมีขั้ว (ε^{o})		ตัวทำละลายอินทรีย์	ระดับความมีขั้ว(ε^{o})
pentane	0.00		chloroform	0.40
hexane	0.00		dichloromethane	0.42
cyclohexane	0.04		acetone	0.56
toluene	0.28		ethanol	0.88
benzene	0.32		methanol	0.88
diethyl ether	0.38		water	1.00

วิธีที่นิยมใช้ในการสกัดสารจากพืช ได้แก่

1. การหมัก (maceration) คือการหมักผงพืชกับตัวทำละลายในภาชนะปิด ทิ้งไว้ระยะหนึ่งจึงรินสารสกัดออกมาบีบสารสกัดออกจากกาก แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของน้ำยาสกัด ดังนั้นถ้าต้องการให้การสกัดสมบูรณ์ต้องทำซ้ำหลายๆ ครั้ง

2. เพอร์โคเลชั่น (percolation) คือการนำบรรจุผงพืชมาหมักกับตัวทำละลายก่อน 1 ชั่วโมงเพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆบรรจุผงพืชทีละชั้นลงใน percolator ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ปลายเปิดทั้ง 2 ด้าน โดยด้านบนจะกว้างกว่าด้านล่าง เพื่อความสะดวกในการบรรจุพืช ส่วนปลายด้านล่างปิดเปิดได้ เพื่อที่สามารถควบคุมอัตราการไหลของสารสกัดได้ เติมตัวทำละลายหรือน้ำยาสกัดให้สูงเหนือพืชประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงจึงปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงพืชในอัตราเร็วที่พอเหมาะ พร้อมกับเติมน้ำยาสกัดใหม่ลงไปเรื่อยๆ อย่าให้แห้งจนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) คือการสกัดสารสำคัญจากพืชที่คล้ายกับการทำเพอร์โคเลชั่น แต่ต้องใช้ความร้อนเข้าช่วยและใช้ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor) ซึ่งเป็นระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ เมื่อได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ น้ำยาสกัดในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ น้ำยาสกัดจะผ่านผงพืชซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในพืชถูกสกัดออกมา วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อนและใช้น้ำยาการสกัดน้อย ไม่สิ้นเปลือง แต่มีข้อเสีย คือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความ

ร้อน และน้ำยาสกัดไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกของตัวทำละลายแต่ละชนิดทำให้ผลการสกัดไม่ดีเท่าที่ควร

4. การย่อย (digestion) เหมือนวิธีการหมักแต่มีการให้ความร้อนช่วยเร่งการสกัดและมีการต่อ condenser ไว้ด้านบนของภาชนะที่ใช้ในการสกัดเพื่อดักไอของตัวทำละลายที่ระเหยออกมาให้กลั่นตัวกับลงไป วิธีนี้เหมาะกับการสกัดพืชจำนวนน้อยๆ

1.2.2.2 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration) เมื่อได้สารสกัดแล้วจะต้องกำจัดตัวทำละลาย ออกเพื่อให้สะดวกต่อการแยกต่อไป วิธีการทำได้โดยการนำไประเหยบน water bath หรือระเหยภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evapolator) การแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์เป็นการแยกอย่างคร่าวๆ นิยมใช้กรวยแยก (separatory funnel) โดยการเติมตัวทำละลายลงไปแล้วเขย่าให้สารสกัดและตัวทำละลายเข้ากัน จากนั้นทิ้งสารทั้งสองให้แยกจากกันจึงไขสารที่ต้องการแยกออกทำซ้ำหลายๆครั้งการสกัดจึงจะสมบูรณ์ [8, 9] ในกรณีที่สารสกัดด้วยน้ำ การระเหยน้ำต้องใช้อุณหภูมิที่สูง อาจทำให้สารสกัดเสื่อมคุณภาพจึงนิยมใช่เครื่อง Freeze Dryer หรือ Liophilyzer ซึ่งเป็นการทำน้ำให้แข็งและเกิดการแห้งโดยการระเหิด

1.2.3 การแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การกลั่น (distillstion) การทำ solvent partition การทำโครมาโทรกราฟี (chromatography) เช่น TLC หรือ column chromato- graphy

1.2.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สกัดได้ ในการตรวจสอบว่าสารที่สกัดได้คือสารอะไรต้องใช้ข้อมูลหลายๆอย่างมาประกอบกันในการวิเตราะห์ เช่น คุณสมบัติทางฟิสิกส์ (จุดเดือด จุดหลอมเหลว) คุณสมบัติทางเคมี (ผลบวกกับการทดสอบทางเคมี) ข้อมูลทางโครมาโทรกราฟี (Rf) ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) เป็นต้น

1.3 สารสำคัญทางเภสัชวิทยา การสกัดและการพิสูจน์กลุ่มสารหลักที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยา [8]

กลุ่มสารหลักที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยามีหลายกลุ่ม เช่น แอลคาลอยด์ สเตอรอยด์ ฟลาโวนอยด์ และเทอรปีน (terpene) โดยแต่ละกลุ่มจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกันออกไป

1.3.1 แอลคาลอยด์ (Alkaloids)

เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (organic nitrogen compound) มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อนและแตกต่างกันมากมาย ปัจจุบันพบแอลคาลอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด คุณสมบัติของแอลคาลอยด์ คือ ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ มีฤทธิ์เป็นด่าง แอลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น พืชสมุนไพรที่มีแอลคาลอยด์เป็นส่วนมาก คือ หมาก ลำโพง ซิงโคนา ดองดึง ระย่อม ยาสูบ กลอย ฝิ่น แสลงใจ เป็นต้น นอกจากประโยชน์ในการรักษาแล้วแอลคาลอยด์จำนวนไม่น้อยที่เป็นพิษต่อร่างกาย ใช้เป็นยาพิษ ยาฆ่าแมลงและใช้ในการล่าสัตว์ ตัวอย่างเช่น นิโคติน (nicotine) เป็นสารพิษ ที่ได้จากใบยาสูบ จะออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติทำให้กล้ามเนื้อเกิดอัมพาตได้มักใช้เป็นยาฆ่าแมลง ricinine ได้จากเมล็ด และใบของละหุ่งเป็นสารพิษทำให้เกิดอาการอาเจียน คลื่นไส้ ความดันโลหิตต่ำ มีพิษต่อตับและไต ทำให้หยุดหายใจและตายdioscorine ที่ได้จากหัวกลอย เป็นสารที่มีพิษ เมื่อรับประทานจะทำให้เกิดอาการปวดแสบปวดร้อนในลำคอ อาเจียนรุนแรงทำให้ร่างกายขาดน้ำ

หลักการในการสกัดแอลคาลอยด์ อาศัยความรู้ที่ว่าแอลคาลอยด์เบส จำนวนมากไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ หรือแอลกอฮอล์ และเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดได้เกลือแอลคาลอยด์ ที่ละลายในน้ำ หรือแอลกอฮอล์ ละลายได้น้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถเปลี่ยนเกลือแอลคาลอยด์กลับไปเป็นแอลคาลอยด์เบสโดยทำปฏิกิริยากับด่าง ซึ่งแอลคาลอยด์เบสจะตกตะกอนออกจากชั้นน้ำ สำหรับแอลคาลอยด์บางชนิด มีความเป็นเบสที่ต่ำกว่าปกติ เช่น colchicines จะไม่แสดงคุณสมบัติการละลายดังกล่าวข้างต้น ทำให้การตรวจสอบอาจได้ผลลบลวง (false negative) หรือแอลคาลอยด์บางชนิด ละลายน้ำได้ดี เช่น quaternary alkaloids การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทั่วไปซึ่งจะทิ้งชั้นน้ำ ทำให้การตรวจสอบแอลคาลอยด์ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่พบแอลคาลอยด์ประเภทนี้ นั่นคือเกิดผลลบลวง ดังนั้นการตรวจสอบแอลคาลอยด์จึงต้องตรวจสอบทั้งชั้นน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ แอลคาลอยด์ส่วนใหญ่สามารถทำปฏิกิริยากับสารที่มีโลหะหนัก เช่น ปรอท ทอง แพลทตินัมและแคดเมียม ได้เกลือที่ไม่ละลายน้ำ จึงใช้น้ำยาที่มีโลหะหนักเหล่านี้ตรวจหาแอลคาลอยด์ แม้ว่า แอลคาลอยด์ ขนาด 10-100 μg ก็สามารถตรวจพบได้

การตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับแอลคาลอยด์ มีน้ำยาตรวจสอบ 2 ชนิด คือ

1. Alkaloidal precipitant เป็นน้ำยาที่สามารถตกตะกอนกับแอลคาลอยด์ ในสารละลายที่เป็นกรดเจือจาง Alkaloidal precipitant แบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท คือ

- Oxygen containing acid ทำปฏิกิริยากับแอลคาลอยด์ ได้เกลือตกตะกอนได้แก่ silicotungstic acid, phosphotungstic acid และ phosphomolybdic acid

- สารที่ทำปฏิกิริยากับแอลคาลอยด์ ได้ตะกอนของ base complex molecule เช่น Wagner's และ Bouchardat's

- โดยการ form insoluble addition product กับ N ของแอลคาลอยด์ เช่น Mayer's, Valser's, Marme's และ Dargendorff's

- กลุ่มกรดอินทรีย์ (organic acid) ที่ทำปฏิกิริยากับแอลคาลอยด์ได้ตะกอนของเกลือ ได้แก่ Hager's (picric acid)

2. Spray or dip reagents เป็นน้ำยาที่ตรวจสอบแอลคาลอยด์ ในรูปเบสอิสระ (free base) ที่นิยมใช้ คือ Modified Dargendroff's reagent ซึ่งจะให้สีส้มถึงแดงกับแอลคาลอยด์ส่วนใหญ่ การตรวจสอบด้วยน้ำยาควรใช้น้ำยา ชนิดต่างๆ กัน 4-5 ชนิด ป้องกันการผิดพลาดเพราะน้ำยาแต่ละตัวมีความไวต่อปริมาณแอลคาลอยด์ไม่เท่ากัน

ตารางที่ 1.2 แสดงผลบวกของการตรวจสอบแอลคาลอยด์ด้วยน้ำยาชนิดต่างๆ [9]

น้ำยา	ส่วนประกอบ	สีของตะกอน
Krant's	Potassium bismuth iodide	ส้มน้ำตาลแดง
Marme's	Potassium cadmium iodide	ขาว
Dragendorff's	Potassium bismuth iodide	ส้ม
Hager's	Picric acid	เหลือง
Mayer's	Potassium mercuric iodide	ขาว
Tannic acid	Tannic acid	ขาวขุ่น
Wagner's	Iodide in potassium iodide	น้ำตาลแดง

ในการรายงานว่ามี แอลคาลอยด์ มากหรือน้อยในพืชที่ทดสอบใช้สัญลักษณ์ +, ++, +++, ++++ แสดงปริมาณที่มากขึ้นตามลำดับ ถ้าจะให้เป็น semi-quantitative อาจใช้เปรียบเทียบตะกอนที่เกิดขึ้นกับตะกอนที่เกิดจากสารละลายมาตรฐานของแอลคาลอยด์ ที่มีความเข้มข้นที่แน่นอน เมื่อใช้น้ำยาและวิธีการทดสอบชนิดเดียวกัน

- ถ้าได้ผลลบกับน้ำยาทุกชนิด แสดงว่าไม่มีแอลคาลอยด์เลย
- ถ้าได้ผลบวกอาจจะมีแอลคาลอยด์ หรือไม่มีก็ได้ เพราะสารประกอบในธรรมชาติที่มี N อยู่ทำให้เกิดผลบวกลวงได้เช่น coumarin, α-pyrone, anthaquinone, protein, albuminoius เป็นต้น
- วิธีป้องกันผลบวกลวง คือ การนำเอาน้ำยาสกัดขั้นต้น มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้น ด้วยการทำน้ำยาสกัดให้เป็นด่าง แล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์มไปทดสอบต่อไป

นอกจากนี้แล้วยังสามารถตรวจสอบแอลคาลอยด์ด้วยวิธี TLCได้ โดยตัวทำลำลายที่นิยม เช่น toluene: ethyl acetate: diethyl amine (7:2:1) หรือ ethyl acetate: methanol: water (100:13:5:10) หรือ cyclohexane: diethyl amine (9:1) และตรวจสอบจุด (spot) ด้วย UV chamber หรือ ฉีดพ่นด้วย Dragendorff's spray reagent ที่เตรียมขึ้นใหม่ๆ อบให้ร้อน แล้วตรวจดูว่ามีจุดสีแดงอมส้มหรือไม่

หลังจากตรวจสอบเบื้องต้นแล้วว่ามีแอลคาลอยด์ ในการตรวจสอบเพื่อหาชนิดของชนิดของแอลคาลอยด์อาศัยคุณสมบัติต่อไปนี้

1. คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การหาจุดหลอมเหลว จุดเดือด ลักษณะผลึก เป็นต้น
2. คุณสมบัติทางเคมี ตรวจสอบได้ 2 วิธี

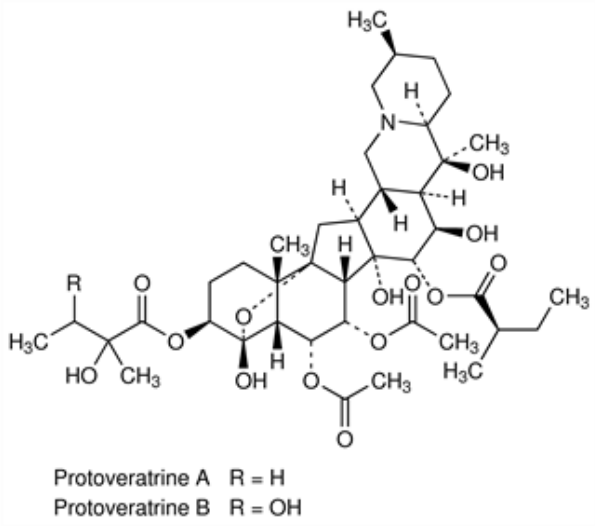
ก) การทำปฏิกิริยา การเกิดสีที่เฉพาะเจาะจงกับ nucleus ของแอลคาลอยด์แต่ละชนิด เช่น Vitali ใช้ตรวจสอบ tropane alkaloid โดยใช้ผลึก tropane + 4 หยด กรดไนตริกเข้มข้น แล้วนำไประเหยแห้งบนอ่างน้ำร้อนจะได้คราบสีเหลือง ทิ้งให้เย็นเติมอะซีโตน10 หยด + 3% KOH ในเมทานอล 2 หยด เกิดสีทันที หรือ Erythoquinine test และ Fluorescein test ใช้ทดสอบ quinoline alkaloid เช่น quinine, quinidine โดยใช้สารละลายตัวอย่าง 0.5% quinoline ในกรดอะซีติกเจือจาง 0.5 mL เติมน้ำยาโบรมีนจนได้สีเหลืองอ่อนคงตัว จากนั้นเติม 10% Potassium ferrocyanide 1 หยด เติมสารละลายเจือจาง NH_4OH 1 หยด จะได้สีแดง เติมคลอโรฟอร์ม 1 mL เป็นต้น

ข) การทำปฏิกิริยาของกลุ่มอนุมูล functional group เช่น phenolic hydroxyl จะให้สีกับ ferric chloride

3. คุณสมบัติทางโครมาโทรกราฟีโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน
4. สเปกโทรสโกปีโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่มีอยู่กับสิ่งตีพิมพ์

1.3.2 แอลคาลอยด์กลุ่มสเตียรอยด์ (Steroid)

มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยวงแหวนไซโคเพนทาโนเพอไฮโดรฟีแนนทรีน (cyclopentanoperhydrophenanthrene ring) เช่น โพรโทเวอราทรีน (protoveratrine, รูปที่ 1.3) จากรากและเหง้าของพืชสกุลเวอราทรุม (*Veratrum* spp. เช่น *Veratrum album*) ในวงศ์ลิเลียซีอี (Liliaceae) ใช้เป็นยาลดความดัน (hypotensive agent) เป็นต้น

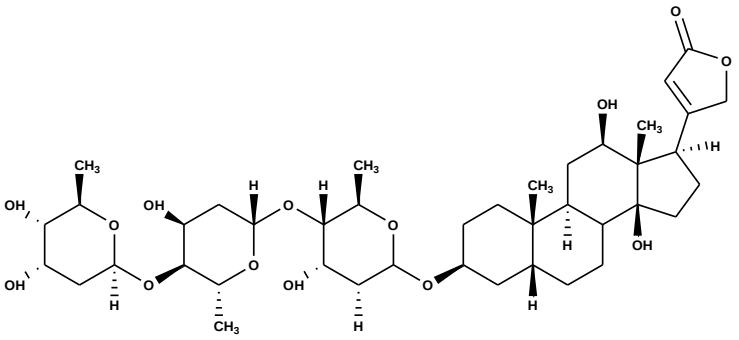


รูปที่ 1.3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของโพรโทเวอราทรีน [โพรโทเวอราทรีน เอ (protoveratrine A,
R = H), โพรโทเวอราทรีน บี (protoveratrine B, R = OH)]

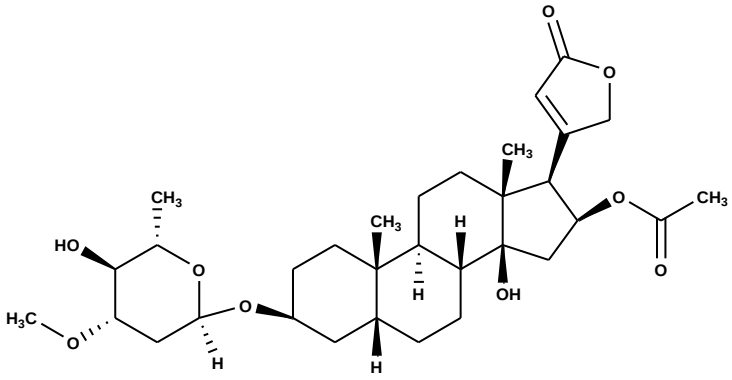
1.3.3 ไกโคไซด์ (Glycosides)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนอะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) จับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลหรือเรียกส่วนไกลโคน (glycone) จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอย่างกว้างขวาง และบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ โดยทั่วๆ ไปไกลโคไซด์จะละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้วขึ้นกับจำนวนและชนิดน้ำตาลของโครงสร้างไกลโคนของไกลโคไซด์ เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จะเกิดการสลายพันธะที่เชื่อมต่อระหว่างอะไกลโคนและไกลโคน ปกติอะไกลโคนของไกลโคไซด์มีโครงสร้างที่แตกต่างกันหลายแบบและนิยมใช้เป็นหลักในการจำแนกประเภทของไกลโคไซด์ แม้ว่าค่อนข้างจะยุ่งยากบ้าง แต่การจำแนกไกลโคไซด์ตามสูตรโครงสร้างก็ยังเป็นที่นิยมอยู่ ซึ่งแบ่งได้หลายกลุ่ม เช่น

1.3.3.1 คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) มีอะไกลโคนเป็นสเตียรอยด์นิวเคลียส (steroid nucleus) คือ มีโครงสร้างเป็นวงแหวนไซโคเพนทาโนเพอไฮโดรฟีแนนทรีนอยู่ในโมเลกุล มีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น ดิจอกซิน (digoxin, รูปที่ 1.4) จากใบของพืชสกุลดิจิทาลิส (*Digitalis lanata* Ehrh. หรือ *Digitalis purpurea* L.) ในวงศ์สะครอบฟูลาเรียซีอี (Scrophulariaceae) ใช้บำบัดรักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติของหัวใจหรือโอลีแอนดริน (oleandrin, รูปที่ 1.5) จากใบยี่โถ (*Nerium incidum* Mill) ในวงศ์เอโพไซนาซีอี (Apocynaceae) มีฤทธิ์เช่นเดียวกับดิจอกซิน เป็นต้น

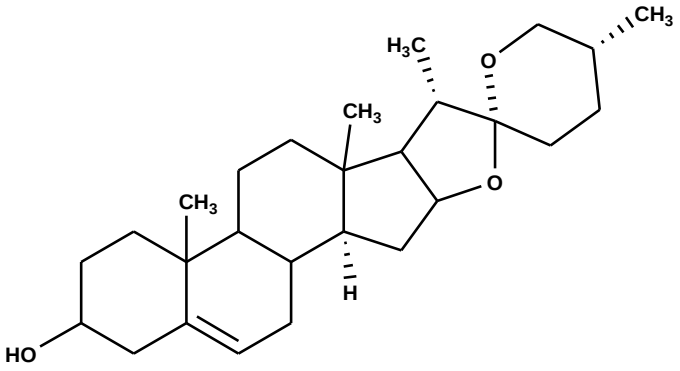


รูปที่ 1.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของดิจอกซิน

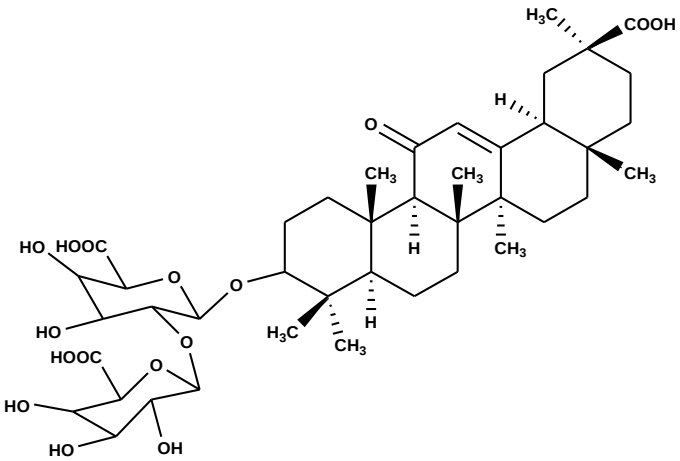


รูปที่ 1.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของโอลีแอนดริน

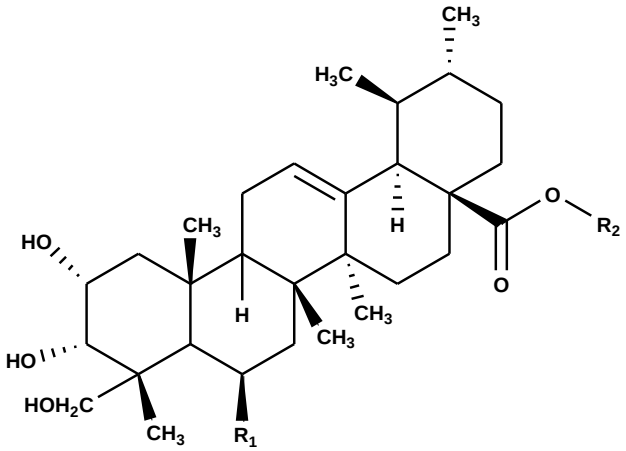
1.3.3.2 ซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides) มีอะไกลโคนเป็นสเตียรอยด์หรือไทรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoid) เช่น ไดออสซิน (dioscin) เป็นสเตียรอยดัลซาโปนิน (steroidal saponin) จากเมล็ดลูกซัด (*Trigonella foenum-graecum* L.) ในวงศ์เลกกูมินาซีอี (Leguminosae) เมื่อถูกไฮโดรไลซิสจะให้ไดออสจีนิน (รูปที่ 1.6) ใช้เป็นสารกึ่งกลางในขบวนการสังเคราะห์ยาคุมกำเนิดและผลิตฮอร์โมนเพศ นอกจากนี้ยังพบไดออสจีนินในเหง้าและเมล็ดของเอื้องหมายนา (*Costus speciosus* Smith) หรือ กลีเซอไรซิน (glycyrrhizin, รูปที่ 1.7) เป็นไทรเทอร์พีนอยด์ซาโปนิน (tri-terpenoid saponin) ที่ได้จากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ในวงศ์เลกกูมินาซีอี (Leguminosae) มีฤทธิ์ลดการอักเสบและต้านไวรัส หรือ เอเชียทิโคไซด์ (asiaticoside, รูปที่ 1.8) และมาเดคาสโซไซด์ (madecassoside, รูปที่ 1.8) เป็นไทรเทอร์พีนอยด์ซาโปนิน (triterpenoid saponins) ที่ได้จากต้นบัวบก (*Centella asiatica* (L) Urban) ในวงศ์อัมเบลลิเฟอเร (Umbelliferae) มีสรรพคุณเป็นยาฝาดสมานทำให้แผลหายเร็ว รักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ทำให้แผลเป็นไม่ปูด ปัจจุบันออกมาจำหน่ายหลายรูปแบบ เช่น ผง ครีม ขี้ผึ้ง เป็นต้น



รูปที่ 1.6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของไดออสจีนิน



รูปที่ 1.7 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกลีเซอไรซิน



รูปที่ 1.8 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเอเชียทิโคไซด์ (R1 = -H, R2 = -*O*-glu-glu-glu) และมาเดคาสโซไซด์ (R1 = -OH, R2 = -*O*-glu-glu-glu)

1.3.3.3 กลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์ (saponin glycosides)

ซาโปนินไกลโคไซด์เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีโครงสร้างทางเคมีแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามชนิดของอะไกลโคน (aglycone) คือ สเตียรอยดอลซาโปจีนิน (steroidal sapogenin) และไทรเทอร์พีนอยด์ซาโปจีนิน (triterpenoid sapogenin) การตรวจสอบเบื้องต้นอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้คือ ซาโปนินไกลโคไซด์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มไอออนิก (ionic group) ของผนังเม็ดเลือดแดงและจับกับโมเลกุลของไขมัน (lipid) ด้วยแรงแวนเดอร์วาลว์ (Van der Wal's force) ทำให้ผนังเม็ดเลือดแดงถูกทำลายในการตรวจสอบจำเป็นต้องระมัดระวังการแปลผลอาจผิดพลาดแบบให้ผลลบอำพรางซึ่งอาจเกิดจาก

- ในสารสกัดที่มีแทนนิน (tannin) เป็นองค์ประกอบ กลุ่มฟีนอล (phenolic group) ของแทนนินจะไปเชื่อมต่อกับกลุ่มคีโท-อิมิโด (ketoimido group) ของโปรตีนที่ผนังเม็ดเลือดแดงด้วยแรงดึงดูดไฮโดรเจน (H-bonding) ทำให้ผนังเซลล์เป็นไฮโดรโฟบิกหรือไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซาโปนินจึงเข้าไปทำปฏิกิริยากับผนังเม็ดเลือดแดงไม่ได้ อาจลดปัญหานี้โดยใช้แมกนีเซียมออกไซด์ (magnesium oxide) ตกตะกอนแทนนินออกเสียก่อน
- ไทรเทอร์พีนอยด์ซาโปจีนินที่มีกลุ่มที่แสดงความเป็นกรด (acidic group) อยู่ จะถูกแอลบูมิน (albumin) และซีรัม (serum) ยับยั้งไม่ให้ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงจึงทำให้ปฏิกิริยาได้น้อย นอกจากนี้ซาโปนินกลุ่มนี้มักพบในรูปอะไกลโคนมาก ซึ่งอะไกลโคนจะไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง

นอกจากนี้อาจเกิดการอ่านผลผิดพลาดแบบให้ผลบวกอำพรางได้ เช่นกัน เนื่องจากสารบางชนิด ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid), กรดซินนามิก (cinnamic acid), กรดฟีรูลิก (ferulic acid), กรดซิทริก (citric acid), กรดกอลลิก (gallic acid) เป็นต้น สารเหล่านี้อาจทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้บ้าง ซึ่งอาจลดปัญหานี้โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 (isotonic phosphate buffer, pH 7.4) แทนน้ำเกลือ (normal saline)

- ในสารละลายที่เป็นน้ำ เมื่อเขย่าซาโปนินจะทำให้เกิดฟองซึ่งมีลักษณะเฉพาะ คือเป็นรูป 6 เหลี่ยมเรียงซ้อนกันเหมือนรังผึ้ง (honey comb froth) ฟองนี้จะคงตัวอยู่ประมาณ 30 นาที ในการตรวจสอบควรระมัดระวังเรื่องฟองที่อาจเกิดจากโปรตีนและกรดในพืชบางชนิด แต่สามารถแยกได้โดยหยดด่างลงไป ถ้าเป็นกรดจะทำปฏิกิริยากับด่างเกิดเป็นเกลือ ซึ่งเกิดฟองมากและคงตัวขึ้นเมื่อเขย่า หรือหยดกรด นำไปต้มจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้อะไกลโคนของซาโปนินซึ่งไม่เป็นฟองเมื่อเขย่า ถ้าฟองยังคงอยู่แสดงว่าเป็นกรด

- ใช้การทดสอบลีเบอร์แมนเบอร์ชาร์ด เพื่อตรวจสอบสเตียรอยด์ชนิดไม่อิ่มตัว โดยทั่วไปแล้ว สเตียรอยดอลซาโปจีนินจะให้สีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว ส่วนไทรเทอร์ฟีนอยด์ซาโปจีนินจะให้สีแดงชมพู หรือม่วงแดง

1.3.4 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

เป็นสารประกอบจำพวกโพลิฟีนอลิก (phenolic compound) พบในธรรมชาติในรูปของไกลโคนอิสระ หรือจับกับน้ำตาลในรูปของไกลโคไซด์เป็นกลุ่มของสารที่มีโครงสร้าง 2 ส่วน คือ C_6-C_3 และ C_6 พบในทุกส่วนของพืช โดยเฉพาะในดอกฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติมีประมาณ 2,000 ชนิดและมักพบในไม้ดอกหรือเฟิร์นเท่านั้น แต่ก็มีการพบ anthocyanidin ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งในสาหร่ายได้บ้าง ดังที่กล่าวมาแล้ว เรามักพบฟลาโวนอยด์ในไม้ดอก สารฟลาโวนอยด์จึงเป็นสารที่ทำให้เกิดสีสันต่างๆ ของพืชในธรรมชาติ แบ่งตามโครงสร้างได้มากกว่า 10 กลุ่ม และในแต่ละกลุ่มยังแบ่ง

ออก เป็นชนิดได้อีก จากการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1962 ทำให้ทราบถึงบทบาทของฟลาโวนอยด์ในแง่ต่างๆ ของพืชและสิ่งแวดล้อมรวมถึงมนุษย์และสัตว์ เช่น เป็นสารป้องกันอนุมูลอิสระ (antioxidant) ให้กับกรดแอสคอบิก (ascorbic acid) ซึ่งจำเป็นมากในเซลล์พืช การล่อแมลงและนกให้มาช่วยแพร่พันธุ์ด้วยการผสมเกสร ช่วยป้องกันพืชจากการรุกรานของราและแบคทีเรีย ในอดีตฟลาโวนอยด์ยังได้รับความนิยมว่ามีคุณค่าทางอาหาร เรียกว่า Vitamin P (permeability) แต่เมื่อไม่มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารนี้จึงให้ชื่อว่า Bio-flavonoids เชื่อกันว่าสารนี้มีประโยชน์ต่อหลอดเลือดฝอย จึงมีความสำคัญทางเภสัชกรรมและการแพทย์แผนปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น Rutin ช่วยเพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดฝอยและสารสกัดจากใบแป๊ะก๊วยช่วยเพิ่มการไหลเวียนของเลือดไปยังสมองและช่วยทำลายอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการเสื่อมของเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์ [9] สามารถแบ่งฟลาโวนอยด์ออกเป็นชนิดต่างๆ ที่พบมากได้แก่ flavone dihydroflavonol anthocyanidin aurone และ isoflavonoids จากกลุ่มของฟลาโวนอยด์ข้างต้น สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ฟลาโวนอยด์กลุ่มที่มีความเป็นขั้วสูง และกลุ่มที่มีความเป็นขั้วต่ำ สำหรับกลุ่มที่มีความเป็นขั้วต่ำที่พบมาก ได้แก่ flavanone dihydroflavonol และ isoflavonoids ซึ่งมีฤทธิ์เป็นยาแก้เจ็บหน้าอก ซึ่งสามารถสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่ำ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ หรือเฮกเซน ส่วนกลุ่มที่มีความเป็นขั้วสูง ได้แก่ น้ำ เอทานอล เมทานอล เป็นต้น

การสกัดสารฟลาโวนอยด์จากพืช ขึ้นอยู่กับชนิดของฟลาโวนอยด์และส่วนของพืชที่มี ฟลาโวนอยด์สะสมอยู่ การเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดขึ้นอยู่กับความมีขั้วของฟลาโวนอยด์ ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วน้อยใช้ในการสกัดสารฟลาโวนอยด์ไกลโคน ส่วนตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วมากใช้สกัดฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ หรือ แอนโทไซยานิน ตัวอย่างเช่น isoflavone flavonone และ dihydroflavonol หรือ flavone และ flavonol ซึ่งมีอนุมูลเมทิล (methyl radical) มากทำให้มีสภาพขั้วน้อยจึงใช้เบนซีน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ หรือเอทิลอะซิเตต ในการสกัดและก่อนทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเหล่านี้ มักใช้เฮกเซน หรือ light petroleum ether สกัด sterol carotenoids และ chlorophyll ออกก่อน โดยต้องคำนึงว่าจะมีการสูญเสียฟลาโวนอยด์อไกลโคนบางตัวไปด้วยส่วนหนึ่ง ได้แก่ isoflavone ส่วน flavoglycoside hydroxyflavone flavonol bi-flavonyl chalcone และ aurone ซึ่งมีขั้วสามารถสกัดได้ผลดีโดยการใช้อะซีโตน เอทานอล หรือส่วนผสมของเมทานอล : น้ำ (1:1) หรือใช้น้ำเดือดสกัด polyglycoside flavanediol chatichine และ proantocyanitine [9]

การพิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างเบื้องต้นของสารฟลาโวนอยด์มีหลายวิธีที่นิยม ได้แก่

1. ปฏิกิริยาการเกิดสี (Color test)

- Shinoda's test หรือ Cyanidin's test เป็นการตรวจสอบนิวเคลียสของ Benzo-β- pyrone ของสารประกอบหมู่ฟลาโวนอยด์ ในสภาวะกรด ที่มีโลหะโซเดียมเป็นตัว Catalyst ปฏิกิริยาเกิดการรีดักชันของสารประกอบหมู่ฟลาวาโนนและไฮโดรฟลาโวนอล

- Pew test เป็นการตรวจสอบฟลาโวนอยด์ในสภาวะกรดที่มี Zinc เป็นตัว Catalyst สารประกอบหมู่ฟลาโวนอล -3- ไกลโคไซด์ และฟลาโวนอลจะให้สีแดงเข้ม ส่วนสารประกอบหมู่ฟลาโวนและฟลาโวนอล จะให้สีจาง

- Ferric chloride test เป็นการตรวจสอบหมู่ฟีนอลิก ของสารประกอบที่มีอนุพันธ์คาเทชอล (Catechol derivatives) จะให้สีเขียว สารประกอบที่มีอนุพันธ์ไพโรแกลลอล

(Pyrogallol derivatives) จะให้สีน้ำเงิน ส่วนสารประกอบที่มีอนุพันธ์แกลลอคาเทชิน (Gallocatechin derivatives) จะให้สีดำอมน้ำเงิน

- Bromine water เป็นการตรวจสอบสารประกอบหมู่โปรแอนโทไซยานิดิน (Proan- thocyanidins) หรือ Condensed tannins สารประกอบหมู่นี้จะเกิดตะกอนกับ Bromine water ขณะที่ tannins อื่นๆ หรือฟลาโวนอยด์อื่นๆ ไม่เกิดตะกอน

2. การอาศัยคุณสมบัติทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ การใช้เทคนิคแอลตราไวโอเลตสเปกโทรสโคปี (Ultraviolet spectroscopy: UV) โดยใช้ชิฟท์รีเอเจนต์ (Shift's reagent) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ทำให้ยอดการดูดกลืนแสงของสารเปลี่ยนไป เช่น

- โซเดียมเมทอกไซด์ (Sodium methoxide หรือ NaOMe) ซึ่งประกอบไปด้วย 2.5 กรัม โลหะโซเดียมในเมทานอล 100 มิลลิลิตร รีเอเจนต์นี้สามารถตรวจสอบลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ในโมเลกุลได้ โดยเฉพาะพวกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระและมีสภาวะเป็นกรด ถ้ามีการสลายตัวของสารที่ตั้งทิ้งไว้แสดงว่าน่าจะมีหมู่ของสารที่ไวต่อด่างอยู่ในโมเลกุล

- โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate หรือ NaOAc) เป็นผงปราศจากน้ำโดยใช้ตรวจสอบสารที่มี 7-ไฮดรอกซิล

- อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride หรือ $AlCl_3$) ผง AlCl3 5 กรัม ละลายในเมทานอล 100 มิลลิลิตร จากสเปกตรัมของอลูมิเนียมคลอไรด์ สามารถตรวจสอบสารเชิงซ้อนทุกชนิดที่เกิดขึ้นได้

- กรดเกลือ ใช้กรดเกลือเข้มข้น 50 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใช้ร่วมกับอะลูมิเนียมคลอไรด์ ใช้ตรวจสอบสารเชิงซ้อนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่คีโตนได้

- กรดบอริก (Boric acid: H_3BO_3) ซึ่งเป็นผงปราศจากน้ำใช้ร่วมกับสารละลายโซเดียมอะซีเตตใช้ตรวจสอบออโธ –ไฮดรอกซิล

สำหรับสารฟลาโวนอยด์ การหาสูตรโครงสร้างจะต้องอาศัยข้อมูลทางแอลตราไวโอเลตสเปกโทรสโคปี การสังเกตสีภายใต้แสงแอลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และการใช้น้ำยาพ่นบนแผ่นโครมาโทรแกรม ได้แก่ สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) การอังไอแอมโมเนีย (Ammonia) และสารละลายวานิลิน-กรดเกลือ (Vaniline-Hydrochloric acid)

สเปกตรัมของฟลาโวนอยด์ โดยทั่วไปประกอบไปด้วยยอดการดูดกลืน 2 ยอดในช่วงความยาวคลื่น 240 - 285 นาโนเมตร (แถบที่2) และ 300-350 นาโนเมตร (แถบที่ 1) ลักษณะสเปกตรัมเฉพาะของสารประกอบฟลาโวนอยด์เกือบทุกชนิด ที่มีออกซิเจนจับกับคาร์บอนที่ตำแหน่ง 5, 4 และ 6 ในสารพวกไดไฮโดรฟลาโวนอล ไดไฮโดรฟลาโวน และ ไอโสฟลาโวน จะมีลักษณะความเข้มของแถบที่ 1 ต่ำกว่า ส่วนพวก แชลโคน ออโรน และแอนโทไซยานิน สเปกตรัมของแถบที่ 1 จะย้ายตำแหน่งไปที่ความยาวคลื่นที่ยาวกว่า [9]

ในการตรวจสอบเอกลักษณ์เบื้องต้นของการแยกสารต่างๆจากสารสกัดรวม อาจทำได้โดยอาศัยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer Chromatography ; TLC) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและแม่นยำกว่าการใช้ปฏิกิริยาสี สามารถใช้เป็นวิธีแยกสารและตรวจสอบไปพร้อมกัน ทำได้โดยจุดหรือสปอต (spot) สารตัวอย่างลงบนตัวดูดซับ (adsorbent) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งเป็นสาระสำคัญในพืชสมุนไพร หากไม่ทราบสารสำคัญอาจใช้สารอื่นที่สามารถใช้เป็นดรรชนีในการควบคุมคุณภาพ เช่น สารที่เป็นลักษณะเฉพาะของพืชสมุนไพรนั้น จากนั้นทำการแยกสารในภาชนะที่ใส่ตัวทำละลายที่เหมาะสม (solvent system) เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองคำนวณหาค่า Rf (Relative

Front หรือ Retardation Factor) และความเข้มของสีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ถ้าไม่มีสีต้องพ่นด้วยน้ำยาตรวจสอบที่เหมาะสมหรือดูภายใต้แสงแอลตราไวโอเลต (ultraviolet)

1.4 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดย Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

สเปกโทรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, NMR) เป็นเครื่องมือที่ใช้เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารสำคัญในสมุนไพรว่าเป็นสารประเภทใด โดยดูค่าการเปลี่ยนแปลงของโปรตอน (proton ; H) ที่เกิดขึ้น เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าของนิวเคลียส ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอะตอมของโปรตอน (1H, proton NMR) หรืออะตอมของคาร์บอน-13 (13C, carbon NMR) โดยที่อะตอมของโปรตอนและคาร์บอนที่อยู่ในโครงสร้างจะเกิดการเรโซแนนซ์ ในสนามแม่เหล็กและปรากฏเป็นสัญญาณบนสเปกตรัมของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR spectrum) ที่เรียกว่า ค่าเคมิคัลชิฟ (chemical shift) และจากค่าเคมิคัลชิฟนี้ทำให้สามารถทำนายโครงสร้างทางเคมีของสาร หรือใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบสเปกตรัม (ทั้งของโปรตอนและ/หรือคาร์บอน) กับสารที่เคยมีรายงานไว้แล้ว นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการสูญเสียสาร และหากใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมก็สามารถนำ ไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษต่อไปได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของยาและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีปริมาณสารจำกัด NMR เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก เทคนิคทางด้าน NMR มีประโยชน์มากในการศึกษาเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของสาร ซึ่งเป็นการศึกษาเกี่ยวกับนิวเคลียส ตลอดจนสภาวะข้างเคียงรอบนิวเคลียสนั้นๆ ด้วย นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ เช่น การหาปริมาณไขมันแข็งในอาหาร และได้มีการประยุกต์นำไปใช้ในทางการแพทย์เพื่อการตรวจวินิจฉัย เช่น ตรวจสมอง โดยการใช้เทคนิค magnetic resonance imaging (MRI) เป็นต้น เทคนิค NMR เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายสารตัวอย่าง โดยสารตัวอย่างอาจเป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซก็ได้ แต่ที่นิยมมากที่สุด คือสารตัวอย่างอยู่ในลักษณะของสารละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม หลักการของ NMR คือ นิวคลีไอ (nuclei) ของธาตุบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นแม่เหล็ก เนื่องจากมีประจุ และจะประพฤติตัวเหมือนกับหมุนอยู่ตลอดเวลา โดยสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติแม่เหล็กของนิวคลีไอเหล่านี้ได้เมื่อนำนิวคลีไอไปวางในสนามแม่เหล็ก นิวคลีไอที่มีคุณสมบัติแม่เหล็กได้แก่ นิวคลีไอของ 1H, 13C, 14N, 15N, 17O, 19F, 31P เป็นต้น ที่เห็นชัดที่สุด คือนิวคลีไอของ 1H และ 13C ซึ่งจะประพฤติตัวเสมือนเป็นแม่เหล็กอันเล็กๆในสนามแม่เหล็ก แล้วเมื่อให้พลังงานในช่วงความถี่ของคลื่นวิทยุที่เหมาะสม จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีไอ โดยอาจดูด หรือคายพลังงานการเปลี่ยนแปลงที่เกิดเรียกว่า เรโซแนนซ์ (resonance) ความถี่ของคลื่นวิทยุที่เหมาะสมกับนิวคลีไอของ 1H คือ 8 ขนาดความถี่ 100 MHz การเกิดเรโซแนนซ์ของโปรตอนแต่ละตัวก็จะแตกต่างออกไปจาก 100 MHz เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า chemical shift (δ) ซึ่งเครื่อง NMR spectrometer จะบันทึกออกมาในหน่วย ppm Spectrum ที่ได้จากการวัด magnetic moment ของ H-atom และ C-atom ซึ่งจะมีค่าmagnetic moment แตกต่างกันเป็นวิธีวิเคราะห์จำนวน และลักษณะการจัดเรียงตัวของ proton และ carbon ในโมเลกุลของสารประกอบ จะทำให้รู้สูตรโครงสร้างของสารได้

1.5 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดด้วยสารสกัดจากส่วนประกอบต่างๆ ของหมากจอง

หมากจอง (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre) หรือ บักจอง (อีสาน) หรือ สำรอง (ตะวันออก) หรือ พุงทะลาย (ใต้) วุ้นจากหมากจองนำไปทำเป็นอาหาร เช่น ลาบ ป่นอีสาน แกงจืด หรือเป็นของหวาน หรือเป็นน้ำหมากจอง วุ้นมีสรรพคุณเป็นสมุนไพร เมื่อปรุงกับน้ำตาลทรายแดงหรือชะเอมเทศ ใช้รับประทานแก้ร้อนใน กระหายน้ำ แก้ไอ แก้ไข้ แก้เจ็บคอ แก้ท้องเดินและลดอาการอักเสบ นอกจากนี้วุ้นใสใช้พอกตาแก้อักเสบได้ [10]

ผลหมากจองเป็นสมุนไพรที่ตลาดต่างประเทศต้องการมากโดยเฉพาะประเทศจีน โดยเป็นที่ยอม รับและรู้จักกันดีในวงการแพทย์และเภสัชกรรมโบราณ เมื่อนำผลสำรองมาแช่น้ำประมาณ 15-20 นาที จะพองตัวแตกออก เนื้อมีลักษณะเป็นชิ้นบางๆ คล้ายสาหร่ายสีน้ำตาล พองตัวได้ดีในน้ำ มีความสามารถในการดูดซับน้ำ มีสรรพคุณในการแก้ร้อนในกระหายน้ำ ชาวจันทบุรีนำเนื้อสำรองที่แช่น้ำแล้วมาต้มรับประทานทั้งน้ำและเนื้อมีสรรพคุณเป็นยาแก้ร้อนในกระหายน้ำทำให้รู้สึกชุ่มชื่น (http://medplant.mahidol.ac.th/ pharm/search.asp) สารออกฤทธิ์ในหมากจอง เป็นสารพวก bassorine gum ซึ่งพองตัวเป็นเจลได้ดีในน้ำแต่ไม่ละลายน้ำ และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ tragacanth gums [11]

ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของส่วนประกอบต่างๆ ของหมากจอง จึงได้นำส่วนที่เป็นวุ้นของหมากจอง ใบ เปลือกเมล็ด และเนื้อในเมล็ด มาทดสอบกับจุลินทรีย์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับอาการอักเสบและเจ็บคอ ตามที่ระบุไว้ในตำราสมุนไพร ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิเคราะห์ในทางโครงสร้างของสารจากหมากจองต่อไป

1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

He and Sheg [12] รายงานว่า หมากจอง (*Scaphium lychnophorum*) เป็นพืช 1 ใน 30 ชนิดที่จีนนำเข้าเพื่อเป็นสมุนไพร และสามารถพัฒนาระบบการเพาะปลูกจนประสบความสำเร็จ

Hayman et al. (1998) [5] พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของหมากจองคือ ฮิสเตมีน (Histamine) ซึ่งได้จากการแยกออกจากเมล็ด ในส่วนของการศึกษาที่เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทราบแต่เพียงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการจับกับ platelet activation factor receptor. [9]

Watson and Dallwitz [13] รายงานว่า สารต่างๆ ที่พบในพืชวงศ์ Sterculiaceae มีดังนี้ แอลคาลอยด์ โปรแอนโทไซยานิดิน ไซยานิดิน ฟลาโวนอล : คาเอมเฟอรอล และ/หรือ เควซิริน (Quercerin) กรดเอลลาจิก (Ellagic acid) สโปนิน/สโปเจนิน (Saponin/Sapogenin) มีรายงานการศึกษาด้านองค์ประกอบทางเคมีของพืชหลายชนิดในวงศ์นี้ อาทิใน *Pterospermum acerifolium* Willd. มีสารสำคัญหลายชนิด เช่น คาเอมเฟอรอลและคาเอมเฟอไรด์-7-กลูโคไซด์ ที่สกัดจากดอกโดยใช้แอลกอฮอล์เป็นสารสกัด

Vardamides et al. (2003) [14] สกัดสารจากเปลือกของลำต้นของ *Scaphopetalum thonneri* โดยใช้ เมทานอล และจากเทคนิคทางสเปคโทรสโกปี พบโครงสร้างของสารใหม่ 2 ชนิด คือ scaphopetalone (เป็นอนุพันธ์ของ Aryltetralin lignin) และ Scaphopetalumate (เป็น Ester ของ Ferulic acid) และสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว 3 ชนิด คือ Scopoletin, Acopolin และ Oleanolica acid พืชชนิดนี้ชาวคาเมรูนใช้เปลือกเพื่อรักษาโรคไต รักษาแผล และรักษาโรคกระเพาะ

Das et al. (2001) [15] ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Heritiera formes, H. littoralis* และ *H. maccrophylla* (พืชทั้ง 3 ชนิดกำลังจะสูญพันธุ์) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Sterculiaceae เช่นเดียวกับหมากจองโดยใช้วิธี RAPD marker โดยเปรียบเทียบพืชที่ขึ้นอยู่ในป่าชายเลน และไม่ใช่ป่าชายเลน โดยที่พืชทั้ง 3 ชนิด มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 ซึ่งมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในระดับ Karyotype แต่ในระดับ DNA พบว่ามีความแตกต่างกันสูง โดยที่ *H. formes* กับ *H. littoralis* มีความแตกต่างกัน 14.09 % ระหว่าง *H.formes* กับ *H. maccrophylla* มีความแตกต่างกันถึง 52.73% และ *H. maccrophylla* มีความแตกต่างจาก *H. littoralis* และ *H. formes* ถึง 51.23% และ 52.73% ตามลำดับ พบ marker ที่สำคัญ 2 อย่าง คือ OPA-10 (1000 bp) และ OPD-15 (900 bp) ใน Maccrophylla ที่อยู่ในป่าชายเลน

Somboonpanyakul et al. [3] ศึกษาวิธีการสกัดและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของผลหมากจองแห้ง โดยเปรียบเทียบตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ, สารละลาย 0.05 M HCl และสารละลาย 0.05 M NaOH พบว่าได้ปริมาณ Gum ออกมาเป็น 1, 6 และ 20% ตามลำดับ การใช้สารละลาย 0.05 M NaOH เป็นตัวทำละลายในการสกัดหมากจองแห้งจะทำให้ได้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตออกมามากที่สุด คือ 62.0% และโปรตีน 8.4% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโมโนแซคคาไรด์ คือ อะราบิโนส (Arabinose) 31.9 % กาแลคโทส (Galactose) 29.2 % และแรมโนส (Rhamnose) 29.5% นอกจากนี้ยังมีกรดยูโรนิก (Uronic acid) กลูโคส (Glucose) และไซโลส (Xylose) ปริมาณเล็กน้อย

1.7 วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาตัวทำละลายและวิธีการสกัดที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญในเจลหมากจองแห้ง (*Scaphium affine* (Mast.) Pierre)
2. เพื่อแยกและตรวจสอบสารสำคัญโดยใช้การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีและเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)
3. เพื่อทดสอบและพิสูจน์โครงสร้างพื้นฐานที่เป็นไปได้ของสารสำคัญ โดยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีและการทดสอบทางสเปคโทรสโคปี ได้แก่ NMR

1.8 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการสกัดแยกสารสำคัญในหมากจองด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ โดยวิธีการหมัก และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างอย่างคร่าวๆ ของสารสำคัญหลักในเจลหมากจองแห้งด้วยวิธีการทดสอบสีและทางสเปคโทรสโกปี

1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากเจลหมากจองแห้งได้
2. สามารถบอกองค์ปะกอบเบื้องต้นของสารสำคัญในเจลหมากจองได้โดยการใช้การตรวจสอบด้วยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสี TLC และสเปคโทรสโคปี ได้แก่ NMR
3. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำผลหมากจองไปใช้ประโยชน์ให้หลากหลายมากขึ้น

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 สารเคมี

1) Ferric chloride
2) Bromine Water
3) Zinc powder
4) Ammonium hydroxide
5) Acetic acid
6) Hydrochloric acid
7) Formic acid
8) Sulfuric acid
9) Dragendroff's reagent
10) Vanillin
11) *p*-Anisaldehyde
12) Rutin
13) Flavone
14) Steroid
15) Absolute ethanol
16) Chloroform
17) Ethyl acetate
18) Hexane
19) Methanol
20) Toluene
21) Quinine sulfate anhydrate
22) Sodium sulphate anhydrous
23) Chloroform-*d*
24) Methanol-d_4
25) Thin layer chromatography (TLC) คือ Merck kieselgel ที่มีความหนา 0.22-0.25 มิลลิเมตร
26) อาหาร Nutrient broth (NB)
27) อาหาร Potato dextrose broth (PDB)

2.1.2 อุปกรณ์

1) บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 250, 600 mL
2) กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 10, 25, 50, 100 mL
3) หลอดทดลอง (Test tube)

4) หลอดหยด (Dropper)
5) หลอดแคปิลลารี (Capillary tube)
6) หลอดวัด NMR
7) โหลแก้วสำหรับแช่ตัวอย่าง
8) Volumetric flask ขนาด 100, 1000 mL
9) ขวดก้นกลม (Round bottom) ขนาด 100 mL
10) ปิเปต (Pipette) ขนาด 0.5, 1 mL
11) ขวดแก้วมีฝาปิด
12) กรวยแยก (Separatory funnel) ขนาด 100 mL
13) กรวยแก้ว (Glass funnel)
14) อะลูมิเนียม ฟอยล์ (Aluminum foil)
15) ช้อนตักสาร (Spatula)
16) แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
17) กระจกนาฬิกา (Watch glass)
18) กระดาษกรองเบอร์ 41
19) ผ้าขาวบาง
20) โกร่งบด
21) ขวดฉีดน้ำกลั่น (Bottle water)
22) Forceps
23) Rack สำหรับหลอดทดลอง
24) เครื่องเป่าลมร้อน
25) ขวดใส่สารละลายสำหรับพ่น
26) จานเพาะเชื้อ

2.1.3 เครื่องมือ

1) เครื่อง NMR spectrometer รุ่น Bruker 300 MHz spectrometer (บริษัท Bruker)
2) เครื่องให้แสงแอลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 365 นาโนเมตร
3) เครื่อง Rotatory evaporator ของบริษัท EYELA
4) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง
5) หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

2.2 การเตรียมสารเคมี

2.2.1) 2 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก (2 M HCl) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (11.81 M)

C_2 = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ต้องการใช้ (2 M)

V_1 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่ต้องนำมาเจือจาง

V_2 = ปริมาตรของ 2 โมลาร์ ที่ต้องการใช้ (100 mL)

แทนค่าลงในสูตร

$$11.81 \text{ โมลาร์} \times V_1 = 2 \text{ โมลาร์} \times 100 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$V_1 = \frac{2 \text{ โมลาร์} \times 100 \text{ มิลลิลิตร}}{11.81 \text{ โมลาร์}}$$

$$V_1 = 16.93 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น นำไฮโดรคลอริกเข้มข้นมา 16.93 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2.2) 0.1 นอร์มาล กรดซัลฟิวริก (0.1N Sulfuric acid) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (36.20 N)

C_2 = ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ต้องการใช้ (0.1 N)

V_1 = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่ต้องนำมาเจือจาง

V_2 = ปริมาตรของ 0.1 นอร์มาล ที่ต้องการใช้ (1000 mL)

แทนค่าลงในสูตร

$$36.20 \text{ นอร์มาล} \times V_1 = 0.1 \text{ นอร์มาล} \times 1000 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$V_1 = \frac{0.1 \text{ นอร์มาล} \times 1000 \text{ มิลลิลิตร}}{36.20 \text{ นอร์มาล}}$$

$$V_1 = 2.76 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น นำกรดซัลฟิวริกเข้มข้นมา 2.76 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

2.2.3) สารละลาย 5% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (5% NH_4OH)

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (28% NH_4OH)

C_2 = ความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ต้องการใช้ (5% NH_4OH)

V_1 = ปริมาตรของ 28% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ต้องนำมาเจือจาง

V_2 = ปริมาตรของ 5% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ต้องการใช้ (100 mL)

แทนค่าลงในสูตร

$$28\% \times V_1 = 5\% \times 100 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$V_1 = \frac{5\% \times 100 \text{ มิลลิลิตร}}{28\%}$$

$$V_1 = 17.86 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นนำ 28% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มา 17.86 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2.4) สารละลายวานิลิน-กรดเกลือ (Vanillin-Hydrochloric acid)

เตรียม 5%วานิลิน โดยชั่งวานิลิน 5 กรัม ละลายใน 95% เมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรและเตรียมกรดไฮโดรคลอริกโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตรละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5.85 โมลาร์ นำสารละลาย 5% วานิลินมาผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5.85 โมลาร์ที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 4:1 จะได้สารละลายวานิลิน-กรดเกลือสำหรับทดสอบ

2.2.5) สารละลายวานิลิน-กรดซัลฟิวริก (Vanillin-Sulfuric acid)

ชั่งวานิลิน 15 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายวานิลีน-กรดซัลฟิวริก สำหรับทดสอบ

2.2.6) สารละลายอะนิซัลดีไฮด์-กรดซัลฟิวริก (*p*-Anisaldehyde-Sulfuric acid)

ผสมเอทานอล 135 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร กรดอะซีติก 1.5 มิลลิลิตร และ *p*-Anisaldehyde 3.7 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายอะนิซัลดีไฮด์-กรดซัลฟิวริก สำหรับทดสอบ

2.3 การเตรียมตัวอย่าง

ล้างทำความสะอาดผลหมากจองด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแช่ผลหมากจองในน้ำกลั่นจนกระทั่งพองตัวเต็มที่ แยกเปลือกและเมล็ดออก เอาแต่เนื้อเจล นำเนื้อเจลไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C จนแห้ง และบดให้ละเอียดเป็นผง ชั่งน้ำหนักได้ 2.08 กิโลกรัม (แสดงดังรูปที่ 2.1) จากนั้นนำเนื้อเจลหมากจองที่บดละเอียดไปทำการสกัดด้วยตัวทำละลายต่อไป

ล้างผลหมากจองด้วยน้ำกลั่น

↓

แช่หมากจองในน้ำกลั่นจนพองเต็มที่

↓

แยกเอาเปลือกและเมล็ดออก เอาแต่เนื้อเจลหมากจอง

↓

อบเนื้อเจลหมากจองที่อุณหภูมิ 60 °C จนแห้งและบดเป็นผงละเอียด

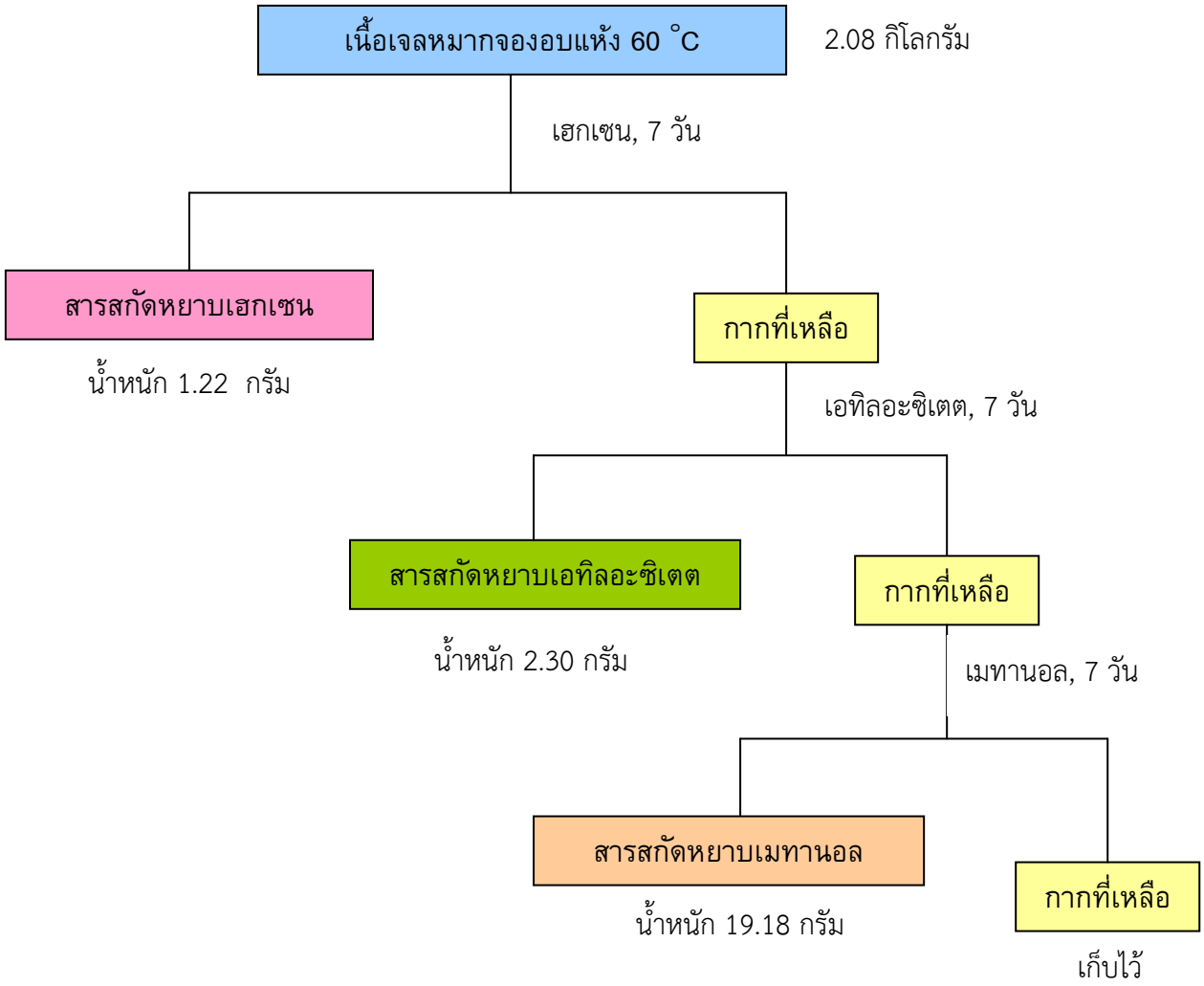
↓

สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตตและเมทานอล

รูปที่ 2.1 ไดอะแกรมการเตรียมตัวอย่างเนื้อเจลหมากจอง

2.4 การสกัดสารตัวอย่าง

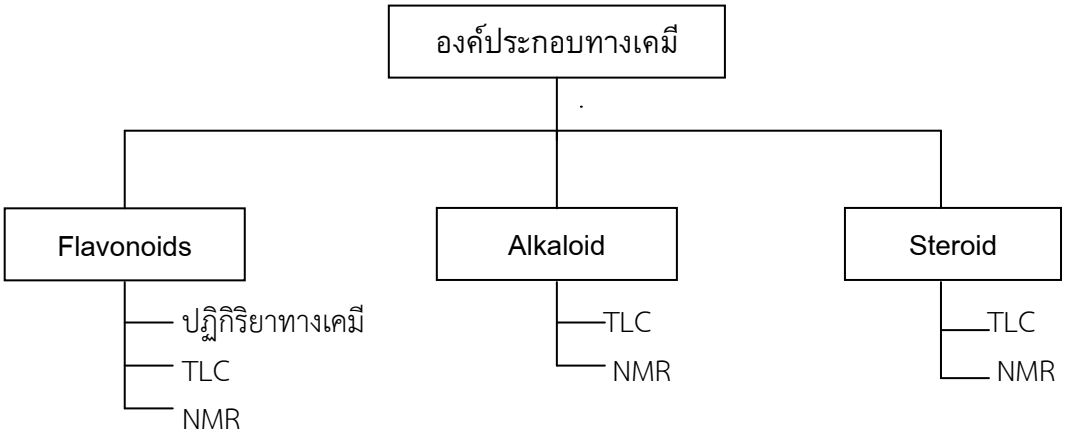
ชั่งผงหมากจองที่บดละเอียด น้ำหนัก 2.08 กิโลกรัม แช่ในเฮกเซน นาน 7 วัน จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (crude hexane) ระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย rotatory evaporator ส่วนที่เหลือเป็นสารสกัดหยาบเฮกเซน น้ำหนัก 1.22 กรัม นำผลหมากจองที่เหลือแช่ในเอทิลอะซีเตต นาน 7 วัน จะได้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (crude ethyl acetate) ระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย rotatory evaporator ส่วนที่เหลือเป็นสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต น้ำหนัก 2.30 กรัม จากนั้นนำผงหมากจองที่เหลือแช่ในเมทานอล นาน 7 วัน จะได้สารสกัดหยาบเมทานอล (crude methanol) ระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย rotatory evaporator ส่วนที่เหลือเป็นสารสกัดหยาบเมทานอล น้ำหนัก 19.18 กรัม (แสดงดังในรูปที่ 2.2) จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากทั้ง 3 ตัวทำละลายไปทำการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 2.2 แผนภาพการสกัดสารจากเนื้อเจลหมากจองอบแห้ง 60 °C

2.5 ขั้นตอนการตรวจสอบสารสำคัญ

นำสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และสารสกัดหยาบเมทานอล มาทำการตรวจสอบวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเนื้อเจลหมากจองโดยใช้เทคนิคต่างๆ คือ การเกิดปฏิกิริยากับสารเคมี การเกิดแถบสีบน TLC และการทดสอบทางสเปคโทรสโกปี (แสดงดังรูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 แผนภาพการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเจลหมากจอง

2.5.1 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของสารประกอบกลุ่ม flavonoids ในเนื้อเจลหมากจอง

2.5.1.1 การตรวจสอบกับ Ferric chloride test

1) นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างชนิดละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2) หยด 1% เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของสารละลายตัวอย่าง

2.5.1.2 การตรวจสอบกับสาร Bromine test

1) นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างชนิดละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2) หยดน้ำโบรมีนลงไป 2-3 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลง และบันทึกผลการทดลอง

2.5.1.3 การตรวจสอบกับสาร Pew test

1) นำสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างชนิดละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2) ใส่ผงสังกะสีลงในหลอดทดลอง 0.1 กรัม เขย่าให้เข้ากัน
3) เติม 2 โมลาร์ไฮโดรคลอริก ลงไปประมาณ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง
4) เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3-4 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง

2.5.2 การตรวจสอบสารประกอบกลุ่ม flavonoids ในเนื้อเจลหมากจองด้วย TLC

วิธีการตรวจสอบ

1) เตรียมสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ตัวทำละลาย คือ สารสกัดหยาบเฮกเซน (crude hexane) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (crude ethyl acetate) และสารสกัดหยาบเมทานอล (crude methanol)
2) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟลาโวนในเมทานอล (1:1 น้ำหนัก/ปริมาตร)
3) เตรียมสารละลายมาตรฐานรูทินในเมทานอล (1:1 น้ำหนัก/ปริมาตร)
4) นำสารละลายตัวอย่าง 6 ไมโครลิตรและสารละลายมาตรฐาน 2 ไมโครลิตรมาป้ายบนแผ่น TLC 2 แผ่น เป่าให้แห้ง
5) นำไปใส่ในถังทำ TLC ที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมเอธิลอะซิเตต - กรดฟอร์มิค - กรดอะซิติก - น้ำ (100:11:11:13)
6) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้สารละลายผสมซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร
7) จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้มาเป่าให้แห้ง
8) นำแผ่นแรกมาตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 365 นาโนเมตร ส่วนแผ่นที่สองฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลิน-กรดเกลือ สังเกตแถบสีและบันทึกผลการทดลอง

2.5.3 การตรวจสอบสารประกอบกลุ่ม Alkaloid ในเนื้อเจลหมากจองด้วย TLC
วิธีการตรวจสอบ

1) สกัดผงเนื้อเจลหมากจอง 5 กรัม ด้วยกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มอล 60 มิลลิลิตร นาน 20 นาที จากนั้นกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41
2) นำสารสกัดที่กรองได้มาปรับ pH ให้เป็นด่าง (pH 8-9) ด้วย 5% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์
3) สกัดแอลคาลอยด์อิสระที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตร นาน 10 นาที โดยใช้กรวยแยก (separatory funnel) ไขชั้นคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ชั้นล่างมารวมกัน
4) กำจัดน้ำที่ปนมากับสารสกัดด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส และนำมากรองผ่านกระดาษเบอร์ 41
5) นำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotatory evaporator
6) จากนั้นนำสารสกัดแห้งที่ได้มาละลายด้วยเมทานอล 0.5 มิลลิลิตร
7) เตรียมสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟตในเมทานอล (1:1 น้ำหนัก/ปริมาตร)
8) นำสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรและสารละลายมาตรฐานมาป้ายบนแผ่น TLC (ทำ 2 ชุด บนแผ่นเดียวกัน) เป่าให้แห้ง
9) นำไปใส่ในถังทำ TLC ที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมคลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (30:7:1)
10) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้สารละลายผสมซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร
11) จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้มาเป่าให้แห้ง

12) นำแผ่นแรกมาตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ส่วนแผ่นที่สองพ่นด้วยสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) เป่าให้แห้ง สังเกตแถบสีและบันทึกผลการทดลอง

2.5.4 การตรวจสอบสารประกอบกลุ่ม Steroids ในเนื้อเจลหมากจองด้วย TLC

วิธีการตรวจสอบ

1) เตรียมสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่ได้จากสารสกัดหยาบเบื้องต้นทั้ง 3 ตัวทำละลาย คือ สารสกัดหยาบเฮกเซน (crude hexane) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (crude ethyl acetate) และสารสกัดหยาบเมทานอล (crude methanol)
2) เตรียมสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ในเฮกเซน (1:1 น้ำหนัก/ปริมาตร)
3) นำสารละลายตัวอย่าง 6 ไมโครลิตรและสารละลายมาตรฐาน 2 ไมโครลิตรมาป้ายบนแผ่น TLC 3 แผ่น เป่าให้แห้ง
4) นำไปใส่ในถังทำ TLC ที่อิ่มตัวด้วยสารละลายผสมโทลูอีน - เอทิลอะซิเตต - กรดฟอร์มิค (15:2:1)
5) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้สารละลายผสมแยกซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร
6) จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้มาเป่าให้แห้ง
7) นำแผ่นแรกมาตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 365 นาโนเมตร แผ่นที่สองฉีดพ่นด้วยสารละลายอะนิซัลดีไฮด์-กรดซัลฟิวริก ส่วนแผ่นที่สามฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลิน-กรดซัลฟิวริก
8) นำแผ่นที่สองและแผ่นที่สามมาให้ความร้อนด้วยเครื่องเป่าลมร้อน (100-120 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-10 นาที) สังเกตแถบสีและบันทึกผลการทดลอง

2.5.5 การตรวจสอบสารสกัดหยาบเบื้องต้นโดยเทคนิค ^{1}H-NMR สเปกโตรสโกปี (Preliminary screening of crude extracts by ^{1}H-NMR spectroscopy)

วิธีการตรวจสอบ

1) ละลายสารสกัดหยาบเฮกเซน (crude hexane) และสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (crude ethyl acetate) ปริมาณเล็กน้อยด้วย chloroform-d
2) ละลายสารสกัดหยาบเมทานอล (crude methanol) ปริมาณเล็กน้อยด้วย Methanol-d4
3) นำไปวิเคราะห์ ^{1}H-NMR โดยเครื่อง NMR spectrometer รุ่น Bruker 300 MHz spectrometer (บริษัท Bruker)

2.6 การศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดด้วยสารสกัดจากส่วนประกอบต่างๆ ของหมากจอง

2.6.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียในอาหาร Nutrient broth (NB) ถ้าเป็นเชื้อยีสต์ใช้อาหาร Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางให้ได้ Optical density (O.D.) ที่ 600 nm ประมาณ 0.5 ก่อนนำไปใช้ทดสอบ

2.6.2 การเตรียมสารสกัดจากส่วนประกอบต่างๆ ของหมากจอง

1. ใบหมากจอง

นำใบอ่อนของหมากจอง ขนาดประมาณ 5-7 x 10-20 cm จากต้นกล้าสายพันธุ์ภูจองและอุบลราชธานี หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนัก แล้วผสมน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 นำไปตำในโกร่ง ใส่ขวดฝาเกลียวเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 และ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อปริมาตร 2 ml ก่อนนำไปหยดเพื่อทดสอบกับจุลินทรีย์

2. เจลหมากจอง

นำผลหมากจองของแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 1 ผล มาแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง แยกเมล็ดหมากจองออกไปจากส่วนที่เป็นเจล นำเจลที่บรรจุในขวดฝาเกลียวไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. เปลือกเมล็ดหมากจอง

นำเมล็ดที่แห้งมาแยกเอาเฉพาะแต่เปลือกของเมล็ด อัตราส่วนเปลือกของ 4 เมล็ด ผสมน้ำ 50 ml แล้วฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำไปหยดทดสอบกับจุลินทรีย์

4. เนื้อในของเมล็ดหมากจอง

แคะเอาเฉพาะเนื้อในของเมล็ดหมากจอง 4 เมล็ด ทำให้แตกเป็นชิ้นเล็กๆประมาณ 3-5 mm ผสมน้ำ 50 ml จากนั้นฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำไปหยดทดสอบกับจุลินทรีย์

2.6.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ตามวิธีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์มา swab ลงในอาหาร NA (สำหรับแบคทีเรีย) และ PDA (สำหรับเชื้อยีสต์)

2. นำ paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรมาวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ตามข้อที่ 1 ไว้แล้ว

3. นำสารสกัดจากส่วนประกอบต่างๆ ของหมากจองแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ (จากวิธีการในข้อ 1-4) มาหยดลงบน paper disc แต่ละอันด้วยปริมาตร 50 และ 100 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลการทดสอบ

2.6.4 การศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ที่สารสกัดยับยั้งได้

1. เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีการข้างต้น อายุ 18 – 24 ชั่วโมง

2. นำจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งได้นั้นมาเตรียมให้มี O.D.ประมาณ 0.5 แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ตั้งแต่ 10^{-3} ถึง 10^{-8} จากนั้นมาทำการ swab ลงในอาหาร NA ถ้าเป็นเชื้อยีสต์ใช้อาหาร PDA

2. นำ paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรมาวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ตามข้อที่ 2 ไว้แล้ว

3. นำสารสกัดหมากจองแต่ละชนิดที่ปลอดเชื้อ มาหยดลงบน paper disc แต่ละอันด้วยปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการทดสอบ

2.6.5 การศึกษาความเข้มข้นของหมากจองที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์

1. เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีการข้างต้น อายุ 18 – 24 ชั่วโมง

2. นำจุลินทรีย์ที่สารสกัดยับยั้งได้ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-2} สำหรับเชื้อ *B .cereus (*ภาควิชาฯ) และ10^{-2} และ10^{-3} สำหรับเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 DMST 8840 และ *S. aureus* (ภาควิชาฯ) ที่สารสกัดหมากจองยั้บยั้งได้ จากนั้นมาทำการ swab ลงในอาหาร NA ถ้าเป็นเชื้อยีสต์ใช้อาหาร PDA

2. นำ paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรมาวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่เชื้อจุลินทรีย์ตามข้อที่ 2 ไว้แล้ว

3. นำสารสกัดหมากจองที่ปลอดเชื้อ โดยเลือกเอาชนิดที่มีประสิทธิภาพของการยับยั้งที่ดี มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1 เท่า, 1 ต่อ 2 เท่า, 1 ต่อ 4 เท่า, 1 ต่อ 8 เท่า และ 1 ต่อ 16 เท่า จากนั้นนำหยดลงบน paper disc แต่ละอันด้วยปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม

4. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลการทดสอบดังกล่าว

บทที่ 3
ผลการทดลอง สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

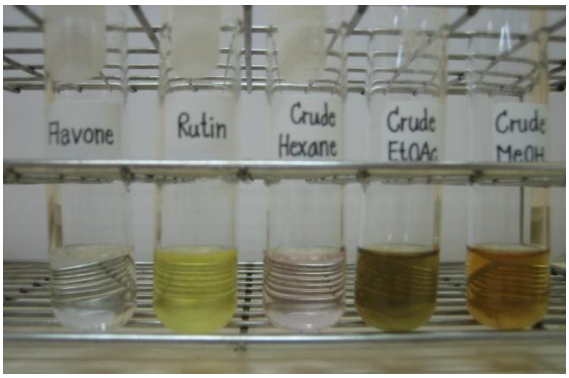
3.1 ผลการตรวจสอบสารประกอบกลุ่ม flavonoids ในเนื้อเจลหมากจอง

3.1.1 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมี

3.1.1.1 Ferric chloride test ผลการตรวจสอบดังแสดงในตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ผลการตรวจสอบสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ในเนื้อเจลหมากจอง โดย Ferric chloride test

การทดสอบ	สารตัวอย่าง	สีและการเปลี่ยนแปลงของสารตัวอย่าง	
		ก่อนตรวจสอบ	หลังตรวจสอบ
Ferric chloride test	Flavone (Standard)	ใสไม่มีสี	สีเหลืองใส
	Rutin (Standard)	สีเหลือง	สีน้ำตาลไหม้
	Crude hexane	สีชมพูอ่อน	เกิดหยดไขมันอยู่ก้นหลอดทดลอง
	Crude ethyl acetate	สีเขียวคล้ำ	เกิดหยดไขมันอยู่ก้นหลอดทดลอง
	Crude methanol	สีน้ำตาลอ่อน	สีเขียวคล้ำ



(ก) ก่อนการตรวจสอบ

(ข) หลังการตรวจสอบ

รูปที่ 3.1 ลักษณะสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ก่อนและหลังการตรวจสอบ Ferric chloride test

สรุปผลการตรวจสอบ

การตรวจสอบโดย Ferric chloride solution เป็นการตรวจสอบ phenolic groups ของสารประกอบที่มี catechol derivatives จะให้สีเขียว สารประกอบที่มี pyrogallol derivatives จะให้สีน้ำเงิน ส่วนสารประกอบที่เป็น gallocatechin derivatives จะให้สีดำอมน้ำเงิน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (Crude hexane), เอทิลอะซิเตต (Crude ethyl acetate) และเมทานอล (Crude methanol) พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล (Crude methanol) เปลี่ยนจากสีน้ำตาลอ่อนเป็นสีเขียวคล้ำ (แสดงดังรูปที่ 3.1) จึงคาดว่าอาจเป็น

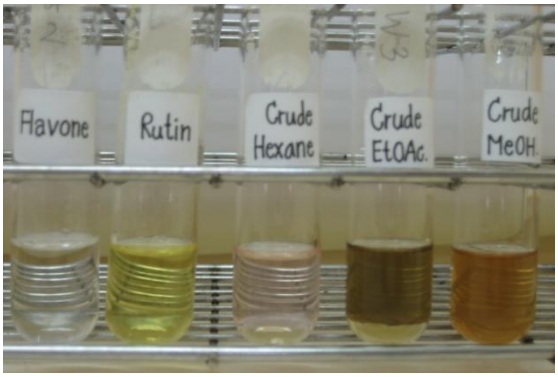
phenolic groups ของสารประกอบที่มี catechol derivatives ซึ่งสารประกอบกลุ่มนี้จะให้สีเขียวเมื่อทำปฏิกิริยากับ Ferric chloride solution และเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่มี คือ ฟลาโวนและรูทิน ปรากฏว่าเมื่อทำการตรวจสอบโดย Ferric chloride solution แล้ว ไม่พบว่าสารสกัดหยาบตัวใดจะมีลักษณะการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีเช่นเดียวกันกับสารละลายมาตรฐานฟลาโวนและรูทินที่มีอยู่

3.1.1.2 Bromine test ผลการตรวจสอบดังแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ผลการตรวจสอบสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ในเนื้อเจลหมากจอง โดย Bromine test

การทดสอบ	สารตัวอย่าง	สีและการเปลี่ยนแปลงของสารตัวอย่าง	
		ก่อนตรวจสอบ	หลังตรวจสอบ
Bromine test	Flavone (Standard)	ใสไม่มีสี	ไม่เปลี่ยนแปลง
	Rutin (Standard)	สีเหลือง	ไม่เปลี่ยนแปลง
	Crude hexane	สีชมพูอ่อน	ตกตะกอนเป็นหยดไขมันอยู่ก้นหลอดทดลอง
	Crude ethyl acetate	สีเขียวคล้ำ	แยกชั้นตกตะกอนเป็นหยดไขมันอยู่ก้นหลอดทดลอง
	Crude methanol	สีน้ำตาลอ่อน	ไม่เปลี่ยนแปลง

(ก) ก่อนการตรวจสอบ



(ข) หลังการตรวจสอบ

รูปที่ 3.2 ลักษณะสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ก่อนและหลังการตรวจสอบ Bromine test

สรุปผลการตรวจสอบ

การตรวจสอบโดย bromine water เป็นการตรวจสอบสารประกอบกลุ่ม proanthocyanidins หรือ condensed tannins สารประกอบกลุ่มนี้จะเกิดตะกอนกับ bromine water ขณะที่ tannins อื่น หรือ flavonoids อื่นไม่ตกตะกอน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (Crude hexane), เอทิลอะซิเตต (Crude ethyl acetate) และเมทานอล (Crude methanol) พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน (Crude hexane) และสาร

สกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (Crude methanol) เกิดการตกตะกอนเป็นเหมือนหยดไขมันอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง (แสดงดังรูปที่ 3.2) จึงคาดว่าอาจเป็นสารประกอบกลุ่ม proanthocyanidins หรือ condensed tannins ซึ่งสารประกอบกลุ่มนี้จะเกิดตะกอนกับ bromine water และเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่มี คือ ฟลาโวนและรูทิน ปรากฏว่าเมื่อทำการตรวจสอบโดย bromine water แล้ว ไม่พบว่าสารสกัดหยาบตัวใดจะมีลักษณะการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีเช่นเดียวกันกับสารละลายมาตรฐานฟลาโวนและรูทินที่มีอยู่

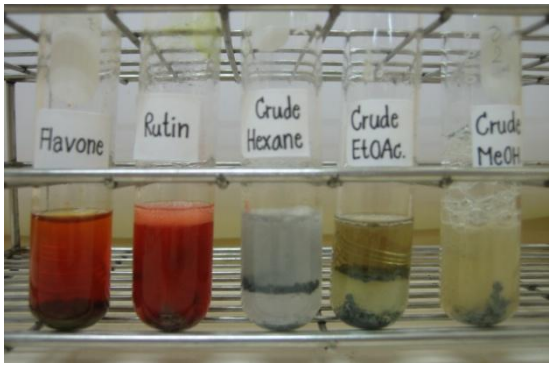
3.1.1.3 Bromine test ผลการตรวจสอบดังแสดงในตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ผลการตรวจสอบสารสำคัญกลุ่ม flavonoids ในเนื้อเจลหมากจองโดย Pew test

การทดสอบ	**สารตัวอย่าง**	**สีและการเปลี่ยนแปลงของสารตัวอย่าง**	
		ก่อนตรวจสอบ	**หลังตรวจสอบ**
Pew test	Flavone (Standard)	ใสไม่มีสี	1) เติม Zn-dust - สารละลายมีสีเทาของ Zn-dust
			2) เติม 2M HCl - สีส้มอิฐเกิดก๊าซเล็กน้อย
			3) เติม Conc. HCl - สีส้มอมเหลืองเกิดก๊าซขึ้นมาก
	Rutin (Standard)	สีเหลือง	1) เติม Zn-dust - สารละลายมีสีเทาของ Zn-dust
			2) เติม 2M HCl - สีส้มอิฐเกิดก๊าซเล็กน้อย
			3) เติม Conc. HCl - สีแดงเข้มเกิดก๊าซขึ้นมาก
	Crude hexane	สีชมพูอ่อน	1) เติม Zn-dust - สารละลายมีสีเทาของ Zn-dust
			2) เติม 2M HCl - สีเทาเกิดก๊าซเล็กน้อย
			3) เติม Conc. HCl - แยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนสีเทามีตะกอนส่วนชั้นล่างสีขาวขุ่นมีตะกอนเช่นเดียวกันเกิดก๊าซขึ้นมาก
	Crude ethyl acetate	สีเขียวคล้ำ	1) เติม Zn-dust - สารละลายมีสีเทาของ Zn-dust
			2) เติม 2M HCl - สีเขียวคล้ำเกิดก๊าซเล็กน้อย
			3) เติม Conc. HCl - แยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนสีเขียวใสมี

			ตะกอนส่วนชั้นล่างสีเขียวจางขุ่นมี ตะกอนเช่นเดียวกันเกิดก๊าซขึ้นมาก
	Crude methanol	สีน้ำตาลอ่อน	1) เติม Zn-dust - สารละลายมีสีเทาของ Zn-dust
			2) เติม 2M HCl - สีเขียวจางเกิดก๊าซเล็กน้อย
			3) เติม Conc. HCl - สีเหลืองจางเกิดก๊าซขึ้นมาก

(ก) ก่อนการตรวจสอบ



(ข) หลังการตรวจสอบ

รูปที่ 3.3 ลักษณะสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ก่อนและหลังการตรวจสอบ Pew test

สรุปผลการตรวจสอบ

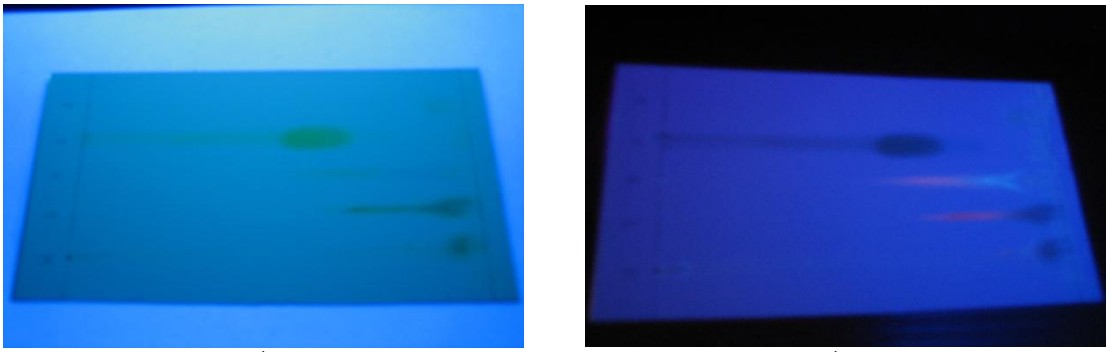
การตรวจสอบโดย Pew test เป็นการตรวจสอบสารประกอบกลุ่ม flavonoids ในสภาวะกรดและมี zinc เป็นตัว catalyst สารประกอบกลุ่ม flavonol-3-glycosides และ flavonols จะให้สีแดงเข้ม ส่วนสารประกอบกลุ่ม flavonols และ flavanones จะให้สีจาง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (Crude hexane), เอทิลอะซิเตต (Crude ethyl acetate) และเมทานอล (Crude methanol) พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน (Crude hexane) และสารสกัดหยาบเมทานอล (Crude methanol) ให้สีจาง (แสดงดังรูปที่ 3.3) จึงคาดว่าอาจเป็นสารประกอบกลุ่ม flavonols และ flavanones ซึ่งจะให้สีจางเมื่อทำการตรวจสอบโดย Pew test และเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่มี คือ ฟลาโวนและรูทิน ปรากฏว่าเมื่อทำการตรวจสอบโดย bromine water แล้ว ไม่พบว่าสารสกัดหยาบตัวใดจะมีลักษณะการเกิดปฏิกิริยากับสารเคมีเช่นเดียวกันกับสารละลายมาตรฐานฟลาโวนและรูทินที่มีอยู่

3.1.2 ผลการตรวจสอบด้วย TLC

ตำแหน่งบนแผ่น TLC (ดังรูปที่ 3.4 นับตำแหน่งจากด้านบน)

จุดที่ 1 สารละลายมาตรฐานฟลาโวน
จุดที่ 2 สารละลายมาตรฐานรูทิน
จุดที่ 3 สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองสกัดด้วยเฮกเซน
จุดที่ 4 สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต
จุดที่ 5 สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองสกัดด้วยเมทานอล

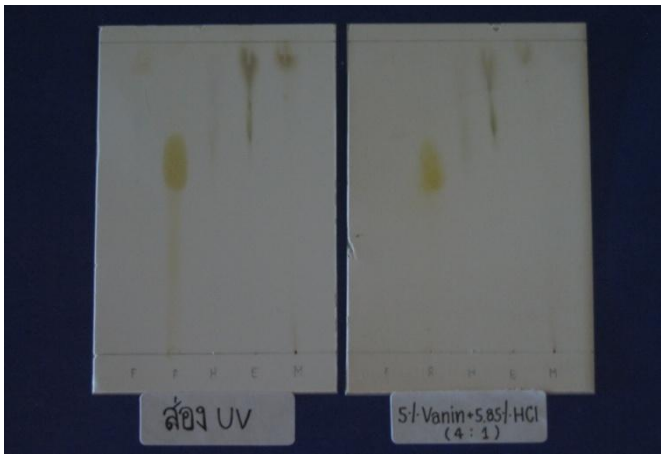
เมื่อนำแผ่น TLC ของสารละลายมาตรฐานฟลาโวนและรูทิน สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 365 นาโนเมตร พบว่าสารละลายมาตรฐานฟลาโวนไม่เกิดการเรืองแสง พบจุดสีดำ 1 ตำแหน่งแต่ไม่ชัดเจน สารละลายมาตรฐานรูทินไม่เกิดการเรืองแสง พบจุดสีดำ 1 ตำแหน่ง สารสกัดหยาบเฮกเซนพบการเรืองแสงเป็นแถบสีส้มและแถบสีเขียว สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตพบการเรืองแสงเป็นแถบสีแดงและจุดสีดำไม่เรืองแสง 1 ตำแหน่ง ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอลพบจุดสีดำไม่เรืองแสง 1 ตำแหน่ง แสดงดังรูปที่ 3.4



(ก) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ข) ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

รูปที่ 3.4 การตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

เมื่อนำแผ่น TLC ของสารละลายมาตรฐานฟลาโวนและรูทิน สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ทำการพ่นด้วยสารละลายวานิลิน-กรดเกลือแล้วนำมาตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่าก่อนพ่นและหลังพ่นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (แสดงดังรูปที่ 3.5) และเมื่อนำมาตรวจวัดด้วยแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรแถบสีได้จะมีลักษณะเช่นเดียวกันกับ TLC ก่อนพ่นด้วยสารละลายวานิลิน-กรดเกลือ (แสดงดังรูปที่ 3.4 (ข))



รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบแผ่น TLC ก่อนและหลังฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลิน-กรดเกลือ

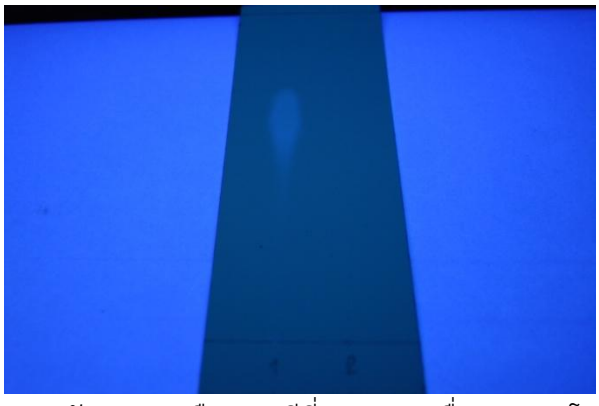
สรุปผลการตรวจสอบ

การตรวจสอบด้วย TLC สามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่าสำหรับสารประกอบกลุ่ม flavonoids ที่มีสี การตรวจสอบโดยการนำมาตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวี chalcones และ flavonols จะเกิดการเรืองแสง ส่วน flavonoids ชนิดอื่นให้จุดสีดำ จากการทดลองอาจเป็นไปได้ว่าสารละลายตัวอย่างเนื้อเจล หมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล อาจมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากว่าเมื่อนำแผ่น TLC มาทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 365 นาโนเมตร พบว่าที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนเกิดการเรืองแสงเป็นแถบสีส้มและแถบสีเขียว สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตเกิดการเรืองแสงเป็นแถบสีแดงและจุดสีดำที่ไม่เรืองแสง ส่วนสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลเกิดเป็นจุดสีดำที่ไม่เรืองแสง 1 ตำแหน่ง (แสดงดังรูปที่ 3.4) และเมื่อนำแผ่น TLC หลังพ่นด้วยสารละลายวานิลิน-กรดเกลือแล้วทำการสังเกตสีภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร แถบสีที่เกิดขึ้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงมีลักษณะเช่นเดียวกันกับรูปที่ 3.4 (ข) และอาจเป็นไปได้ว่าแถบสีแดงที่เกิดขึ้นของสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต อาจจะเป็นพวก catechins, proanthocyanidins, flavonone และ dihydroflavonols ก็ได้ เนื่องจากสารพวกนี้จะปรากฏสีม่วงหรือสีแดงขึ้นหลังจากฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลิน-กรดเกลือ จากลักษณะของผลการทดลองที่ได้จึงคาดว่าในตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองอาจมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ และจากการทดลองสามารถบอกได้ว่าในตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองไม่มีฟลาโวนอยด์กลุ่มฟลาโวนและรูทิน (flavonols) เป็นองค์ประกอบ

3.2 ผลการตรวจสอบ alkaloids จากเนื้อเจลหมากจอง

3.2.1 การตรวจสอบด้วย TLC

เมื่อนำแผ่น TLC ของสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟตและสารสกัดแอลคาลอยด์จากตัวอย่างเนื้อเจลหมากจอง ทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรพบว่าสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟตเกิดการเรืองแสงสีม่วง 1 ตำแหน่ง ส่วนสารสกัดแอลคาลอยด์จากเนื้อเจลหมากจองไม่เกิดการเรืองแสง แสดงดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 การตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟตและสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจอง

เมื่อนำแผ่น TLC ของสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟตและสารสกัดแอลคาลอยด์จากตัวอย่างเนื้อเจลหมากจอง ทำการพ่นด้วยสารละลายดราเจนดอร์ฟ พบว่าสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟตให้แถบสีส้ม 1 ตำแหน่ง ส่วนสารสกัดแอลคาลอยด์จากเนื้อเจลหมากจองไม่ปรากฏแถบสี แสดงดังรูปที่ 3.7

รูปที่ 3.7 เปรียบเทียบแผ่น TLC ก่อนและหลังฉีดพ่นด้วยสารละลายดราเจนดอร์ฟ

สรุปผลการตรวจสอบ

จากการวิเคราะห์ TLC ของสารสกัดแอลคาลอยด์จากเนื้อเจลหมากจองกับสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟตบน TLC แผ่นเดียวกัน จุดที่หนึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟต ส่วนจุดที่สองเป็นสารสกัดแอลคาลอยด์จากเนื้อเจลหมากจอง พบว่าเมื่อทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและตรวจสอบด้วยการพ่นสารละลายดราเจนดอร์ฟ ไม่พบการเรืองแสงและไม่ปรากฏแถบสีส้มของสารสกัดแอลคาลอยด์จากเนื้อเจลหมากจองเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟต ดังนั้นจึงวิเคราะห์ได้ว่าในตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองไม่มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

3.3 ผลการตรวจสอบ steroid alkaloids จากเนื้อเจลหมากจอง

3.3.1 การตรวจสอบด้วย TLC

ตำแหน่งบนแผ่น TLC

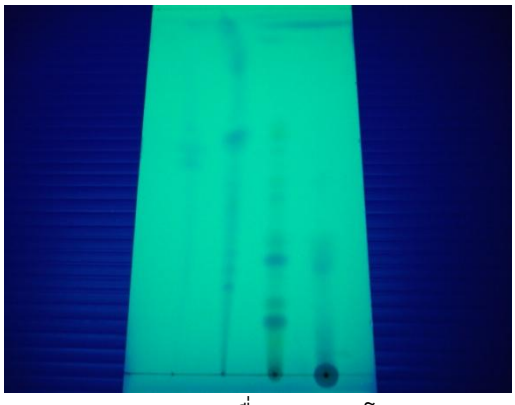
จุดที่ 1 สารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์

จุดที่ 2 สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองสกัดด้วยเฮกเซน

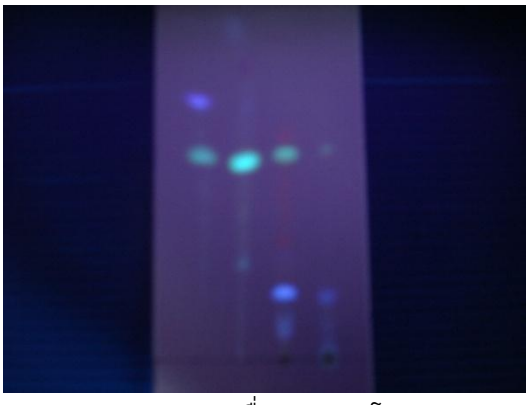
จุดที่ 3 สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต

จุดที่ 4 สารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองสกัดด้วยเมทานอล

เมื่อนำแผ่น TLC ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์และสารตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 365 นาโนเมตร พบว่าสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์เกิดการเรืองแสงสีเขียว 1 ตำแหน่งและสีม่วง 1 ตำแหน่ง สารสกัดหยาบเฮกเซนพบการเรืองแสงสีเขียว 1 ตำแหน่ง สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตพบการเรืองแสงสีเขียว 1 ตำแหน่ง สีม่วง 1 ตำแหน่งและสีส้ม 3 ตำแหน่ง ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอลพบการเรืองแสงสีเขียว 1 ตำแหน่งและสีม่วง 1 ตำแหน่ง (แสดงดังรูปที่ 3.8)



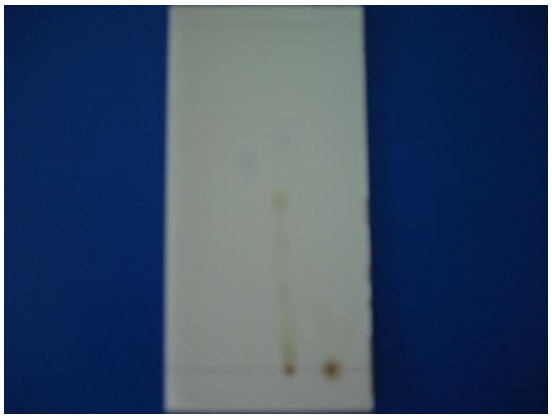
(ก) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร



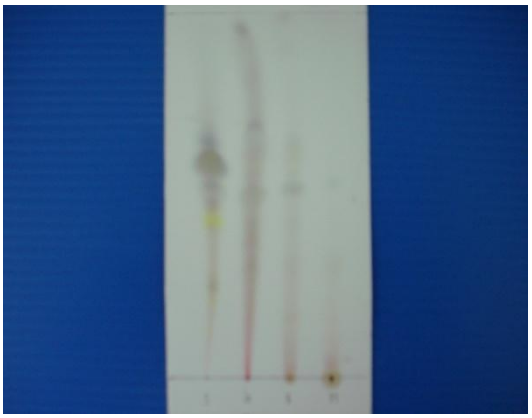
(ข) ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

รูปที่ 3.8 การตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง

เมื่อนำแผ่น TLC ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์และสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ทำการพ่นด้วยสารละลายอะนิซัลดีไฮด์-กรดซัลฟิวริก พบว่าก่อนพ่นและหลังพ่นมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น สารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ปรากฏแถบสีเหลือง 1 ตำแหน่ง สีม่วง 3 ตำแหน่ง สีน้ำตาล 1 ตำแหน่ง และสีน้ำตาลปนเขียว 1 ตำแหน่ง สารสกัดหยาบเฮกเซนปรากฏแถบสีน้ำตาลปนเขียว 1 ตำแหน่ง สีม่วง 2 ตำแหน่ง สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตปรากฏแถบสีน้ำตาลปนเขียว 1 ตำแหน่ง และสารสกัดหยาบเมทานอลปรากฏแถบสีน้ำตาลปนเขียวเช่นเดียวกันแต่ไม่ชัดเจน (แสดงดังรูปที่ 3.9)



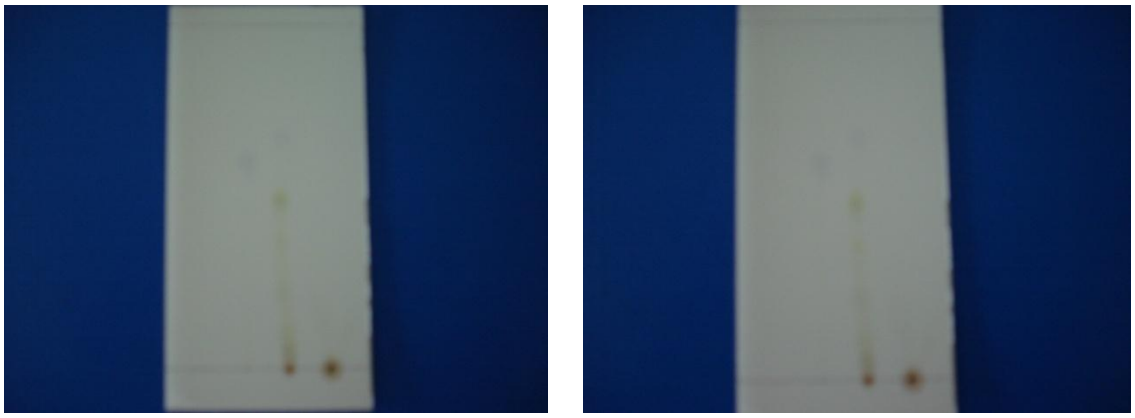
(ก) ก่อนพ่นสารละลายอะนิซัลดีไฮด์-กรดซัลฟิวริก



(ข) หลังพ่นสารละลายอะนิซัลดีไฮด์-กรดซัลฟิวริก

รูปที่ 3.9 เปรียบเทียบแผ่น TLC ก่อนและหลังฉีดพ่นด้วยสารละลายอะนิซัลดีไฮด์-กรดซัลฟิวริก

เมื่อนำแผ่น TLC ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์และสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ทำการพ่นด้วยสารละลายวานิลิน-กรดซัลฟิวริก พบว่าก่อนพ่นและหลังพ่นไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (แสดงดังรูปที่ 3.10)



(ก) ก่อนพ่นสารละลายวานิลิน-กรดซัลฟิวริก (ข) หลังพ่นสารละลายวานิลิน-กรดซัลฟิวริก

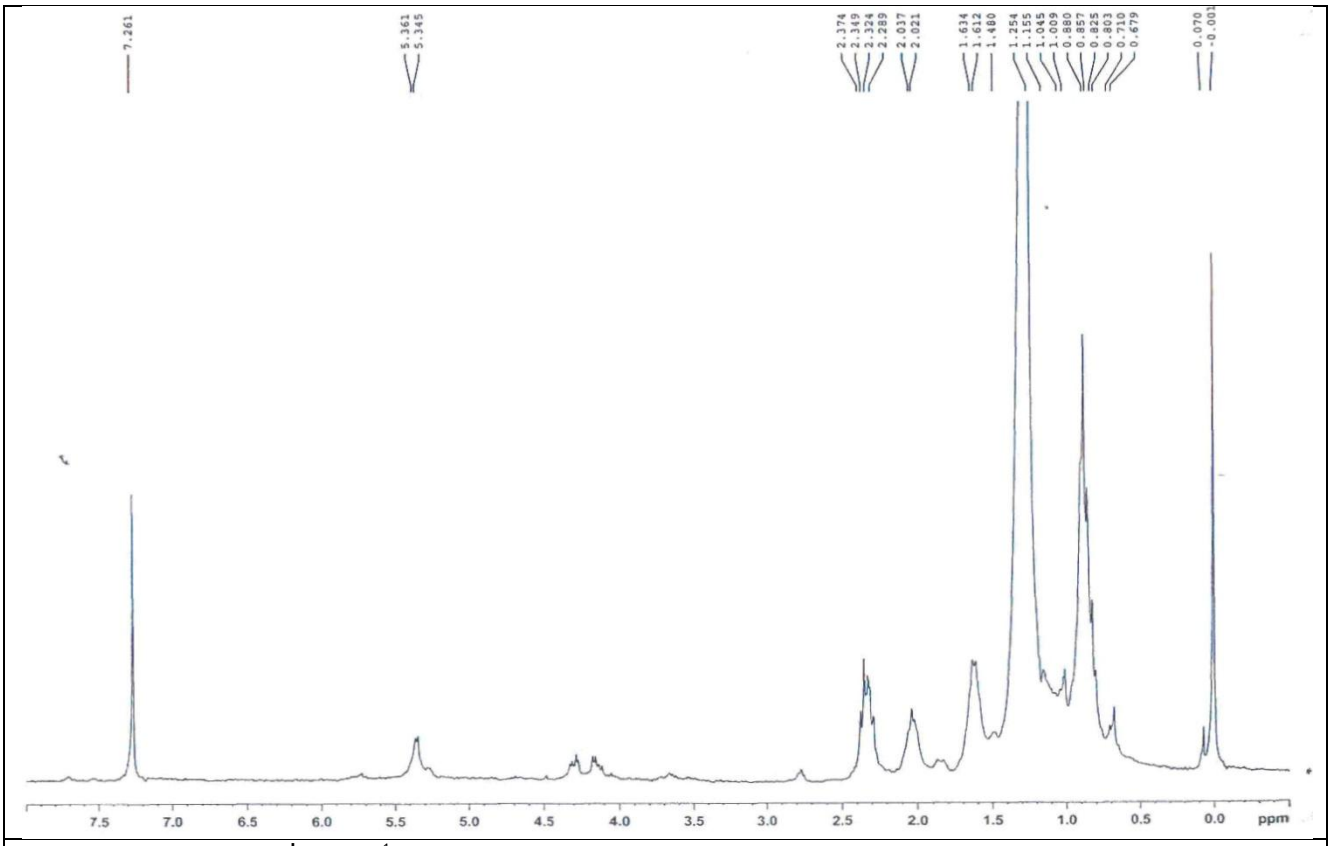
รูปที่ 3.10 ลักษณะแผ่น TLC ก่อนและหลังฉีดพ่นด้วยด้วยสารละลายวานิลิน-กรดซัลฟิวริก

สรุปผลการตรวจสอบ

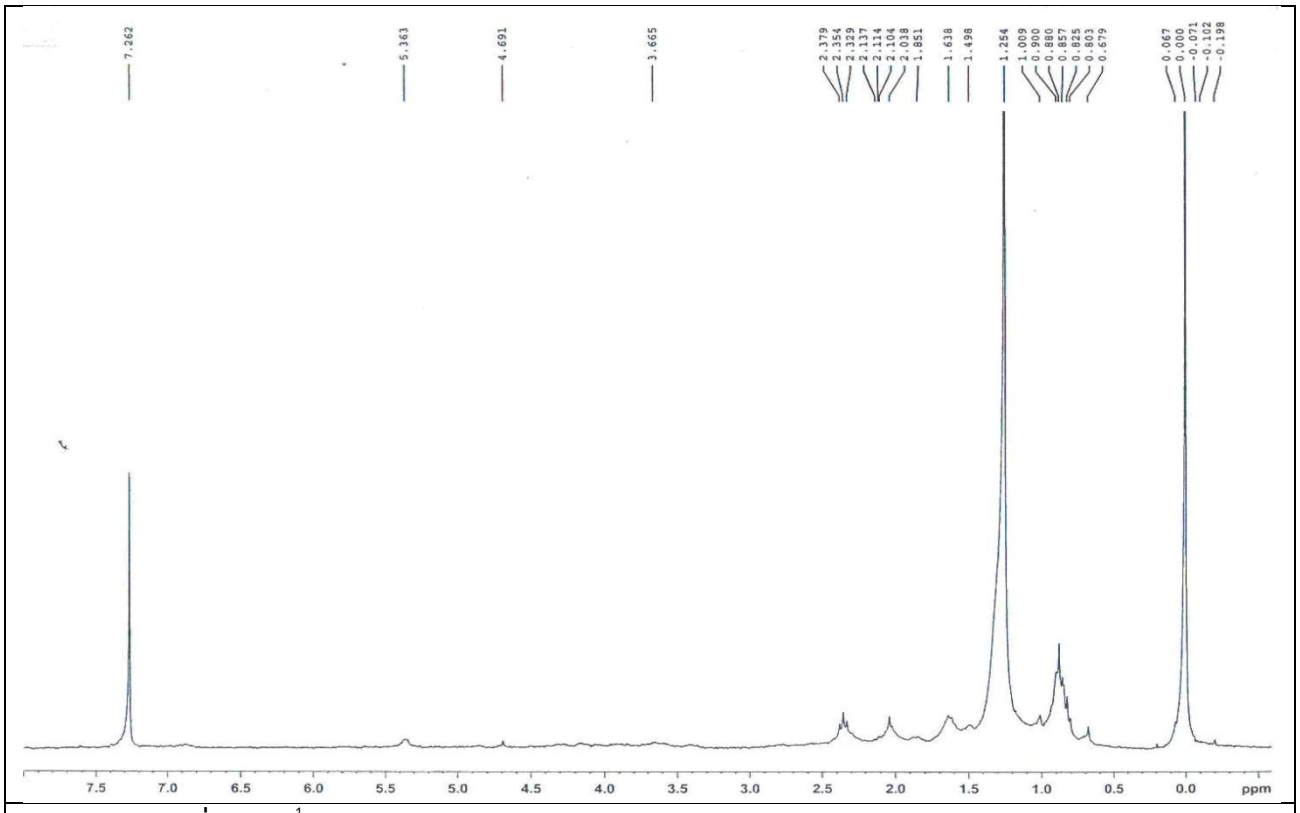
จากการทดลองทาง TLC เพื่อหาสเตอรอยด์จากสารละลายตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล พบว่าเมื่อนำไปทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 365 นาโนเมตรปรากฏจุดเรืองแสงสีเขียวที่เคลื่อนที่เป็นระยะทางใกล้เคียงกันมากทั้ง 4 ตำแหน่ง (แสดงดังรูปที่ 3.10) และเมื่อพ่นด้วยสารละลายอะนิซัลดีไฮด์-กรดซัลฟิวริก พบว่าตรงตำแหน่งที่เรืองแสงดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนแปลงเหมือนกันคือปรากฏเป็นแถบสีน้ำตาลปนเขียวเหมือนกันทั้ง 4 ตำแหน่ง ดังนั้นจึงคาดว่าในตัวอย่างเนื้อเจลหมากจองอาจมีสารกลุ่มสเตอรอยด์เป็นองค์ประกอบ

3.4 ผลการตรวจสอบสารสกัดหยาบเบื้องต้นโดยเทคนิค ^{1}H-NMR สเปกโตรสโกปี (Preliminary screening of crude extracts by ^{1}H-NMR spectroscopy)

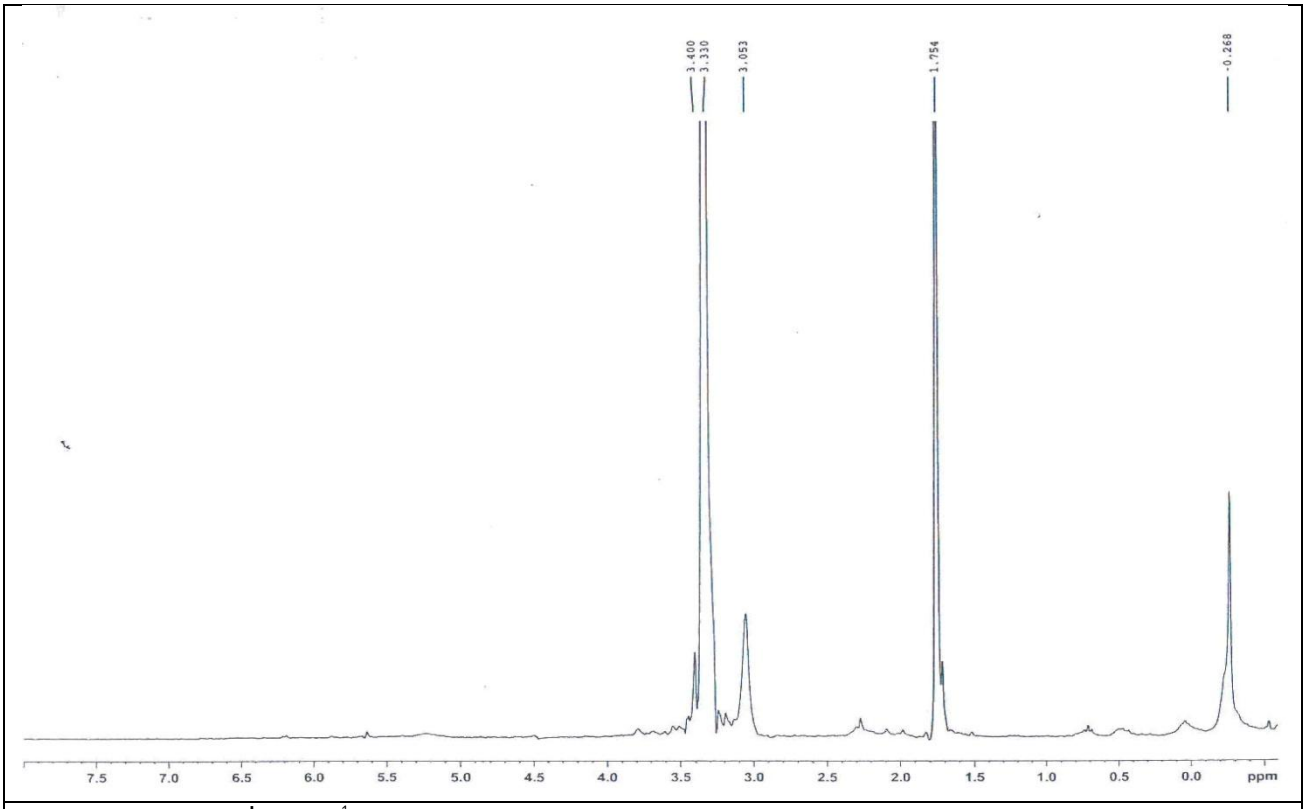
ผลการวิเคราะห์ ^{1}H-NMR พบสเปกตรัมที่ได้จากสารสกัดหยาบเบื้องต้นของทั้ง 3 ตัวทำละลาย ได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน (crude hexane) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (crude ethyl acetate) และสารสกัดหยาบเมทานอล (crude methanol) ว่ามีองค์ประกอบใดบ้าง แสดงดังรูปที่ 3.11, 3.12 และ 3.13



รูปที่ 3.11 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบเฮกเซน (Crude hexane)



รูปที่ 3.12 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (Crude ethyl acetate)



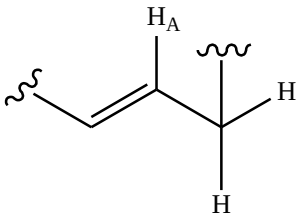
รูปที่ 3.13 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบเมทานอล (Crude methanol)

สรุปผลการตรวจสอบ

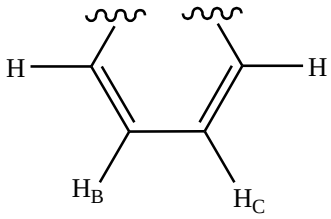
ข้อมูล ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบเฮกเซน พบว่า

ที่ค่า δ : 5.35 ppm มีลักษณะเป็น doublet มีพื้นที่ใต้พีกเป็น 1 โปรตอน และเป็นสัญญาณของโปรตอน H_A บนคาร์บอนไม่อิ่มตัว น่าจะเป็นพันธะคู่

$\therefore$ โครงสร้างย่อยที่สามารถเป็นไปได้ คือ



ที่ค่า δ : 4.10-4.35 ppm มีลักษณะเป็น doublet of doublet 2 สัญญาณ มีพื้นที่ใต้พีกเป็น 1 โปรตอน ที่ให้ค่าเคมิคอลชิฟท์ใกล้เคียงกัน เป็นสัญญาณโปรตอนที่เกาะอยู่บนคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัว คือ H_B และ H_C ซึ่งมีลักษณะเป็น vicinal proton และมีโปรตอนข้างเคียง 1 โปรตอน คาดว่าน่าจะมีโครงสร้างย่อยดังนี้

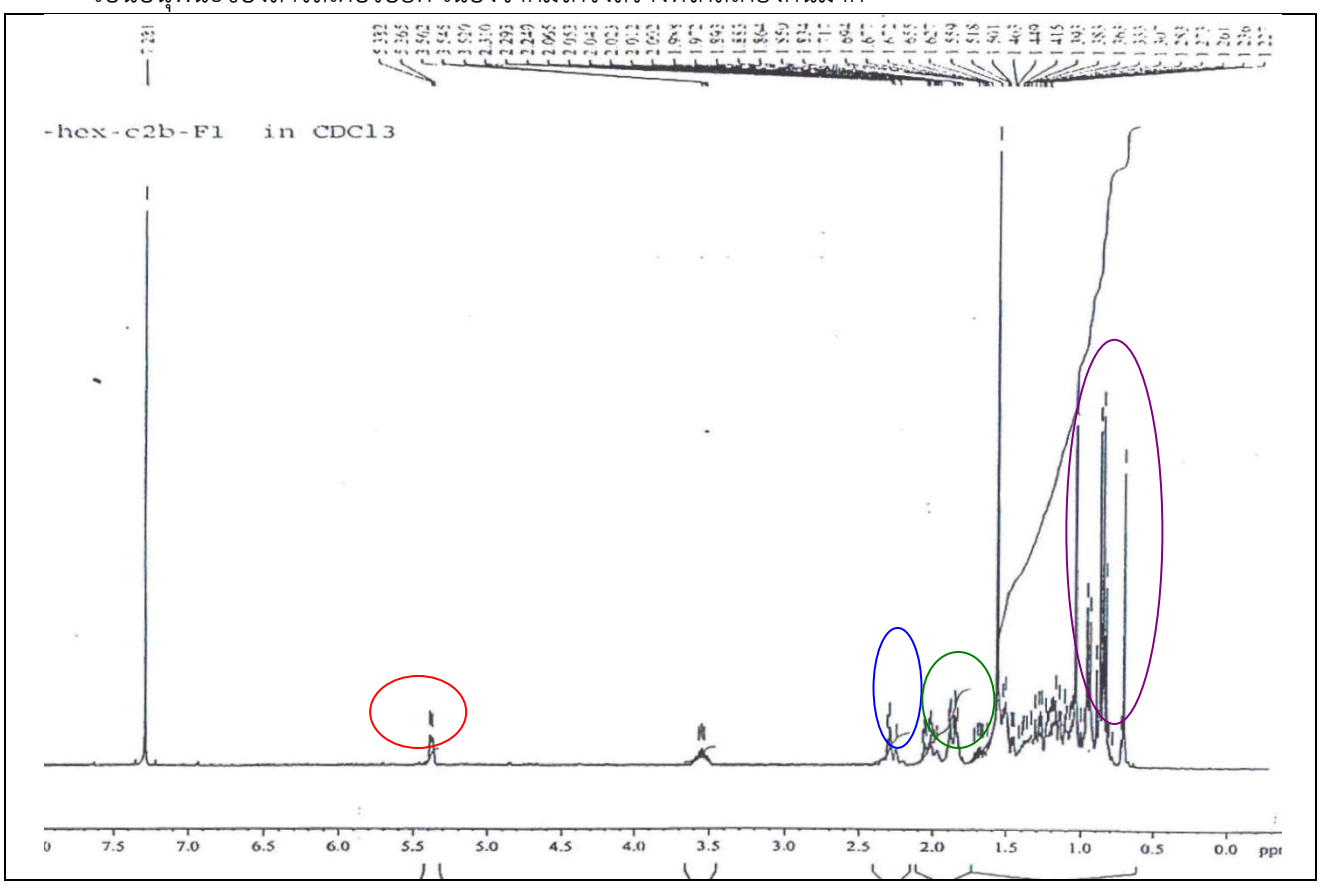


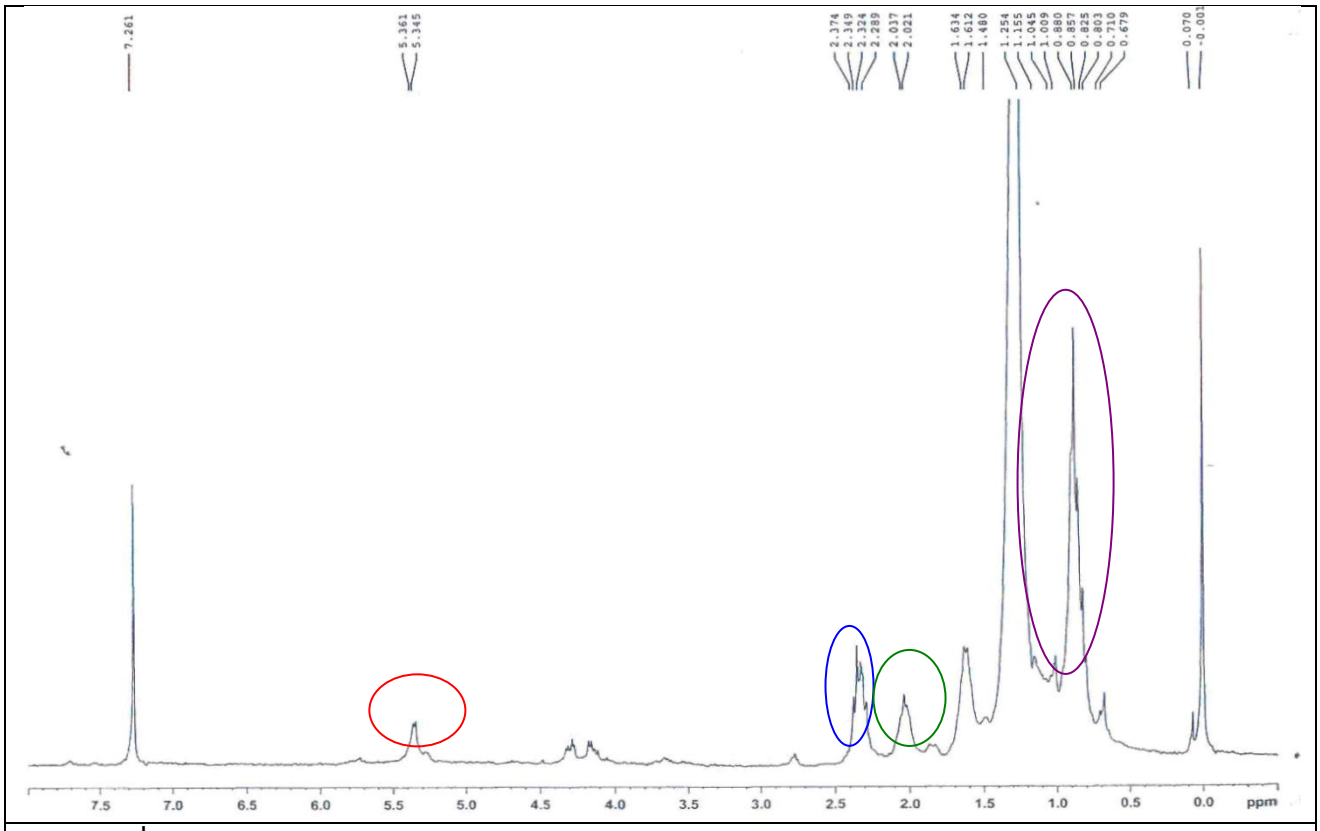
ส่วนช่วงค่า δ : 2.5-0.5 ppm น่าจะเป็นกลุ่มโปรตอนของ methane proton (-CH), methylene proton (-CH_2) และ methyl proton (-CH_3) แต่สเปคตรัมที่ได้ค่อนข้างกว้างเนื่องจากมีโปรตอนซ้อนทับกันหลายตัว จึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างชัดเจน

จากการเปรียบเทียบสเปคตรัมของสารสกัดหยาบเฮกเซนกับสารมาตรฐานสเตอรอยด์ (β-Sitosterol) จะเห็นได้ว่าพีกจะให้ช่วงเคมิคัลชิฟท์ที่ใกล้เคียงกันหลายตำแหน่ง (แสดงดังในรูปที่ 3.14) ดังนั้นในสารสกัดหยาบเฮกเซนน่าจะมีสารหลักเป็นสารในกลุ่มของสเตอรอยด์

สำหรับสเปกตรัมของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบเฮกเซน น่าจะมีสารหลักเป็นสเตอรอยด์เช่นเดียวกัน และสเปกตรัมของสารสกัดหยาบเมทานอล ไม่ปรากฏพีกชัดเจน พบเพียงพีกของตัวทำละลายเท่านั้น

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าส่วนสเปกตรัมของสารสกัดหยาบเฮกเซนและเอทิลอะซิเตตน่าจะมีสารหลักเป็นอนุพันธ์ของสารสเตอรอยด์ เนื่องจากมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกันมาก





รูปที่ 3.14 เปรียบเทียบสเปกตรัมของสารมาตรฐานสเตอรอยด์และสเปกตรัมของสารสกัดหยาบเฮกเซน

3.5 ผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดด้วยสารสกัดจากส่วนประกอบต่างๆ ของหมากจอง

3.5.1 สารสกัดจากใบหมากจอง เปลือกเมล็ดหมากจอง และเนื้อในของเมล็ดหมากจอง

พบว่าสารสกัดด้วยน้ำกลั่นจากส่วนใบหมากจอง เปลือกเมล็ดหมากจอง และเนื้อในของเมล็ดหมากจองไม่แสดงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบคือ ไม่พบ clear zone รอบบริเวณที่วาง paper disc และได้หยดสารสกัดลงไป

3.5.2 วุ้นหมากจอง

ส่วนประกอบที่เป็นวุ้นของหมากจองสายพันธุ์ภูจองและมุกดาหารที่ยังไม่ได้เจือจางสามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 DMST 8840 และ *B. cereus* ได้ดังแสดงในตารางที่ 3.4 คือ วุ้นจากหมากจองสายพันธุ์ภูจองทำให้เกิดโซนใส 11.5 มม รอบโคโลนีของ *S. aureus* ATCC 25923 DMST 8840 วุ้นจากสายพันธุ์ภูจองและมุกดาหารทำให้เกิดโซนใส 9.5 มม และ 16.5 มม ตามลำดับ รอบโคโลนีของ *B. cereus* ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียสองชนิดไปทดสอบในขั้นต่อไป

จากการทดสอบแบคทีเรียที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} ถึง 10^{-8} พบว่า ระดับของเชื้อที่แสดงให้เห็นผลของโซนใสที่เกิดการยับยั้งได้คือ 10^{-3} ถึง 10^{5} ของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 DMST 8840, 10^{-3} ถึง 10^{-6} ของเชื้อ *S. aureus* (ภาควิชาฯ), 10^{-3} ถึง 10^{-4} ของเชื้อ *B. cereus* (ภาควิชาฯ) ดังตารางที่ 3.5

เมื่อทดสอบด้วยแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ด้วยวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจองและมุกดาหารที่ไม่เจือจาง (1 เท่า) และเจือจาง 1 /2, 1/ 4, 1/8, 1/16 พบว่าเกิดการยับยั้งได้ตามตารางที่ 3.6 คือ

S. aureus ATCC 25923 DMST 8840 ที่ระดับความเจือจางของเชื้อ 10^{-2} ในสภาพที่มีวุ้นของหมากจองสายพันธุ์มุกดาหารที่ระดับความเจือจาง 1 เท่า และ 1/2 เท่า สามารถทำให้เกิดโซนของการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ชัดเจน แต่ภายในโซนนั้นเชื้อจุลินทรีย์ยังสามารถเจริญได้ โดยโคโลนีมีขนาดเล็กลงกว่าโคโลนีที่เจริญอยู่นอกโซน และสารละลายวุ้นหมากจองระดับเจือจาง 1/4 และ 1/8 เท่า ก็สามารถแสดงโซนใสให้เห็นได้ แต่การเจริญของเชื้อในบริเวณโซนนั้นมีมากกว่าระดับความเจือจาง 1 เท่า และ 1/2 เท่า (ภาพที่ 3.15) เมื่อเปรียบเทียบวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจองและมุกดาหาร จะเห็นได้ว่าบริเวณโซนของการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ระดับความเจือจาง 1, 1/2, 1/4 และ1/8 เท่า จะทำให้โคโลนีที่เจริญอยู่ในโซนนั้นมีขนาดเล็กลงและอยู่กระจายห่างกันมากกว่าโคโลนีที่อยู่นอกบริเวณโซน (ภาพที่ 3.16)

S. aureus ATCC 25923 DMST 8840 ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} ที่ทดสอบด้วยสารละลายวุ้นหมากจองสายพันธุ์มุกดาหารที่ระดับความเจือจาง 1 เท่า และ 1/2 เท่า พบว่าเชื้อเจริญได้ในบริเวณโซนแต่โคโลนีจะเล็กลงมากกว่านอกโซน ส่วนสารละลายวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจองนั้นจะเห็นบริเวณโซนได้ชัดเจนเฉพาะระดับความเจือจาง 1 เท่า และยังคงมีเชื้อเจริญได้ในโซนแต่ลักษณะโคโลนีจะเล็กลงมากกว่านอกบริเวณโซนอย่างชัดเจน (ภาพที่ 3.17 และ 3.18)

B. cereus ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ที่ทดสอบด้วยสารละลายวุ้นหมากจองทั้งสองสายพันธุ์คือภูจองและมุกดาหารนั้น พบว่ามีการยับยั้งได้อย่างชัดเจน โดยไม่พบว่ามีเชื้อเจริญเลย (ภาพที่ 3.19) ส่วนที่ระดับความเจือจางของเชื้อ 10^{-2} สารละลายวุ้นหมากจองทั้งสองสายพันธุ์คือ ภูจองและมุกดาหารไม่แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ *B. cereus*

ตารางที่ 3.4 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดย *E. coli* ของวุ้นหมากจองแต่ละสายพันธุ์

เชื้อ	**การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของวุ้นหมากจอง (50 µl) แต่ละสายพันธุ์ (เส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส, mm)***			
	ลาว	**จันทบุรี**	**ภูจอง**	**มุกดาหาร**
E. coli (ภาควิชาฯ)	0	0	0	0
Staphylococcus aureus (ภาควิชาฯ)	0	0	0	0
S. aureus ATCC 25923 DMST 8840	0	0	0	**11.5**
Bacillus cereus (ภาควิชาฯ)	0	0	**9.5**	**16.5**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 DMST 4739	0	0	0	0
Salmonella enteritidis DMST 15676	0	0	0	0
C. albicans	0	0	0	0
C. tropicalis	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ภายในบริเวณที่ยับยั้งเชื้อสามารถเจริญได้แต่ขนาดของโคโลนีเล็กลงและกระจายห่างกันมากกว่ารอบนอก

ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจสอบผลได้เพราะเชื้อเจริญได้น้อย

ภาพที่ 3.15 การเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 DMST 8840 ที่ระดับเจือจาง 10^{-2} ด้วยวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจอง (ขวา) และ มุกดาหาร (ซ้าย) ที่ระดับความเจือจาง 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16

ตารางที่ 3.5 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดย *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* และ *B. cereus* ของวุ้นหมากจองแต่ละสายพันธุ์

เชื้อ/ระดับความเจือจาง	**การยับยั้งจุลินทรีย์ของวุ้นหมากจอง (100 µl) แต่ละสายพันธุ์ (เส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส, mm)***			
	ลาว	**จันทบุรี**	**ภูจอง**	**มุกดาหาร**
S. aureus ATCC 25923 10^{-3}	13.7	0	18	17.5
10^{-4}	15	0	16.3	18.3
10^{-5}	14.3	0	15.7	18
10^{-6}	ND	ND	ND	ND
10^{-7}	ND	ND	ND	ND
10^{-8}	ND	ND	ND	ND
S. aureus (ภาควิชาฯ) 10^{-3}	15	0	18	17.3
10^{-4}	13.3	0	13.7	15.3
10^{-5}	14.3	0	16.7	1
10^{-6}	12.7	0	19.3	19
10^{-7}	ND	ND	ND	ND
10^{-8}	ND	ND	ND	ND
B. cereus (ภาควิชาฯ) 10^{-3}	9.3	0	18.5	16.7
10^{-4}	11	0	18	15
10^{-5}	ND	ND	ND	ND
10^{-6}	ND	ND	ND	ND
10^{-7}	ND	ND	ND	ND
10^{-8}	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ภายในบริเวณที่ยับยั้งเชื้อสามารถเจริญได้แต่ขนาดของโคโลนีเล็กลงและกระจายห่างกันมากกว่ารอบนอก

ND หมายถึง ไม่สามารถตรวจสอบผลได้เพราะเชื้อเจริญได้น้อย

ตารางที่ 3.6 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจองและมุกดาหาร

เชื้อ/ระดับเจือจาง	ระดับความเจือจางวุ้นหมากจอง	การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของวุ้นหมากจอง (100 µl) แต่ละสายพันธุ์ (เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส, mm)*	
		ภูจอง	มุกดาหาร
S. aureus ATCC 25923 DMST 10^{-2}	1	21.7	20
	1/2	18.3	16.3
	1/4	16.3	15.7
	1/8	12	17.7
	1/16	0	0
S. aureus ATCC 25923 DMST 10^{-3}	1	22.3	21
	1/2	17.7	16.3
	1/4	15.3	16.3
	1/8	14.5	16.3
	1/16	0	0
S. aureus (ภาควิชาฯ) 10^{-2}	1	21.3	19.3
	1/2	19.3	16.3
	1/4	18	15
	1/8	16.7	16.5
	1/16	0	0
S. aureus (ภาควิชาฯ) 10^{-3}	1	22	20
	1/2	19	15
	1/4	18	15.3
	1/8	17.3	15.7
	1/16	0	0
B. cereus (ภาควิชาฯ) 10^{-1}	1	12.7	15.7
	1/2	12.7	13
	1/4	10.3	10.3
	1/8	9	8.3
	1/16	0	0
B. cereus (ภาควิชาฯ) 10^{-2}	1	0	0
	1/2	0	0
	1/4	0	0
	1/8	0	0
	1/16	0	0

หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ภายในบริเวณที่ยับยั้งเชื้อสามารถเจริญได้แต่ขนาดของโคโลนีเล็กลงและกระจายห่างกันมากกว่ารอบนอก บริเวณโซนในระดับความเจือจางมากจะมีเชื้อเจริญมากขึ้นกว่าระดับความเจือจางที่น้อย

ภาพที่ 3.16 การเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 DMST 8840 ที่ระดับเจือจาง 10^{-3} ด้วยวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจอง (ซ้าย) และ มุกดาหาร (ขวา) ที่ระดับความเจือจาง 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16

ภาพที่ 3.17 การเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* (ภาควิชาฯ) ที่ระดับเจือจาง 10^{-2} ด้วยวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจอง (ซ้าย) และ มุกดาหาร (ขวา) ที่ระดับความเจือจาง 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16

ภาพที่ 3.18 การเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* (ภาควิชาฯ) ที่ระดับเจือจาง 10^{-3} ด้วยวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจอง (ขวา) และมุกดาหาร (ซ้าย) ที่ระดับความเจือจาง 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16

ภาพที่ 3.19 การเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของ *B.cereus* (ภาควิชาฯ) ที่ระดับเจือจาง 10^{-1} ด้วยวุ้นหมากจองสายพันธุ์ภูจอง (ซ้าย) และ มุกดาหาร (ขวา) ที่ระดับความเจือจาง 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเนื้อเจลหมากจองโดยใช้เทคนิคต่างๆ คือ การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสี การวิเคราะห์แถบสีบน TLC และการทดสอบทางสเปคโตรสโกปี พบว่าเนื้อเจลหมากจองมีองค์ประกอบเคมีเป็นกลุ่มสารที่มีความสำคัญทางเภสัชวิทยา คือ สเตอรอยด์ (steroid) โดยจากการวิเคราะห์แถบสีบน TLC พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน, สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และสารสกัดหยาบเมทานอล ให้แถบเรืองแสงที่ตรงกับสารมาตรฐานสเตอรอยด์ และจากการทดสอบด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR สเปกโตรสโกปี พบว่าสเปกตรัม ^{1}H-NMR ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตใกล้เคียงกับสารมาตรฐานสเตอรอยด์

วุ้นจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่พองตัวในน้ำกลั่นของหมากจองสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ที่ใช้ในการทดสอบได้บางชนิด คือ 1) *Staphylococcus aureus* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และสายพันธุ์จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และ 2) *Bacillus cereus* สายพันธุ์จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) คือ 1) *E.coli,* 2) *Pseudomonas aeruginosa,* 3) *Salmonella enteritidis* รวมทั้งไม่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ก่อโรคที่ทดสอบ คือ *Candida tropicalis* และ *C. albicans*

จากการตรวจเอกสารในขณะนี้ ยังไม่พบรายงานตีพิมพ์ทางวิทยาศาสตร์ที่สอดคล้องหรือขัดแย้งกับผลเบื้องต้นที่ได้จากงานวิจัยนี้ อย่างไรก็ดี ในตำราแพทย์แผนไทยหรือตำราสมุนไพรระบุว่า เนื้อผลที่พองตัวของหมากจองใช้เป็นยาแก้ไอ แก้ร้อนใน [16-18] รวมทั้งใช้รักษาอาการท้องเสีย แก้ไอและแก้เจ็บคอใน Tropical Asia [19] ซึ่งสอดคล้องกับผลจากงานวิจัยนี้ที่พบว่าวุ้นหมากจองสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของการอักเสบและยับยั้ง *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของอาหารเป็นพิษได้ และตรงกันกับที่ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล รายงานว่า ในประเทศอินเดีย สามารถใช้สำรองรักษาอาการอักเสบ แก้ไข้และขับเสมหะ ในประเทศจีน ฮ่องกง และไต้หวัน นิยมใช้สำรองร่วมกับชะเอมต้มกับน้ำ แล้วนำมาจิบบ่อย ๆ เพื่อแก้อาการเจ็บคอ [20]

งานวิจัยด้านเภสัชศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหมากจองคือ มีการทดสอบอิทธิพลของผงแห้งของหมากจองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูแรท [21] ด้านป่าไม้พบว่าเนื้อไม้ของหมากจอง *(Scaphium affine)* มีสารต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี ทำให้เนื้อไม้ทนทานต่อการถูกจุลินทรีย์ย่อยสลายในน้ำทะเล [22] ด้านพฤกษศาสตร์ มีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหมากจองเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจากปีกของผลและเมล็ดอ่อน รวมทั้งการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหมากจองด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA [23] ด้านอุตสาหกรรมอาหารได้มีการใช้ลูกสำรองทดแทนไขมันในแพตตี้เนื้อวัว [24] การใช้ลูกสำรองปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู [25]

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการแยกสารให้บริสุทธิ์เพื่อจะได้ทราบถึงสูตรโครงสร้างของสเตอรอยด์ในสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และจะได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] การประชุมวิชาการเภสัชศาสตร์, ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร, มหาวิทยาลัยรังสิต, 2546.

[2] http://www.manager.co.th/local/viewNew.asp?newsid

[3] P.Somboonpanyakul et al., Malva nut gum. (Part 1) : Extraction and physicochemical characterization, 2005.

[4] http://www.dnp.go.th/EPAC/Herb/17pungtalay.htm

[5] Hayman, A.R., D.O. Gray and S.D. Elliott. 1998. Isolation of histamine from the fruits of Sterculia sphigera. Fitoterapia. 59(4): 338.

[6] Itokawa, H., F. Hirayama, S. Tsuruoka, K. Mizuno, K. Takeya and A. Nitta. 1990. Screening test for antitumor activity of crude drugs. Studies on antitumor activity of Indonesian medicinal plants. Shoyakugaku Zasshi.44(1):58-62.

[7] Jantan, I.B., Y.H. Kang, D.Y. Suh and B.H. Han. 1996. Inhibitory effects of Malaysian medicinal plants. On the platelet-activating factor (PAF) receptor binding. Nat. Prod Sci. 2(2) :86-89.

[8] รัตนา อินทรานุปกรณ์. การตรวจสอบและการแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

[9] ชวลิต สิทธิสมบัติ. สารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2537.

[10] เอื้อมพร วีสมหมาย และปณิธาน แก้วดวงเทียน. 2547. ไม้ป่ายืนต้นของไทย. โรงพิมพ์ เอช เอ็น กรุ๊ป จำกัด. กรุงเทพ. 652 หน้า.

[11] (http://www.nafri.org.la/documents/NTFPNews/sample_profile/Scaphium_macropodium_MALVANUT.pdf)

[12] He, S.-A. and N. Sheng. Utilization and conservation of medicinal plants in China with special to Atraylodes lancea. http://www.fao.org/docrep/W7261E/W7261el3.htm

[13] Watson and Dallwitz. http://biodiversity.uno.edu/delta/angio/ww/sterculi.htm. The families of floworing plants.

[14] Vardamides, J.C., A.G.B. Azebaze, A.E. Nkengfack, F.R. Van Heerden, Z.T. fomun, T.M. Ngando. J Conrad, B. Vogler and W.Kraus. 2003. Scaphopetalone and scapphopetalumate, a lignan and a triterpene ester from *Scaphopetalum thenneri*. Phytochemistry. 62:647-650.

[15] Das, A.B., A.K. Mukherjee and P. Das. 2001. Molecular phylogeny of Heritter Aiton (Sterculiacee), a tree mangrove: variations in RAPD markers and nuclear DNA content. Batonical Journal of the Linnean Society. 136:221-229.

[16] http://www.pixart.com/ archives/herb/09-2.html

[17] www.rit.ac.th

[18] www.se-ed.net

[19] www.fao.org/ DOCREP/005/AB598E/AB598E16.htm

[20] http://medplant.mahidol.ac.th/pharm/search.asp

[21] Khayungarnnawee, Amonrat, Wipaporn Phatvej, Tuanta Sematong, Chantara Phoonsiri, Siripen Jarikasem และ Taweesak Suntorntanasat. 2548. Immunostimulant activity of dried powder of *Scaphium scaphigerum* (G. don) Guib & Planch in rats. ไทยเภสัชสาร (The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences) 29 ฉบับเสริม (ธ.ค.) : 89.

[22] www.irg-wp.com/documents /2005/IRG36Abstracts.pdf

[23] สุจารี ขัมภรัตน์. 2549. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการศึกษาความหลกาหลายทางพันธุกรรมของหมากจอง *Scaphium macropodum* Beaum. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

[24] วิจุฑา อรุณดำรงโรจน์. บุปผชาติ นุตาลัย และประภาศรี เทพรักษา. 2549. การใช้ลูกสำรองทดแทนไขมันในแพตตี้เนื้อวัว. การประชุมสัมมนาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 8 : วัตกรรมทางอาหาร. ศูนย์ประชุมไบเทค บางนา.

[25] เกวลิน วรพณิชยพงษ์, ยุพเรส ไกรทอง และประภาศรี เทพรักษา. 2549. การใช้ลูกสำรองปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู. การประชุมสัมมนาวิชการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 8 : นวัตกรรมทางอาหาร. ศูนย์ประชุมไบเทค บางนา.