



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคเคมีสีเขียว

Development of extraction method for active compounds from
Mitragyna speciosa leaves using green chemistry technique

โดย

นสภ. มารินา ไคนากะ	รหัส 61210036
นสภ. วาสิตา อินทนาศักดิ์	รหัส 61210039
นสภ. สิริภัทร น้อยนารถ	รหัส 61210084

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2565

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ก

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคเคมีสีเขียว

Development of extraction method for active compounds from
Mitragyna speciosa leaves using green chemistry technique

โดย

นสภ. มารินา โคนากะ	รหัส 61210036
นสภ. วาสิตา อินทนาศักดิ์	รหัส 61210039
นสภ. สิริภัทร น้อยนารถ	รหัส 61210084

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2565

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานประกอบโครงงานวิจัยเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของรายวิชาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 (Research Project in Pharmaceutical Sciences II) รหัสวิชา 791591 มีขอบเขตการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการวางแผนการวิจัย การเขียนโครงร่างงานวิจัย และการนำเสนอโครงร่างงานวิจัย สำหรับนิสิตเภสัชศาสตร์ชั้นปีที่ 5 สาขานั่นอุตสาหกรรม โดยคณะผู้จัดทำสนใจศึกษาการพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคเคมีสีเขียว โดยใช้ตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs) เนื่องจากเป็นวิธีการสกัดที่มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษหรือก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตและสิ่งแวดล้อม โดยการเลือกตัวทำละลายที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะแต่เพิ่มประสิทธิภาพและศักยภาพของกระบวนการสกัด แต่ทั้งนี้ในปัจจุบันยังมีการศึกษาการสกัดพืชกระท่อมด้วยวิธีนี้น้อยมาก

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานประกอบโครงงานวิจัยเล่มนี้จะเป็นข้อมูลสนับสนุนการศึกษาพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพที่ดี มีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมในระดับสูงขึ้นไป และเป็นประโยชน์ เพื่อนำไปใช้ในการต่อยอดหรือพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ในอนาคต

คณะผู้วิจัย

นสภ. มารินา ไคนากะ รหัส 61210036

นสภ. วาสิตา อินทนาศักดิ์ รหัส 61210039

นสภ. สิริภัทร น้อยนารถ รหัส 61210084

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ปีการศึกษา 2565

เรื่อง การพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคเคมีสีเขียว

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. มาริษา ไคนากะ รหัส 61210036
2. นสภ. วาสิตา อินทนาศักดิ์ รหัส 61210039
3. นสภ. สิริภัทร น้อยนารถ รหัส 61210084

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญ.ศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์ (ที่ปรึกษาหลัก)
2. ญ.ศ.ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวิระ (ที่ปรึกษาร่วม)

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญไมทราไจนีนจากพืชใบกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) โดยเทคนิคเคมีสีเขียว ด้วยตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs) แบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การสกัดแยกสารไมทราไจนีนให้บริสุทธิ์ และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย DESs จากการศึกษาการสกัดแยกสารไมทราไจนีน พบว่าสามารถสกัดแยกสารกลุ่มแอลคาลอยด์ที่เป็นอนุพันธ์ไมทราไจนีน เมื่อนำไปสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC ได้น้ำหนัก 3.1 มิลลิกรัม (1.25%) พบว่าเกิดการสลายตัวอันเนื่องมาจากความร้อนในกระบวนการทำตัวอย่างให้แห้งจึงไม่สามารถสกัดแยกสารไมทราไจนีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด 5 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด, อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย, ปริมาณน้ำ, อุณหภูมิ และเวลาในการสกัด พบว่า ตัวทำละลาย DESs ยังมีความสามารถในการสกัดสารได้ไม่เทียบเท่าตัวทำละลายดั้งเดิม (methanol) และจากการเลือกใช้ตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3) มาเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการปรับเปลี่ยนปัจจัยอื่น ๆ พบว่า ปัจจัยอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายส่งผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพในการสกัด โดยยิ่งอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายมีค่ามากขึ้น ปริมาณสารสกัดที่ได้จะมากขึ้นตาม และพบว่าปัจจัยปริมาณน้ำและอุณหภูมิไม่ได้ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการสกัด แต่หากใช้ระยะเวลาการสกัดที่นานเกินไปอาจส่งผลให้โครงสร้างของสารเกิดการสลายตัวได้

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ญ.ศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์

Senior Project Academic Year 2022

: Development of extraction method for active compounds from
Mitragyna speciosa leaves using green chemistry technique

By

1. Miss Marina Konaka ID 61210036
2. Miss Vasita Intanasak ID 61210039
3. Miss Siripat Noynart ID 61210084

Advisor:

1. Assist. Prof. Dr. Thanchanok Sirirak (Major Advisor)
 2. Dr. Nadechanok Jiangseubchatveera (Co-Advisor)
-

ABSTRACT

The study's aim is to develop the method of extraction of Mitragynine from *Mitragyna speciosa*. The technique being applied is the Green chemistry technique by using DESs. Our study is divided into two sections, which are the process of extraction of Mitragynine and the factors that affect the extraction process by the DESs. From the study of the extraction of Mitragynine, when extracted by the HPLC method it was found that the alkaloid group that is a derivative of Mitragynine 3.3 mg (1.25%) was obtained. However, it was found that Mitragynine could be degraded due to heat during the evaporation process.

According to the study, there are a total of 5 factors, which are the kinds of solvents, solid-liquid ratio, water content, temperature, and the time of extraction. It was found that DESs have the lower ability of extraction compared to methanol. Also, when using choline chloride-glycerol (1:3) as a solvent when altering each of the factors, found that the proportion of herb to solvents affects the effectiveness of extraction significantly. The higher the value of the proportion of herb to solvents, the higher the amount of extract is achieved. It was also found that the amount of water and temperature do not affect the effectiveness of extraction. Though, the excessively long duration of extraction could lead to the damage of the chemical structure.

Major Advisor Assist. Prof. Dr. Thanchanok Sirirak

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากเภสัชกรหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์ และเภสัชกรหญิง ดร. เนตรชนก เจียงสืบชาติ วีระ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย คอยให้ความรู้ คำปรึกษา และข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ จึงกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ บุคลากร คณะเภสัชศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่คอยสนับสนุนให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดการทำวิจัยครั้งนี้ ทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างสมบูรณ์ลุล่วง

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชา จนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และสุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อน ๆ รวมถึงผู้เกี่ยวข้องทุกคน ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาเล่าเรียนรวมถึงการทำงานวิจัยเสมอมา

คณะผู้วิจัย

นสภ. มารินา โคนากะ รหัส 61210036

นสภ. วาสิตา อินทนาศักดิ์ รหัส 61210039

นสภ. สิริภัทร น้อยนารถ รหัส 61210084

สารบัญ

คำนำ.....	ข
บทคัดย่อ.....	ค
ABSTRACT.....	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 กรอบแนวคิด	2
บทที่ 2	3
ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1 ข้อมูลทั่วไปของกระท่อม	3
2.2 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารไมทราไจนีน	3
2.3 การสกัดด้วยวิธีเคมีสีเขียว (Green extraction)	4
2.4 Deep eutectic solvents: DESs	5
บทที่ 3	7
วิธีการดำเนินงานวิจัย	7
3.1 เครื่องมือ วัสดุ และสารเคมี.....	7

3.2 การสกัดสารมาตรฐานไมทราจินีน.....	9
3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์.....	11
3.4 วิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย deep eutectic solvents.....	11
3.5 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล	12
บทที่ 4	13
ผลการวิจัย	13
4.1 การสกัดสารมาตรฐานไมทราจินีน.....	13
4.2 การสกัดสารไมทราจินีนด้วยตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs).....	17
บทที่ 5	25
วิจารณ์ผลการวิจัย	25
5.1 การสกัดสารมาตรฐานไมทราจินีน.....	25
5.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs)	26
บทที่ 6	28
สรุปผลการวิจัย	28
บรรณานุกรม	29

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสารไมทราไจนีนด้วยวิธี dry loading column chromatography	10
ตารางที่ 2 Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสารไมทราไจนีนให้บริสุทธิ์มากขึ้น	10
ตารางที่ 3 Gradient condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค HPLC	12
ตารางที่ 4 น้ำหนักสารสกัดย่อยที่ได้จากการสกัดแยกสารสกัดชั้น dichloromethane	14
ตารางที่ 5 น้ำหนักสารสกัดย่อยที่ได้จากการสกัดแยกสารสกัด MTS4	15
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค HPLC	19
ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3)) โดยทำการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนที่ใช้ในการสกัด	20
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3) โดยทำการปรับเปลี่ยนปริมาณปริมาณน้ำ (%v/v) ที่ใช้ในการสกัด	21
ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3) โดยทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด	22
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3) โดยทำการปรับเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการสกัด	23

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 โครงสร้างสารไมทราไจนีน.....	3
ภาพที่ 2 TLC chromatogram ของ MTS1-6 ที่ทดสอบด้วยน้ำยาทดสอบ dragendorff's; MTS1 (1); MTS2 (2); MTS3 (3); MTS4 (4); MTS5 (5); MTS6 (6)	14
ภาพที่ 3 TLC chromatogram ของ 9 fraction ที่ทดสอบด้วยน้ำยาทดสอบ dragendorff's; MTS4_1 (1); MTS4_2 (2); MTS4_3 (3); MTS4_4 (4); MTS4_5 (5); MTS4_6 (6); MTS4_7 (7); MTS4_8 (8); MTS4_9 (9); fraction ล้าง (10).....	15
ภาพที่ 4 ^1H NMR spectrum ของสารสกัด MTS4_5 (400 MHz, CDCl_3).....	16
ภาพที่ 5 ^1H NMR spectrum ของสารสกัด MTS4_6 (400 MHz, CDCl_3).....	16
ภาพที่ 6 ^1H NMR spectrum ของสารสกัด MTS4_7 (400 MHz, CDCl_3).....	17
ภาพที่ 7 ^1H NMR spectrum ของ MTS 4_7P (400 MHz, CDCl_3).....	17
ภาพที่ 8 ลักษณะสารละลาย DESs.....	18
ภาพที่ 9 HPLC chromatogram ของการสกัดผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3 โมล)	19
ภาพที่ 10 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด * คือ $p < 0.0332$ ^a คือ เมื่อเทียบกับ methanol.....	20
ภาพที่ 11 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย, **** คือ $p < 0.0001$ ^a เมื่อเทียบกับอัตราส่วน 1:20, ^b เมื่อเทียบกับอัตราส่วน 1:40.....	21
ภาพที่ 12 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัด (%v/v)	22
ภาพที่ 13 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ.....	23
ภาพที่ 14 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด, * คือ $p < 0.0332$ ^a คือ เมื่อเทียบกับเวลา 10 นาที	24

กระท่อม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* Korth. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae พบมากในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้ เช่น สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง สตูล พัทลุง สงขลา ยะลา ปัตตานี นราธิวาส และตอนบนของประเทศมาเลเซีย และพบในบางจังหวัดของภาคกลาง เช่น ปทุมธานี พืชกระท่อมมีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่อานกลาง มีแก่นเป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 10-15 เมตร ใบคล้ายใบกระดังงา มีขนิดก้านใบแดงและก้านใบเขียว ดอกกลมโตขนาดเท่าผลพุทรา ใบเป็นใบเดี่ยวสีเขียว เรียงตัวเป็นคู่ตรงข้าม แผ่นใบกว้างประมาณ 5-10 เซนติเมตร ยาวประมาณ 8-14 เซนติเมตร ดอกมีสีขาวอมเหลืองออกเป็นช่อตั้งกลมขนาด 3-5 เซนติเมตร

สมัยโบราณกระท่อมเป็นพืชที่ใช้เป็นตัวยาในตำรับยาประเภทยาแก้ท้องเสียในสูตรยาของหมอพื้นบ้านหรือหมอแผนโบราณ เช่น ตำรับยาประสะกระท่อม แต่ปัจจุบันไม่มีความจำเป็นต้องใช้ยารักษาแล้ว เพราะมียาแผนปัจจุบันและแผนโบราณที่ให้ผลเท่าเทียมหรือดีกว่า อีกทั้งแม้ใบกระท่อมจะให้ผลการออกฤทธิ์ที่อาจมีประโยชน์ทางยา แต่สามารถทำให้เสพติดและมีผลเสียต่อสุขภาพได้ หากใช้ติดต่อกันนาน ๆ ผลจากการเสพจะมีอาการเป็นสุข กระปรี้กระเปร่า รู้สึกไม่อยากอาหาร กัดความรู้สึกเมื่อยล้าขณะทำงานทำให้สามารถทำงานได้นาน และทนแดดมากขึ้น แต่จะเกิดอาการกลั้วหนาวสั่นเวลาอากาศครึ้มฟ้าครึ้มฝน ผู้เสพจะมีผิวหนังแดงเพราะเลือดไปเลี้ยงผิวหนังมากขึ้น อาการข้างเคียง ได้แก่ ปากแห้ง ปัสสาวะบ่อย เบื่ออาหาร ท้องผูก นอนไม่หลับ ในรายที่เสพใบกระท่อมมาก ๆ หรือเสพเป็นระยะเวลาานาน มักจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีขึ้นที่บริเวณผิวหนัง ทำให้ผู้ที่รับประทานมีผิวคล้ำและเข้มขึ้น และยังพบอีกว่าการเสพใบกระท่อมโดยไม่ได้รับรู้เอาก้านใบออกจากตัวใบก่อนอาจจะทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า “ถุงท่อม” ในลำไส้ได้ เนื่องจากก้านใบและใบของกระท่อมไม่สามารถย่อยได้ จึงตกตะกอนติดค้างอยู่ภายในลำไส้ทำให้ขับถ่ายออกมาไม่ได้ และเกิดพังผืดขึ้นมาหุ้มรัดอยู่โดยรอบก้อนกากกระท่อมนั้น ทำให้เกิดเป็นก้อนถุงขึ้นมาในลำไส้ บางรายมีอาการโรคจิต หวาดระแวง เห็นภาพหลอน คิดว่าคนจะมาทำร้าย และพูดไม่รู้เรื่อง [1]

พืชกระท่อมมีสารออกฤทธิ์หลัก คือ ไมทราไจนิน (mitragynine) ซึ่งเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) ที่มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดโดยการจับกับตัวรับออปิอยด์ ฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และฤทธิ์ต้านอักเสบ [2] ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ สารไมทราไจนินมีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้

ในปัจจุบันการสกัดสารไมทราไจนีนมักใช้วิธีที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) อาทิ เช่น chloroform, hexane, methanol เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะสามารถใช้สกัดสารประกอบในใบกระท่อมได้ดี แต่มีข้อจำกัดคือ ตัวทำละลายดังกล่าวมีความเป็นพิษค่อนข้างสูง ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้สามารถระเหยปนในอากาศ, น้ำดื่ม หรืออาหารได้ หากมีกระบวนการกำจัดและการปลดปล่อยสารที่ไม่ถูกต้องจะทำให้มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ [3]

ปัจจุบันการสกัดด้วยวิธีการเคมีสีเขียว (green chemistry) ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากเป็นวิธีการที่คำนึงถึงความปลอดภัยในการใช้สารเคมีเป็นอันดับแรก โดยสารเคมีจะต้องไม่เป็นพิษหรือก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตน้อยที่สุดรวมทั้งการปลดปล่อยสารเคมีที่เป็นพิษออกสู่สิ่งแวดล้อม โดยการหาสารอื่นที่ไม่เป็นอันตรายมาใช้ทดแทน หรือการเปลี่ยนกระบวนการตลอดจนเลือกตัวทำละลายที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะแต่เพิ่มประสิทธิผลและศักยภาพของกระบวนการสกัด [4] แต่ทั้งนี้ในปัจจุบันยังมีการศึกษาการสกัดพืชกระท่อมด้วยวิธีนี้น้อยมาก ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาหาวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่ใช่สารอินทรีย์ในการสกัดสารไมทราไจนีนจากพืชกระท่อมให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญมากที่สุด

1.2 วัตถุประสงค์

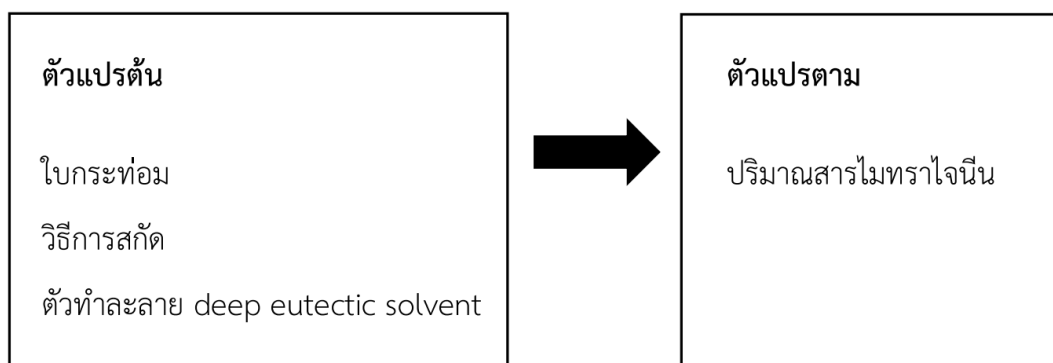
เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญไมทราไจนีนจากใบกระท่อมโดยเทคนิคเคมีสีเขียวโดยใช้ตัวทำละลาย deep eutectic solvent เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญไมทราไจนีนมากที่สุด

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้วิธีการสกัดสารไมทราไจนีนที่ดีที่สุดโดยการใช้เทคนิคเคมีสีเขียว เพื่อแก้ไขปัญหาจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

1.3.2 ได้สารสกัดไมทราไจนีนจากการสกัดโดยใช้เทคนิคเคมีสีเขียว เพื่อนำไปใช้ต่อยอดในด้านต่าง ๆ

1.4 กรอบแนวคิด

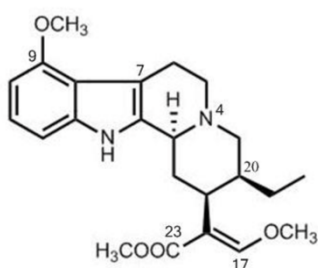


บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ข้อมูลทั่วไปของกระท่อม

กระท่อม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* Korth. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rubiaceae กระท่อมมีสารออกฤทธิ์หลัก คือ ไมทราไจนีน (mitragynine) เป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloids) โดยมีชนิดของกลุ่มโครงสร้างทางเคมีเป็น indole alkaloids (ภาพที่ 1) มีสูตรโมเลกุล $C_{23}H_{30}O_4N_2$ อาจเรียกชื่อ mitragynine ตามลักษณะโครงสร้างว่า 9-methoxy-corynantheidine



ภาพที่ 1 โครงสร้างสารไมทราไจนีน

2.2ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารไมทราไจนีน

2.2.1 ฤทธิ์บรรเทาอาการปวด โดยการจับกับตัวรับออปิอยด์ในสมอง สารไมทราไจนีนมีผลต่อระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) และระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) โดยเฉพาะส่วน medulla จากรายงานวิจัย Kruegel และคณะ ปี 2016 ได้รายงานการศึกษาสารไมทราไจนีนโดยการทำ molecular docking ต่อการจับกับตัวรับออปิอยด์ที่แยกได้จากมนุษย์ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าไมทราไจนีน และ 7-hydroxymitragynine เป็น partial μ opioid agonist และเป็น competitive antagonist ต่อ δ และ κ opioid receptors ดังนั้นสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทไมทราไจนีน และ 7-hydroxymitragynine มีคุณสมบัติแก้ปวดผ่านการจับกับ μ opioid receptor [5] และฤทธิ์แก้ปวดของสารไมทราไจนีนยังเป็นผลเนื่องมาจากการลดระดับสัญญาณการเจ็บปวดไปยังสมองผ่านระบบ noradrenergic system และ serotonergic system [6]

2.2.2 ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารในหนูขาว โดยผ่านตัวรับออปิอยด์ [7]

2.2.3 ฤทธิ์ต้านอักเสบ จากการศึกษาของ Shaik Mossadeq และคณะ ปี 2009 ได้รายงานการศึกษาคุณสมบัติต้านการอักเสบของสารสกัด methanol ของกระท่อม โดยฉีดเข้าช่องท้องของ

หนูขาวที่เหนียวทำให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูด้วย carrageenan (carrageenan-induced paw edema) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบภายใน 3 ชั่วโมงแรกหลังจากหนูได้รับสารสกัด โดยคาดว่ามียับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบในกระบวนการอักเสบผ่านวิถี arachidonic acid เพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และกระตุ้นกระบวนการสมานแผล [8]

2.2.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดจากใบกระท่อมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ สารสกัดในชั้นน้ำของกระท่อมมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ glutathione transferase (GST) ในหนูขาวโดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการกำจัดพิษออกจากร่างกาย ในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดชั้นน้ำมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระนอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *Salmonella typhi* และ *Bacillus subtilis* อีกด้วย [9]

2.3 การสกัดด้วยวิธีเคมีสีเขียว (Green extraction)

ความหมายของการสกัดด้วยวิธีเคมีสีเขียว คือ กระบวนการสกัดที่สามารถลดการใช้พลังงานโดยใช้ตัวทำละลายทางเลือกและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยสามารถรับรองได้ว่าสารสกัดหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีเคมีสีเขียวนั้นมีความปลอดภัย มีคุณภาพที่ดี มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ที่ปฏิบัติงาน [10] ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนากระบวนการสกัดด้วยวิธีเคมีสีเขียวโดยใช้วิธีการอื่นร่วมด้วย เช่น

2.3.1 Ultrasound assisted extraction (UAE) เป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลายในการสกัดสาร

2.3.2 High pressure assisted extraction (HPAE) เป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์จากพืชโดยใช้แรงดัน เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด

2.3.3 Microwave assisted extraction (MAE) เป็นวิธีที่ใช้คลื่นไมโครเวฟซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าร่วมกับตัวทำละลายในการสกัดสาร ทำให้เกิดความร้อนจากการต้านทานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าซึ่งมีผลต่อเนื้อเยื่อของพืชและมีผลต่อการละลายของสารที่ต้องการ

2.3.4 Enzymatic assisted extraction (EAE) เป็นวิธีการสกัดที่ใช้เอนไซม์ในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาการสกัดได้ วิธีการสกัดนี้สามารถช่วยให้การสกัดด้วยตัวทำละลายมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทำให้สามารถเข้าถึงสารที่สนใจได้มากขึ้น

2.3.5 Supercritical fluid extraction (SFE) เป็นวิธีการสกัดที่ใช้สารสกัดที่เสื่อมสภาพได้ด้วยความร้อนและเป็นสารที่มีขั้วต่ำ ของไหลที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดส่วนมากเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งอยู่ในสถานะของไหลยิ่งยวดด้วยคุณสมบัติที่ถูกบีบอัดให้เป็นของเหลวเหมือนน้ำและมีการไหลเหมือนอากาศทำให้สามารถแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืชที่ต้องการสกัดได้

2.3.6 Pulse electrified field extraction (PEFE) เป็นวิธีการสกัดที่ใช้สนามไฟฟ้าพัลส์ในการช่วยสกัด ซึ่งเป็นหนึ่งในเทคนิคใหม่ล่าสุดในการสกัดทำให้ได้สารสำคัญออกมาปริมาณมากกว่าวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิม

2.3.7 Pressurized liquid assisted extraction (PLAE) เป็นวิธีการสกัดที่ใช้ความดันและอุณหภูมิสูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด เป็นเทคนิคที่สามารถลดปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมได้ มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถนำมาใช้เตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญได้

2.3.8 Surfactant assisted extraction (SAE) โดยทั่วไปจะใช้เป็นส่วนเสริมในการสกัดประเภทอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเทคนิคการสกัดแบบ MAE [11]

2.3.9 Alternative solvents เป็นการใช้ตัวทำละลายทางเลือกในการสกัดสารเพื่อทดแทนตัวทำละลายอินทรีย์

2.4 Deep eutectic solvents: DESs

การสกัดผลิตภัณฑ์ธรรมชาติด้วย natural deep eutectic solvents เป็นการใช้ตัวทำละลายทางเลือกที่นอกเหนือจากตัวทำละลายอินทรีย์มาใช้ในกระบวนการสกัด ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายที่เป็น deep eutectic solvents มีคุณสมบัติเป็นสารที่สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายโดยเกิดจากการผสมสารประกอบเคมีสองชนิด โดยที่สารประกอบชนิดหนึ่งทำหน้าที่เป็นผู้ให้พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond donor) และสารประกอบอีกชนิดเป็นตัวรับพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond acceptor) แล้วเกิดปฏิกิริยากันผ่านพันธะไฮโดรเจนทำให้เกิดเป็น eutectic mixture ขึ้น นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษต่ำ มีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ ความสามารถในการติดไฟต่ำ สามารถรีไซเคิลได้ และราคาไม่แพง [12] ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวตรงกับหลักการของเคมีสีเขียว [13] ดังนั้นสารละลายที่เป็น deep eutectic solvents จึงเป็นอีกทางเลือกสำหรับการสกัดด้วยวิธีเคมีสีเขียว ทั้งนี้ได้มีการนำสารละลาย deep eutectic solvents มาใช้ในการสกัดสารกลุ่มแอลคาลอยด์ได้แก่ การสกัดสาร boldine ซึ่งเป็นสารกลุ่ม aporphine alkaloids โดยการใช้ความร้อนและการคนสาร พบว่าการใช้ตัวทำละลาย proline-oxalic acid (1:1 molar) ได้ปริมาณสาร boldine เท่ากับ 2.3615 mg/g ซึ่งมากกว่าการสกัดด้วย methanol ถึง 8 เท่า [14]

จากการศึกษาของ Zheng-Meng Jiang และคณะ ปี 2018 ได้ทำการสกัดสารแอลคาลอยด์ชนิดต่าง ๆ จากพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Caulis sinomenii*, *Coptis chinensis*, *Stephania tetrandra*, *Tetradium ruticarpum* และ *Sophora flavescens* โดยใช้เทคนิค deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction พบว่าตัวทำละลาย choline chloride-levulinic acid (1:2 mole) สามารถสกัดได้สาร evodiamine และ rutaecarpine จากพืช *Tetradium ruticarpum*

ซึ่งเป็นสารกลุ่ม indole alkaloids ปริมาณมากกว่าการสกัดด้วย methanol เช่นเดียวกับแอลคาลอยด์ชนิดอื่นอย่าง morphinane alkaloids, protoberberine alkaloids และ quinolizidine alkaloids [15]

การสกัดพืชกระท่อมด้วยเทคนิคเคมีสีเขียวมีการศึกษาการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกรวม (total phenolic compounds) จากพืชกระท่อมโดยใช้วิธีการ natural deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction [16] พบว่าตัวทำละลาย citric acid-glucose สามารถสกัดสาร polyphenolic compounds ได้ปริมาณมากที่สุด (246.70 mg GAE/g) เมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น ได้แก่ malic acid-glucose, lactic acid-sucrose, choline chloride-sorbitol และ ethanol โดยสภาวะการสกัดที่ทำให้ได้ปริมาณสารมากที่สุด ได้แก่ citric acid-glucose (5:1 g/g), solid-liquid ratio (15:1 mL/g), microwave power (270 watt), extraction time 15 นาที [17] จะเห็นได้ว่ายังไม่มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสารด้วยหลักการเคมีสีเขียวโดยใช้เทคนิค deep eutectic solvents ในการสกัดสารไมทราจินีนจากใบกระท่อมโดยตรง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคเคมีสีเขียวโดยใช้ deep eutectic solvents เพื่อให้ได้ปริมาณสารสำคัญมากที่สุดและสามารถนำไปต่อยอดในด้านต่าง ๆ ต่อไปได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ วัสดุ และสารเคมี

3.1.1 ผงใบกระท่อมแห้ง

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Digital balance (Mettler Toledo MS 30025, Switzerland)
- Analytical balance (Mettler Toledo MS 204, Switzerland)
- Rotary evaporator (IKA RV 8 V, Thailand)
- Ultrasonic cleaner set (Wisd. WUC-D22H, South Korea)
- Centrifuge (Thermo scientific Legend X1R, Thailand)
- TLC-silica gel 60 F₂₅₄ Aluminium sheets (Merck, Germany)
- C18 HPLC column 10x250 mm, 5µm (Vertical Chromatography, VertiSep™ GES, Thailand)
- C18 HPLC column 4.6x150mm, 5µm (Vertical Chromatography, VertiSep™ GES, Thailand)
- Micropipette ขนาด 20-200, 100-1000 µL (Thermo Scientific™, Thailand)
- Pipette tip ขนาด 200 และ 1000 µL (AXYGEN Scientific,Thailand)
- Buchner funnel
- Aluminium foil
- Parafilm (Bemis, USA)
- Dispensing spoon
- Diaphragm vacuum pump model Gm-0.50
- UV cabinet (CAMAG 022-9060, Switzerland)
- Desiccator
- NMR tubes
- Capillary tube

- Magnetic stirring bar
- Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml (Axygen®, China)
- Nylon syringe filter 0.2 μm (Vertical Chromatography, Thailand)
- Nylon membrane filter 0.45 μm (Johnson Test Papers, England)
- Syringe ขนาด 3 mL (NIPRO, Indonesia)

3.1.3 เครื่องแก้ว

- Beaker
- Round bottom flask
- Erlenmeyer flask
- Chromatography tank
- Separatory funnel
- Gooch funnels with sintered glass disc
- Screw-capped conical flask
- Cylinder

3.1.4 สารเคมี

- Methanol (Scharlab S.L., Spain)
- Methanol HPLC grade (Honeywell Burdick & Jackson, United states)
- Acetic acid (Supelco, Germany)
- Hexane (Honeywell Burdick & Jackson, South Korea)
- 25% Ammonium solution (CARLO ERBA, Italy)
- Dichloromethane (Honeywell Burdick & Jackson, United states)
- Deionized water
- Ethyl acetate (Honeywell Burdick & Jackson, United states)
- Dragendorff's reagent reagent spray solution (Supelco, Germany)
- Silica gel 60 (Merck, Germany)
- Chloroform-D1 (MagniSolv™, Switzerland)
- Acetonitrile (Honeywell Burdick & Jackson, United states)
- Trifluoroacetic acid (Fisher Chemical™, United Kingdom)
- Levulinic acid 98% (Sigma-aldrich, China)
- Choline chloride (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- Glycerol (OmniPur®, United states)

- Formic acid (EMSURE, Finland)

3.2 การสกัดสารมาตรฐานไมทราไจนีน

นำผงใบกระท่อมแห้งมาชั่งน้ำหนัก 500 g เติม methanol ลงในผงกระท่อมให้พอท่วม ปิดด้วยกระดาษฟอยล์และฝาภาชนะให้สนิท ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารที่หมักไว้ไปกรองผ่านกระดาษกรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลาย methanol ออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสาร (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °C จนสารสกัดแห้ง แล้วเติมตัวทำละลาย methanol ลงในผงกระท่อมเพื่อหมักอีกครั้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง ชั่งน้ำหนักสารสกัดแห้งและคำนวณหาปริมาณสารสกัดหยาบของใบกระท่อมจากสูตร

$$\text{ร้อยละของปริมาณสารสกัดหยาบ} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดจากการระเหยแห้ง}}{\text{น้ำหนักผงใบกระท่อมแห้ง}} \times 100$$

สกัดแยกสารกลุ่มแอลคาลอยด์ด้วยวิธี acid-base extraction แบ่งสารสกัด methanol น้ำหนัก 47.46 g ละลายสารสกัดด้วย 10% acetic acid ปริมาตร 300 ml ใส่ลงในกรวยแยกขนาด 1,000 ml จากนั้นทำการสกัดแยกด้วย hexane แยกสารสกัดในชั้น hexane และ acetic acid ออกจากกัน ทำการสกัดแยกซ้ำจนกระทั่งชั้น hexane ใส นำสารสกัดชั้น hexane รวมเข้าด้วยกัน แล้วระเหยแห้ง ได้เป็นสารสกัดชั้น hexane จากนั้นนำชั้นน้ำ (acetic acid) มาทำให้เป็นด่างด้วย 25% ammonium solution จนได้ pH 9 จากนั้นสกัดแยกด้วย dichloromethane แยกสารสกัดในชั้น dichloromethane และ acetic acid ออกจากกัน ทำการสกัดแยกซ้ำจนกระทั่งชั้น dichloromethane ใส นำชั้น dichloromethane ที่ได้ทั้งหมดรวมกันแล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

สกัดแยกสารแอลคาลอยด์ด้วยวิธี dry loading column chromatography โดยนำสารสกัด dichloromethane มาละลายด้วย dichloromethane ปริมาตรเล็กน้อย แล้วบดผสมกับผง silica ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเตรียม column เพื่อแยกสารโดยนำผง silica น้ำหนักประมาณ 300 g กระจายตัวใน hexane ปริมาตรมากพอที่จะทำให้ผง silica สามารถกระจายตัวได้ นำไปบรรจุใน gooch funnels with sintered glass disc ให้หน้าเรียบเสมอกันแล้วโรยผง silica ที่บดผสมกับสารสกัดลงบนผิวหน้า silica gel วางแผ่นกระดาษกรองทับอีกชั้น ชะด้วย mobile phase สารผสม hexane : ethyl acetate แบบไล่ขั้ว ดังตารางที่ 1 และเก็บ fraction ละ 250 ml

ตารางที่ 1 Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสารไมทราไจนีนด้วยวิธี dry loading column chromatography

Fraction	อัตราส่วนของ mobile phase (%v/v)	
	Hexane	Ethyl acetate
1 – 20	75	25
21 – 25	60	40
26	50	50
27	0	100

หลังจากนั้นนำแต่ละ fraction ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จนได้เป็นสารสกัดแห้งแล้วนำไปติดตามสารกลุ่มแอลคาลอยด์ โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบ stationary phase เป็น silica gel และ mobile phase เป็น hexane : ethyl acetate ที่อัตราส่วน 60:40 (%v/v) ติดตามด้วย UV 254, 366 nm และสเปรย์ด้วยน้ำยาทดสอบ dragendorff's

นำ fraction ที่มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Neni Isnaeni และคณะ ปี 2022 [18] โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และชะด้วย mobile phase ที่มีส่วนผสมของ hexane ethyl acetate และ ammonium hydroxide ดังตารางที่ 2 ติดตามสารไมทราไจนีนโดยใช้ TLC ใช้ระบบ stationary phase เป็น silica gel และ mobile phase เป็น hexane : ethyl acetate : 25% ammonium solution ที่อัตราส่วน 30:8:1 (v/v/v) ติดตามด้วย UV 254, 366 nm และน้ำยาทดสอบ dragendorff's จากนั้นรวม fraction ที่คาดว่าจะเป็สารเดียวกันรวมไว้ด้วยกัน

ตารางที่ 2 Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสารไมทราไจนีนให้บริสุทธิ์มากขึ้น

Fraction	อัตราส่วนของ mobile phase (v/v/v)		
	Hexane	Ethyl acetate	25% NH ₄ OH
1 - 36	30	8	1
37 - 43	50	50	-
44 - 47	-	100	-

จากนั้นนำสารสกัดที่มีสารแอลคาลอยด์มาสกัดแยกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ Vertisep™ GES C18 (10x250 mm, 5 μ m) ชะด้วย 60% acetonitrile ใน 0.1% trifluoroacetic acid flow rate 3.0 mL/min ติดตามด้วยความยาวคลื่น 225 และ 210 nm

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีนด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) [19]

3.4 วิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย deep eutectic solvents

การสกัดด้วยตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Zheng-Meng Jiang และคณะ ปี 2018 [15] มีวิธีการสกัด ดังนี้

3.4.1 การเตรียมสารละลาย DESs

สารละลาย DESs ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ choline chloride-levulinic acid และ choline chloride-glycerol

สารละลาย DESs ชนิดที่ 1 เตรียมโดยใช้ choline chloride (ChCl) และ levulinic acid (LA) ในอัตราส่วนโมล 1:2 และชนิดที่ 2 เตรียมโดยใช้ choline chloride (ChCl) และ glycerol ในอัตราส่วนโมล 1:3 ใส่ในขวดที่มีฝาปิด และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C และคนสารตลอดเวลาจนได้สารละลายใส

3.4.2 การสกัดสารไมทราไจนีนจากผงใบกระท่อม

ตัวทำละลายที่ใช้มี 3 ชนิด ได้แก่ choline chloride-levulinic acid (1:2), choline chloride-glycerol (1:3) เจือจางตัวทำละลายด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ methanol

นำผงใบกระท่อมแห้งมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน 25 mg ใส่ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml แล้วเติมตัวทำละลายปริมาตร 1 ml จากนั้นสกัดโดยใช้คลื่นเสียงในการสกัด (ultrasonic-assisted extraction method) ความแรงคลื่น 24 kHz อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที และที่อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:40

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโดยเปลี่ยนแปลงครั้งละ 1 ปัจจัย (single factor) โดยให้ปัจจัยอื่นคงที่ มีการปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำ (10, 30 และ 50 %v/v) อุณหภูมิ (40, 50 และ 60°C) ระยะเวลาการสกัด (10, 20 และ 30 นาที) และอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย (1:20, 1:40 และ 1:60) ทำการทดลองซ้ำชุดละ 3 ครั้ง นำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 13000

rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้ micropipette ดูดส่วนสารละลายมา 500 μL และเจือจางด้วยน้ำ ปริมาตร 500 μL กรองสารตัวอย่างด้วย syringe filter ชนิด nylon ขนาด 0.2 μm ก่อนนำไป วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 μL โดยใช้ C18, 150×4.6 mm, 5 μm สะ ด้วยด้วยตัวทำละลาย gradient acetonitrile in 0.1% formic acid (ตารางที่ 3) flow rate 1.5 mL/min วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm

ตารางที่ 3 Gradient condition ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค HPLC

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow rate (mL/min)
0	70	30	1.5
17	30	70	1.5
20	30	70	1.5
21	0	100	1.5
40	0	100	1.5
40.5	70	30	1.5
45	70	30	1.5

หมายเหตุ Solvent A = Water with 0.1% formic acid

Solvent B = Acetonitrile with 0.1% formic acid

3.5 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ผลใช้สถิติการวิเคราะห์ one way ANOVA สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการเปรียบเทียบระหว่างแต่ละปัจจัยโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 9.5.1 (528)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาการใช้ตัวทำละลายสีเขียวเพื่อใช้ในการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมได้ศึกษา เป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 การสกัดสารไมทราจินีนเพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน และส่วนที่ 2 ศึกษาความสามารถในการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมโดยใช้ตัวทำละลาย deep eutectic solvents

4.1 การสกัดสารมาตรฐานไมทราจินีน

การสกัดผงใบกระท่อมแห้งน้ำหนัก 503.58 g ด้วยตัวทำละลาย methanol จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator พบว่า ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบที่ได้มีสีเขียวเข้ม มีลักษณะขุ่นเหนียว ได้สารสกัดหยาบ 93.02 g (18.47%)

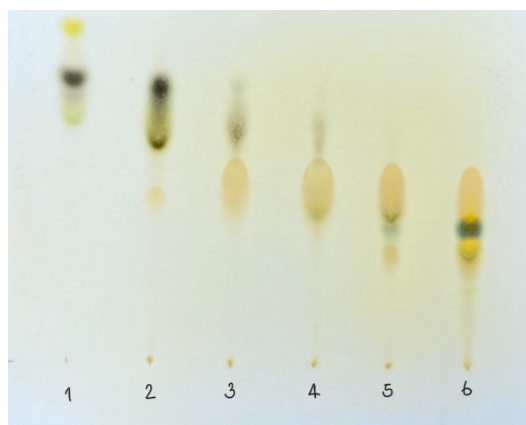
นำสารสกัดหยาบไปสกัดแยกสารกลุ่มแอลคาลอยด์โดยวิธี acid-base extraction โดยอ้างอิงจากวิธีการของ Amrianto และคณะ ปี 2021 [19] พบว่าสารกลุ่มแอลคาลอยด์สามารถละลายได้ดีใน acetic acid การสกัดแยกสารกลุ่มแอลคาลอยด์ในครั้งนี้จึงแบ่งสารสกัดหยาบ 47.46 g ละลายด้วย 10% acetic acid และทำการสกัดแยกโดยใช้ hexane เพื่อนำสารที่ไม่มีขี้และสารเจือปนอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากสารสกัดหยาบ เนื่องจากสารไมทราจินีนมีค่า pKa เท่ากับ 8.1 [20] จึงนำชั้นของ acetic acid มาทำให้เป็นด่างโดยใช้ 25% ammonium solution ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 9 เพื่อทำให้สารกลุ่มแอลคาลอยด์อยู่ในรูปอิสระ สารกลุ่มแอลคาลอยด์ในรูปอิสระนี้สามารถละลายได้ดีในชั้นของ dichloromethane จึงทำการเก็บชั้นของ dichloromethane และนำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator สารสกัดแห้งที่ได้มีน้ำหนัก 2.9717 g (6.26%)

นำสารสกัดชั้น dichloromethane มาสกัดแยกด้วยวิธี vacuum column chromatography โดยใช้ silica gel ชะด้วยระบบ mobile phase ที่ คือ hexane : ethyl acetate ที่อัตราส่วน 75:25, 60:40, 50:50 (v/v) และ ethyl acetate ตามลำดับ ได้สารสกัดทั้งหมด 27 fraction ติดตามสารกลุ่มแอลคาลอยด์โดยใช้เทคนิค thin layer chromatography (TLC) สังเกตผลภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm เพื่อดูลักษณะของ TLC chromatogram และใช้น้ำยาทดสอบ dragendorff's เพื่อติดตาม fraction ที่มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์ รวม fraction ที่คาดว่าเป็นสารเดียวกันไว้ด้วยกันโดยรวมได้ทั้งหมด 6 fraction (MTS1-6) และนำสารสกัดทั้ง 6 ไประเหยแห้งแล้วชั่งน้ำหนักสารสกัด ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 น้ำหนักสารสกัดย่อยที่ได้จากการสกัดแยกสารสกัดชั้น dichloromethane

รหัสสารสกัด	Fraction	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (g)
MTS1	2-5	0.1203
MTS2	6-8	0.0486
MTS3	9-11	0.1099
MTS4	12-21	0.4011
MTS5	22-23	0.0756
MTS6	24-26	0.1254

นำสารสกัด MTS1 - 6 มา spot ลงบนแผ่น TLC แล้วทำการติดตามสารกลุ่มแอลคาลอยด์อีกครั้งโดยใช้น้ำยาทดสอบ dragendorff's พบว่าสารสกัด MTS4 เกิดเป็นจุดสีส้มซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัดและมีสารเจือปนอื่นอยู่ในปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ (ภาพที่ 2)



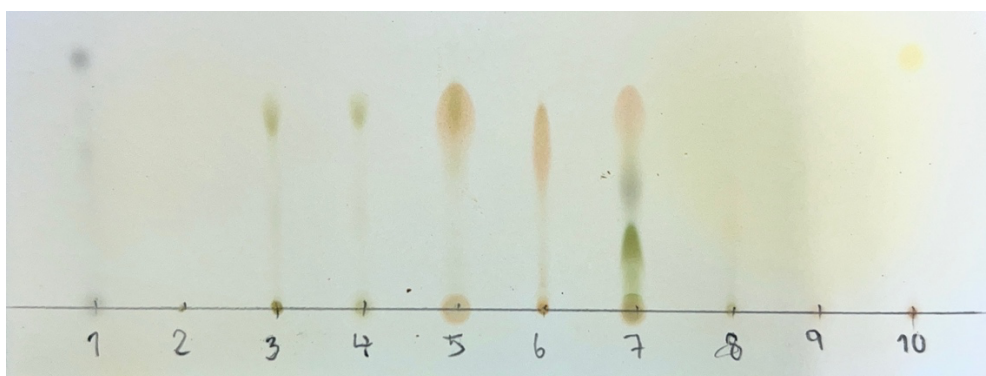
ภาพที่ 2 TLC chromatogram ของ MTS1-6 ที่ทดสอบด้วยน้ำยาทดสอบ dragendorff's; MTS1 (1); MTS2 (2); MTS3 (3); MTS4 (4); MTS5 (5); MTS6 (6)

นำสารสกัด MTS4 มาสกัดแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ระบบ mobile phase เป็น hexane : ethyl acetate : 25% ammonia solution ที่อัตราส่วน 30:8:1, hexane : ethyl acetate ที่อัตราส่วน 50:50 และ ethyl acetate ตามลำดับ ได้สารสกัดย่อยทั้งหมด 9 fraction (MTS4_1-9) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 น้ำหนักสารสกัดย่อยที่ได้จากการสกัดแยกสารสกัด MTS4

รหัสสารสกัด	Fraction	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (g)
MTS4_1	4-8	0.0010
MTS4_2	9-15	0.0036
MTS4_3	16-23	0.0045
MTS4_4	24-26	0.0022
MTS4_5	27-29	0.0537
MTS4_6	30-37	0.2024
MTS4_7	38-43	0.2479
MTS4_8	44-46	0.0063
MTS4_9	47	0.0014

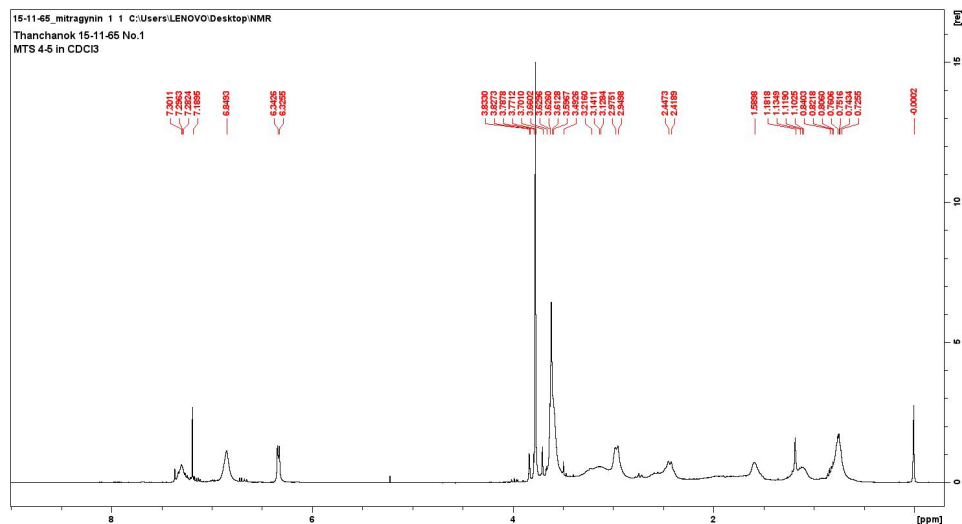
นำสารสกัด MTS4_1-9 มา spot ลงบนแผ่น TLC แล้วทำการติดตามสารกลุ่มแอลคาลอยด์อีกครั้งโดยใช้น้ำยาทดสอบ dragendorff's พบว่าสารสกัด MTS4_5, MTS4_6 และ MTS4_7 เกิดตะกอนสีส้มซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารสกัด (ภาพที่ 3)



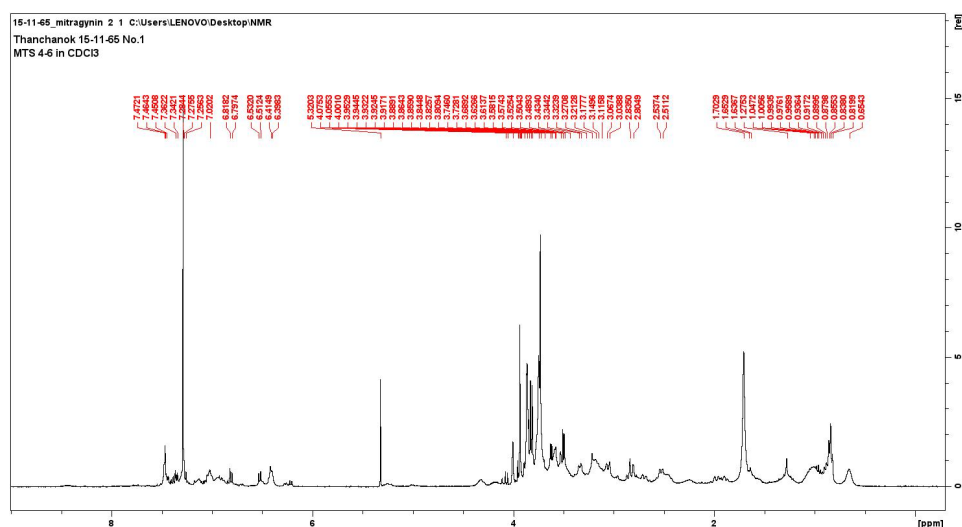
ภาพที่ 3 TLC chromatogram ของ 9 fraction ที่ทดสอบด้วยน้ำยาทดสอบ dragendorff's; MTS4_1 (1); MTS4_2 (2); MTS4_3 (3); MTS4_4 (4); MTS4_5 (5); MTS4_6 (6); MTS4_7 (7); MTS4_8 (8); MTS4_9 (9); fraction ล้าง (10)

ติดตามสารสกัด MTS4_5, MTS4_6 และ MTS4_7 ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) อ้างอิงจากงานวิจัยของ Laura Flores-Bocanegra และคณะ ปี 2020 [21] พบว่า ^1H NMR spectrum ของสารสกัด MTS4_5, MTS4_6 และ MTS4_7 มีสัญญาณที่คาดว่าป็นสารไมทราไจนีนหรือสารอนุพันธ์อย่างใดอย่างหนึ่งที่เป็น enantiomer กับไมทราไจนีนอีก 3 ตัว

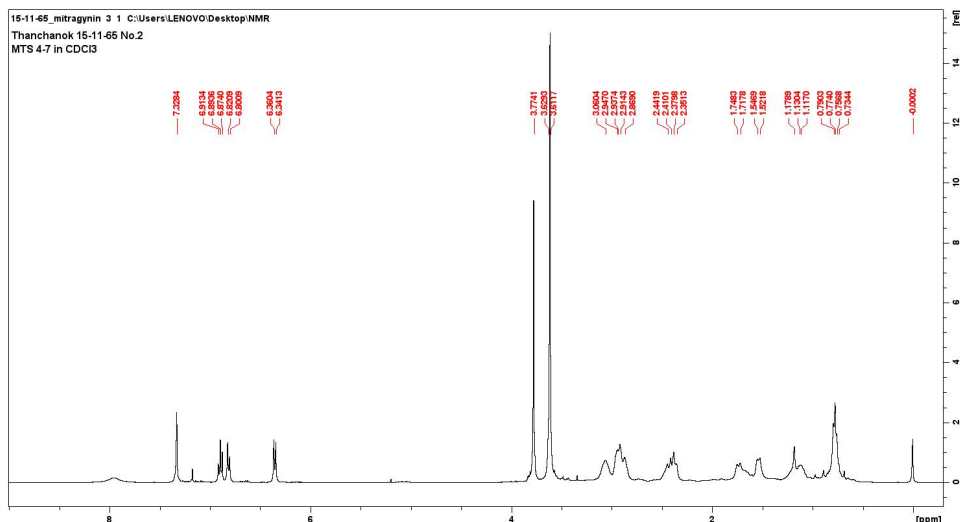
ได้แก่ speciociliatine, speciogynine และ mitraciliatine เนื่องจากพบสัญญาณของ (1) $\delta_{H-10} = 6.44-6.49$ ppm, $\delta_{H-12} = 6.87-7.01$ ppm เป็น doublet และ $\delta_{H-11} = 6.99-7.07$ ppm เป็น triplet (2) พบสัญญาณของ vinyl proton ที่ C-17 มี $\delta_H = 7.32-7.44$ ppm (3) สัญญาณของ methoxy group ที่ตำแหน่ง C-9, C-17 และ C-22 มี $\delta_H = 3.66-3.89$ ppm (4) พบสัญญาณ δ_H ของ methyl group ที่ C19 = 0.74-0.89 ppm (ภาพที่ 4-6) ซึ่งเป็น characteristic ของ indole alkaloids และด้วยสัญญาณ 1H NMR (ภาพที่ 5) พบว่าสารสกัด MTS4_7 มีสารเจือปนอื่น ๆ น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสัญญาณ NMR จากสารสกัด MTS4_5 และ MTS4_6 จึงทำการนำสารสกัด MTS4_7 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC ได้สารบริสุทธิ์ MTS4_7P น้ำหนัก 3.1 mg (1.25%)



ภาพที่ 4 1H NMR spectrum ของสารสกัด MTS4_5 (400 MHz, $CDCl_3$)

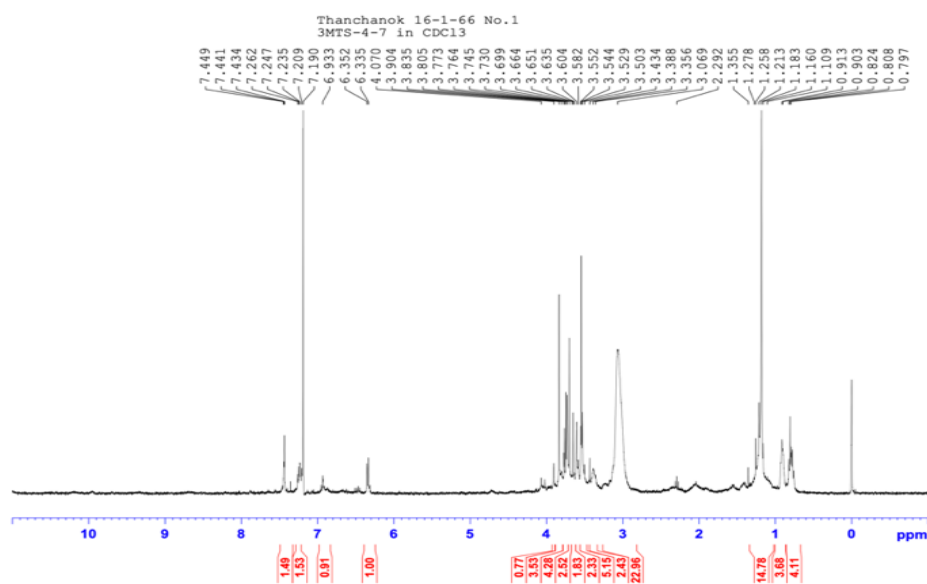


ภาพที่ 5 1H NMR spectrum ของสารสกัด MTS4_6 (400 MHz, $CDCl_3$)



ภาพที่ 6 ^1H NMR spectrum ของสารสกัด MTS4_7 (400 MHz, CDCl_3)

จากการนำสารสกัด MTS4_7P มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) พบว่าสัญญาณของสารสกัดมีการเปลี่ยนแปลงโดยพบสัญญาณในช่วง $\delta_{\text{H}} = 0.9$, 1.2, 3.1, 3.5-4, และ 7.2 ppm เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 7) ซึ่งต่างไปจากสัญญาณของสารสกัดก่อนทำการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างสารไมทราไจนีนในระหว่างกระบวนการสกัดแยกสาร

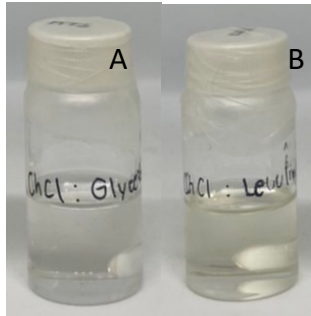


ภาพที่ 7 ^1H NMR spectrum ของ MTS 4_7P (400 MHz, CDCl_3)

4.2 การสกัดสารไมทราไจนีนด้วยตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs)

4.2.1 การเตรียมสารละลาย DESs

สารละลาย choline chloride และ levulinic acid ในอัตราส่วนโมล 1:2 และสารละลาย choline chloride และ glycerol ในอัตราส่วนโมล 1:3 ที่เตรียมได้ มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดใส ไม่มีสี (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ลักษณะสารละลาย DESs

(A) สารละลาย choline chloride (ChCl) และ levulinic acid (LA) ในอัตราส่วนโมล 1:2

(B) สารละลาย choline chloride (ChCl) และ glycerol ในอัตราส่วนโมล 1:3

4.2.2 การสกัดสารจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย

1) ปัจจัยตัวทำละลาย

จากการศึกษาปัจจัยชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดโดยทำการสกัดสารจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย methanol, choline chloride-levulinic acid (1:2 โมล) และ choline chloride-glycerol (1:3 โมล) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 50 °C ปริมาณน้ำ 30% v/v เป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากไม่สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ด้วยเทคนิค HPLC ได้ จาก HPLC chromatogram (ภาพที่ 9) จะเห็นว่าพบพีคที่ 5.3 นาทีเป็นพีคหลัก จึงเลือกใช้ความสูงของพีคดังกล่าวในการเปรียบเทียบปริมาณที่เปลี่ยนแปลง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการสกัด

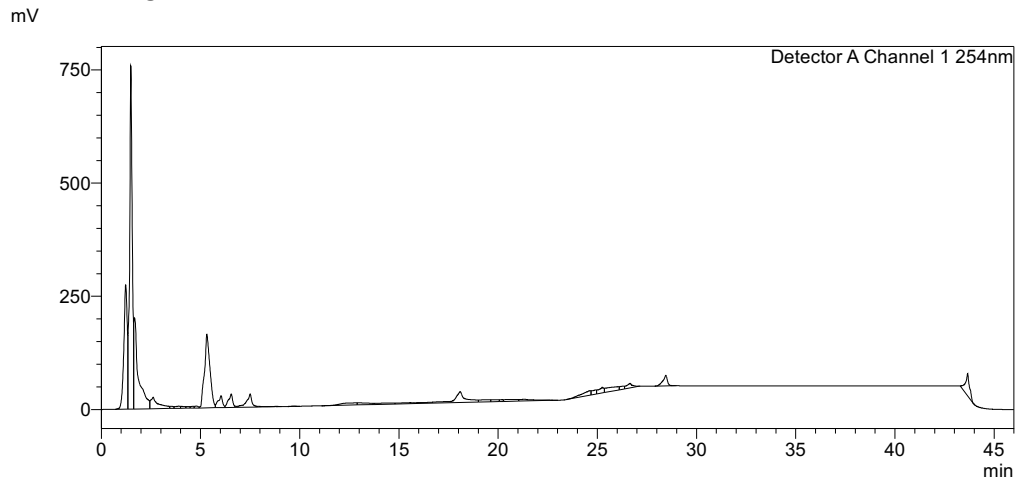
เมื่อทำการทดลองเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการสกัดพบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ choline chloride-levulinic acid (1:2) และ choline chloride-glycerol (1:3) ตามลำดับ ดังตารางที่ 6 โดยปริมาณสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย methanol มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.0332$ (ภาพที่ 10) เมื่อเทียบกับปริมาณสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3)

<Sample Information>

Vial #

19

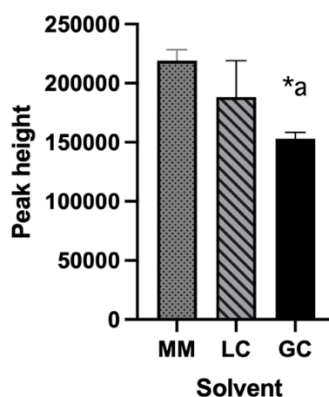
<Chromatogram>



ภาพที่ 9 HPLC chromatogram ของการสกัดผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3 โมล)

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค HPLC

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (อัตราส่วนโมล)	Average peak height (mV $\pm$ SD)
Methanol	219124.7 $\pm$ 9337.65
Choline chloride-levulinic acid (1:2)	188162.4 $\pm$ 30984.12
Choline chloride-glycerol (1:3)	152948.9 $\pm$ 5465.8



ภาพที่ 10 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด * คือ $p < 0.0332$ ^a คือ เมื่อเทียบกับ methanol

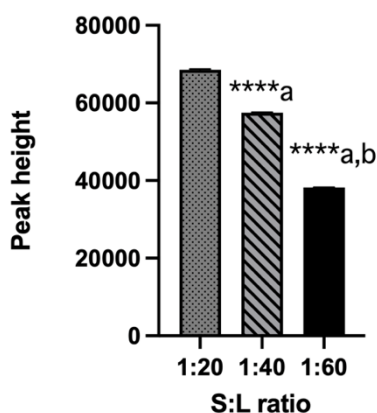
จากการศึกษาของ Adi Wolfson และคณะ ปี 2007 [22] แสดงให้เห็นว่า glycerol เป็นตัวทำละลายที่มีศักยภาพที่ดีในการใช้สกัดด้วยวิธีเคมีสีเขียว เนื่องจากได้ผลผลิตจากการสกัดปริมาณสูง อีกทั้งยังไม่มีพิษต่อสิ่งแวดล้อม สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ราคาถูก และเข้ากันได้กับสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์หลายชนิด จึงเลือกใช้คู่สาร choline chloride-glycerol (1:3) มาเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการปรับเปลี่ยนปัจจัยเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด

2) ปัจจัยอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย

จากการศึกษาการสกัดโดยทำการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย ได้แก่ 1:20, 1:40 และ 1:60 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ค่า peak height ที่ retention time 5.7 นาที พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:20 มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ 1:40 และ 1:60 ตามลำดับ ดังตารางที่ 7 และทั้ง 3 อัตราส่วนมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.0001$ (ภาพที่ 11)

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3) โดยทำการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนที่ใช้ในการสกัด

Solid: liquid ratio	Average peak height (mV $\pm$ SD)
1:20	68569.3 $\pm$ 165.776
1:40	57521.3 $\pm$ 71.6023
1:60	38248.3 $\pm$ 42.8978



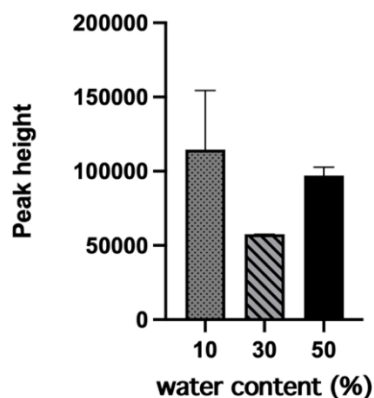
ภาพที่ 11 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย, **** คือ $p < 0.0001$ ^a เมื่อเทียบกับอัตราส่วน 1:20, ^b เมื่อเทียบกับอัตราส่วน 1:40

3) ปัจจัยปริมาณน้ำ (%v/v)

จากการศึกษาการสกัดโดยทำการปรับเปลี่ยนปริมาณปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 10% v/v, 30% v/v และ 50% v/v เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ค่า peak height ที่ retention time 5.3 นาที พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยใช้ปริมาณน้ำ 10% v/v มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ 50% v/v และ 30% v/v ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 โดยปริมาณน้ำทั้ง 3 ค่า ได้ปริมาณสารสกัดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3) โดยทำการปรับเปลี่ยนปริมาณปริมาณน้ำ (%v/v) ที่ใช้ในการสกัด

ปริมาณน้ำ (%v/v)	Average peak height (mV $\pm$ SD)
10	114607.1 $\pm$ 32546.3
30	57521.333 $\pm$ 71.6023
50	97156.556 $\pm$ 4633.89



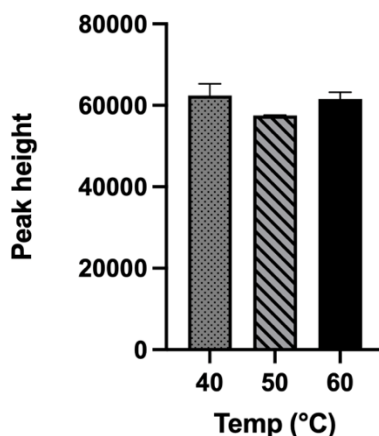
ภาพที่ 12 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัด (%v/v)

4) ปัจจัยอุณหภูมิ

จากการศึกษาการสกัดโดยทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 40, 50 และ 60 °C เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ค่า peak height ที่ retention time 5.6 นาที พบว่าการสกัดโดยใช้อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 °C ได้ปริมาณสารสกัดที่ใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 9 โดยทั้ง 3 อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ได้ปริมาณสารสกัดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3) โดยทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด

อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (°C)	Average peak height (mV $\pm$ SD)
40	62400.3 $\pm$ 2449.92
50	57521.3 $\pm$ 71.6023
60	61538.9 $\pm$ 1387.99



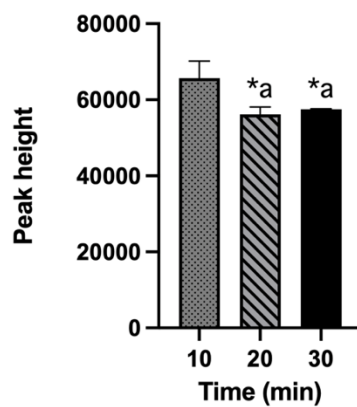
ภาพที่ 13 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

5) ปัจจัยระยะเวลาการสกัด

การศึกษาการสกัดโดยทำการปรับเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 10, 20 และ 30 นาที เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ค่า peak height ที่ retention time 5.6 นาที พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยใช้เวลา 10 นาที มีค่ามากที่สุด และการสกัดโดยใช้เวลา 20 และ 30 นาทีได้ปริมาณสารสกัดที่ใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 10 โดยการสกัดด้วยเวลา 10 นาทีมีค่าสูงกว่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.0332$ เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเวลา 20 และ 30 นาที (ภาพที่ 14)

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์สารสกัดจากผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย choline chloride-glycerol (1:3) โดยทำการปรับเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการสกัด

เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)	Average peak height (mV $\pm$ SD)
10	65715.3 $\pm$ 3653.43
20	56147.3 $\pm$ 1628.43
30	57521.3 $\pm$ 71.6023



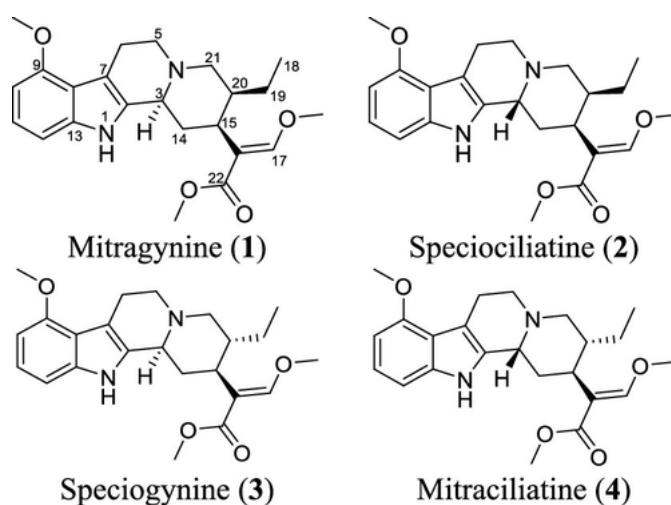
ภาพที่ 14 กราฟแท่งแสดงค่า peak height ที่ได้จากการสกัดโดยปรับเปลี่ยนระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด, * คือ $p < 0.0332$ ^a คือ เมื่อเทียบกับเวลา 10 นาที

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การสกัดสารมาตรฐานไมทราเจนิน

จากการสกัดผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย methanol และทำการสกัดแยกสารกลุ่มแอลคาลอยด์โดยวิธี acid-base extraction จากนั้นทำการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี และติดตามสารกลุ่มแอลคาลอยด์โดยใช้น้ำยาทดสอบ dragendorff's reagent และจากการติดตามสารสกัดที่ได้ด้วยเทคนิค ^1H NMR พบสัญญาณซึ่งเป็น characteristic ของสารกลุ่ม indole alkaloids จึงคาดว่าเป็นสารไมทราเจนินหรือสารอนุพันธ์อย่างใดอย่างหนึ่งที่เป็น enantiomer กับไมทราเจนินอีก 3 ตัว ได้แก่ speciociliatine, speciogynine และ mitraciliatine ซึ่งอาจทำการติดตามสารสกัดด้วยเทคนิค ^{13}C NMR เพิ่มเติมเพื่อให้สามารถระบุชนิดของสารที่สกัดได้อย่างเฉพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น



จากนั้นทำการนำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC ได้สารบริสุทธิ์น้ำหนัก 3.1 มิลลิกรัม (1.25%) ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Chittrakarn และคณะ ปี 2010 [23] ที่ทำการสกัดสารไมทราเจนินจากพืชใบกระท่อมด้วยวิธีการที่ใกล้เคียงกัน เมื่อนำสารมาวิเคราะห์หัตถ์ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) พบว่าเกิดการสลายตัวระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากพบว่าสัญญาณของสารสกัดมีการเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างในครั้งนี้อาจเกิดเนื่องมาจากสารสกัดมีการสลายตัวในสภาวะอุณหภูมิที่ร้อนจัดระหว่างกระบวนการ

ทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยจากงานวิจัยของ Stephanie Basiliere and Sarah Kerrigan ปี 2020 [24] มีรายงานว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °C อาจส่งผลให้สารไมทราเจนิน และอนุพันธ์เกิดการสลายตัวได้

5.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs)

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลาย DESs เนื่องจากไม่สามารถสกัดแยกสารไมทราเจนินเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้ การศึกษาจึงใช้การเปรียบเทียบความสูงของพีคที่ retention time 5.3 นาที ซึ่งเป็นพีคหลักที่พบในการสกัดด้วยตัวทำละลาย DESs เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการเปรียบเทียบปริมาณสารที่สกัดได้

จากการเตรียมสารละลาย DESs ได้แก่ choline chloride และ levulinic acid ในอัตราส่วนโมล 1:2 และสารละลาย choline chloride และ glycerol ในอัตราส่วนโมล 1:3 แล้วนำมาสกัดสารจากผงใบกระท่อมเทียบกับตัวทำละลาย methanol เพื่อศึกษาปัจจัยตัวทำละลาย พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ choline chloride-levulinic acid (1:2) และ choline chloride-glycerol (1:3) ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zheng-Meng Jiang และคณะ ปี 2018 [15] ที่ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดข้างต้นในการสกัดสารกลุ่ม indole alkaloids ซึ่งเป็นสารกลุ่มเดียวกับไมทราเจนินที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

จากการศึกษาปัจจัยอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลายโดยทำการทดลองสกัดในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1:20, 1:40 และ 1:60 พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยใช้อัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:20 มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ 1:40 และ 1:60 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ยิ่งอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายมีค่าเพิ่มขึ้น ปริมาณสารสกัดที่ได้จะเพิ่มขึ้นตาม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Herman และคณะ ปี 2021 [17] ที่ได้ทำการสกัดสาร total polyphenols content จากพืชใบกระท่อม โดยใช้ natural deep eutectic solvents เป็นตัวทำละลายและใช้คลื่นไมโครเวฟเป็นตัวช่วยในการสกัด โดยมีการปรับเปลี่ยนครั้งละ 1 ปัจจัยเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโดยมีการรายงานปัจจัยของอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพในการสกัด เนื่องจากเกี่ยวข้องกับพื้นที่ผิวสัมผัสของผงพืชตัวอย่างกับตัวทำละลาย โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด คือการที่ผงพืชสัมผัสตัวทำละลาย เนื่องจากหากใช้ปริมาณตัวทำละลายมากเกินไปจะเกิดความสิ้นเปลือง แต่ถ้าหากใช้ตัวทำละลายน้อยเกินไปจะทำให้กระบวนการสกัดเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์

จากการศึกษาปัจจัยปริมาณน้ำโดยทำการปรับเปลี่ยนปริมาณปริมาณน้ำที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 10% v/v, 30% v/v และ 50% v/v พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยใช้ปริมาณน้ำ 10% v/v มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ 50% v/v และ 30% v/v ตามลำดับ โดยจากงานวิจัยของ Zheng-Meng Jiang และคณะ ปี 2018 [15] มีรายงานว่า ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสกัดสารกลุ่ม

แอลคาลอยด์ คือ ค่าความหนืดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ซึ่งการเติมน้ำลงไปในตัวทำละลาย เป็นการทำให้ความหนืดลดลงส่งผลให้เกิดการถ่ายโอนมวลสารระหว่างพืชและตัวทำละลายได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นการสกัดโดยใช้ปริมาณน้ำที่เพิ่มขึ้นจึงควรได้ปริมาณสารสกัดที่เพิ่มขึ้นตาม ซึ่งผลที่ได้ไม่ สอดคล้องกัน และหากพิจารณาจากค่า SD พบว่ามีค่ากว้าง แสดงให้เห็นว่าผลการทดลองมีความ แปรปรวนสูง ซึ่งความแปรปรวนที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความคลาดเคลื่อนของ เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความผันแปรจากการทำการทดลองคนละช่วงเวลา รวมถึงเทคนิคใน การเตรียมสารของผู้วิจัย

จากการศึกษาปัจจัยอุณหภูมิโดยทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 40, 50 และ 60 °C พบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้จากทั้ง 3 อุณหภูมิมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย ของ Zheng-Meng Jiang และคณะ ปี 2018 [15] ที่มีรายงานว่า การปรับเปลี่ยนปัจจัยอุณหภูมิที่ใช้ ในการสกัดไม่ส่งผลต่อปริมาณสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาปัจจัยระยะเวลาการสกัดโดยทำการปรับเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ 10, 20 และ 30 นาที พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดโดยใช้เวลา 10 นาที มีค่ามากที่สุด และการ สกัดโดยใช้เวลา 20 และ 30 นาทีได้ปริมาณสารสกัดที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยหลักการ เดียวกับงานวิจัยของ Xiong Wei และคณะ ปี 2016 [25] ที่มีรายงานว่า การใช้เวลาในการสกัดที่มาก เกินไปร่วมกับการใช้ความแรงคลื่นเสียงในการสกัดที่สูงเกินไปอาจทำให้โครงสร้างของสารเกิดการ สลายตัวได้ จึงเป็นไปได้ว่าสารอาจเกิดการสลายตัวในระหว่างการสกัด ดังนั้นเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัด นานขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณสารสกัดลดลง

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจมีความแปรปรวนที่เกิดจากหลายปัจจัย เช่น ความคลาด เคลื่อนของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ความผันแปรที่เกิดจากการควบคุมสภาวะอื่น ๆ ที่อาจมีผล ต่อการสกัดไม่เพียงพอ รวมถึงเทคนิคในการเตรียมสารของผู้วิจัย อย่างไรก็ตาม สามารถพัฒนาต่อ ยอดการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดต่อไปโดยเพิ่มช่วงการเปลี่ยนแปลงในแต่ละปัจจัยให้มีความ กว้างมากขึ้น อาจทำให้ผลการทดลองและผลสรุปที่ได้ต่างไปจากในงานวิจัยนี้ หรือทำการศึกษาปัจจัย อื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น การปรับเปลี่ยนกำลังของคลื่นเสียงที่ใช้ในการสกัด เป็นต้น อาจทำให้พบปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการสกัด และเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการสกัดต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

ในการสกัดสารมาตรฐานไมทราไจนีนจากใบกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) พบว่าสารไมทราไจนีนเกิดการสลายตัวระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์จึงทำให้การศึกษานี้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญไมทราไจนีนจากใบกระท่อมได้

การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดสารไมทราไจนีนด้วยตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs) โดยทำการเปลี่ยนแปลงครั้งละ 1 ปัจจัย (single factor) และให้ปัจจัยอื่นคงที่ ได้แก่ ปริมาณน้ำ (10, 30 และ 50 %v/v) อุณหภูมิ (40, 50 และ 60°C) ระยะเวลาการสกัด (10, 20 และ 30 นาที) และอัตราส่วนสมุนไพรรตอตัวทำละลาย (1:20, 1:40 และ 1:60)

จากการศึกษาผลของปัจจัยชนิดของตัวทำละลายต่อการสกัด พบว่า methanol สกัดได้สารสำคัญปริมาณมากกว่าการใช้ตัวทำละลาย deep eutectic solvents (DESs) อย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่าตัวทำละลาย DESs ยังมีความสามารถในการสกัดสารได้ไม่เทียบเท่าตัวทำละลายดั้งเดิม จากนั้นนำ choline chloride-glycerol (1:3) มาเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการปรับเปลี่ยนที่ละปัจจัยเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด จากการศึกษามผลของปัจจัยอัตราส่วนสมุนไพรรตอตัวทำละลาย พบว่าอัตราส่วน 1:20 ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด นอกจากนี้พบว่าปริมาณน้ำ และอุณหภูมิไม่ได้ส่งผลต่อปริมาณสารสกัด แต่หากใช้ระยะเวลาการสกัดที่นานเกินไปอาจส่งผลให้โครงสร้างของสารเกิดการสลายตัว

บรรณานุกรม

1. กองควบคุมวัตถุเสพติดสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. กระท่อม (*kratom*). 2564 [cited 2565 1 สิงหาคม 2565]; Available from: <https://mnfda.fda.moph.go.th/narcotic/?p=6063>.
2. จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, พืชกระท่อม (*kratom*). 2560
3. สุทัศน์ มังคละคีรี, พืชของสารทำลายอินทรีย์ในโรงงานอุตสาหกรรม. 2557 [cited 2565 1 สิงหาคม 2565]; Available from: <http://php.diw.go.th/safety/wp-content/uploads/2014/02/2.4.pdf>.
4. ฌปักษ์ พิมพ์ดี, เคมีสีเขียว (*Green Chemistry*). 2560 [cited 2565 1 สิงหาคม 2565]; Available from: <https://www.scimath.org/lesson-chemistry/item/7167-green-chemistry>.
5. Kruegel, A.C., et al., *Synthetic and Receptor Signaling Explorations of the Mitragyna Alkaloids: Mitragynine as an Atypical Molecular Framework for Opioid Receptor Modulators*. Journal of the American Chemical Society, 2016. 138(21): p. 6754-6764.
6. Matsumoto, K., et al., *Antinociceptive action of mitragynine in mice: Evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors*. Life Sciences, 1996. 59(14): p. 1149-1155.
7. Tsuchiya, S., et al., *Effect of mitragynine, derived from Thai folk medicine, on gastric acid secretion through opioid receptor in anesthetized rats*. European Journal of Pharmacology, 2002. 443(1): p. 185-188.
8. Shaik Mossadeq, W.M., et al., *Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Mitragyna speciosa* Korth Methanolic Extract*. Medical Principles and Practice, 2009. 18(5): p. 378-384.
9. Parthasarathy, S., et al. *Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from Mitragyna Speciosa (Rubiaceae Family) Leaves*. Molecules, 2009. 14, 3964-3974 DOI: 10.3390/molecules14103964.

10. Chemat, F., M.A. Vian, and G. Cravotto *Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. 13, 8615-8627 DOI: 10.3390/ijms13078615.
11. Anxo, C.-C., et al., *Application of Green Extraction Techniques for Natural Additives Production*, in *Natural Food Additives*, A.P. Miguel and O. Paz, Editors. 2021, IntechOpen: Rijeka. p. Ch. 2.
12. Khandelwal, S., Y.K. Tailor, and M. Kumar, *Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations*. Journal of Molecular Liquids, 2016. 215: p. 345-386.
13. Warner, J.C., A.S. Cannon, and K.M. Dye, *Green chemistry*. Environmental Impact Assessment Review, 2004. 24(7): p. 775-799.
14. Torres-Vega, J., et al. *Green Extraction of Alkaloids and Polyphenols from Peumus boldus Leaves with Natural Deep Eutectic Solvents and Profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS*. Plants, 2020. 9, DOI: 10.3390/plants9020242.
15. Jiang, Z.-M., et al., *Green and efficient extraction of different types of bioactive alkaloids using deep eutectic solvents*. Microchemical Journal, 2019. 145: p. 345-353.
16. Ahmad, I., et al., *Enhanced Extraction of Total Polyphenols Content from Mitragyna Speciosa (Korth.) Havil Leaves using the Natural Deep Eutectic Solvent-based Microwave-assisted Extraction Method*. 2020.
17. Herman, H., et al., *Single Factor Effect of Natural Deep Eutectic Solvent Citric Acid-Glucose Based Microwave-Assisted Extraction on Total Polyphenols Content from Mitragyna speciosa Korth. Havil Leaves*. Pharmacognosy Journal, 2021. 13: p. 1109-1115.
18. Isnaeni, N., A. saefumillah, and H. Cahyana, *Preliminary Study of Isolation and Purification Mitragynine from Kratom Leaves*. Materials Science Forum, 2022. 1061: p. 173-179.
19. Amrianto, A., et al., *Mitragynine: a review of its extraction, identification, and purification methods*. 2021. 3: p. 165-171.

20. Ramanathan, S., et al. *Understanding the Physicochemical Properties of Mitragynine, a Principal Alkaloid of Mitragyna speciosa, for Preclinical Evaluation*. *Molecules*, 2015. 20, 4915-4927 DOI: 10.3390/molecules20034915.
21. Flores-Bocanegra, L., et al., *The Chemistry of Kratom [Mitragyna speciosa]: Updated Characterization Data and Methods to Elucidate Indole and Oxindole Alkaloids*. *Journal of Natural Products*, 2020. 83(7): p. 2165-2177.
22. Wolfson, A., C. Dlugy, and Y. Shotland, *Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities*. *Environmental Chemistry Letters*, 2007. 5(2): p. 67-71.
23. Chittrakarn, S., et al., *The neuromuscular blockade produced by pure alkaloid, mitragynine and methanol extract of kratom leaves (Mitragyna speciosa Korth.)*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010. 129(3): p. 344-349.
24. Basiliere, S. and S. Kerrigan, *Temperature and pH-Dependent Stability of Mitragyna Alkaloids*. *Journal of Analytical Toxicology*, 2020. 44(4): p. 314-324.
25. Xiong, W., et al., *Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from lotus plumule using response surface methodology*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016. 6(6): p. 382-388.

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ เรื่อง การพัฒนาวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคเคมีสีเขียว

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ญญ.ผศ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 8 มิถุนายน 2565 ถึงวันที่ 21 มีนาคม 2566

ระยะเวลาดำเนินการ 10 เดือน ตั้งแต่วันที่ 8 มิถุนายน 2565

รายรับ

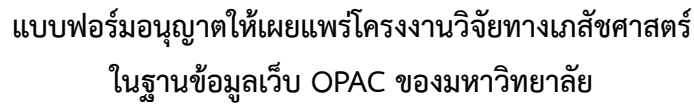
จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 15,000 บาท เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2566

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าสารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์	13,000	13,000	0
2. ค่าบริการวิเคราะห์	1,000	1,000	0
3. ค่าจัดทำเล่มรายงานและพิมพ์โปสเตอร์	1,000	1,000	0
รวม	15,000	15,000	0

(.....ธัญชนก ศิริรักษ์.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย



วันที่ 4 เม.ย. 2566