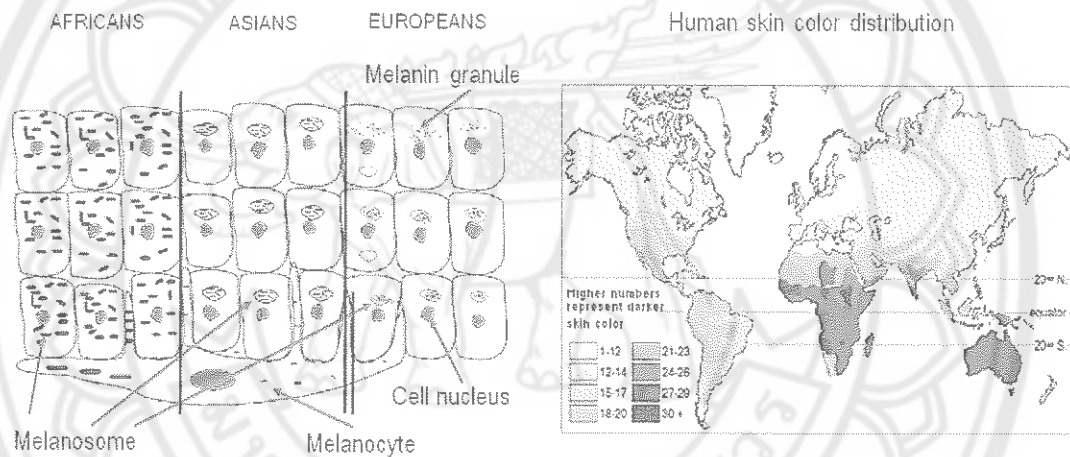


## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เซลล์สร้างเม็ดสีและเม็ดสีเมลานิน (melanocyte and melanin)

สีผิวที่พบเห็นในมนุษย์เป็นผลมาจากการกระจายตัวของเม็ดสีเมลานิน (melanin) ซึ่งผู้คนในแต่ละเชื้อชาติจะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไป (Juzeniene, et al., 2009)

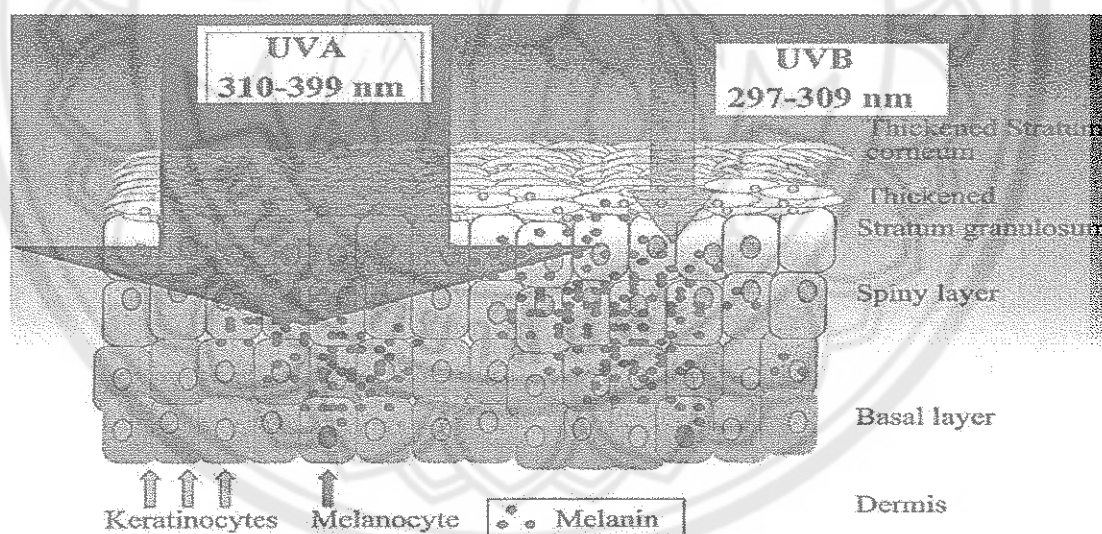


ภาพ 2 ความแตกต่างด้านสีผิวของผู้คนต่างเชื้อชาติในแต่ละภูมิภาคของทวีปซึ่งสีผิวแปรผันตามจำนวน ขนาด การรวมกลุ่มและการกระจายตัวของเมลานินไซมภายในเซลล์ keratinocyte โดยไม่เกี่ยวข้องกับจำนวนเซลล์สร้างเม็ดสี ซึ่งโดยปกติจำนวนเซลล์สร้างเม็ดสีของผู้คนแต่ละเชื้อชาติมีความคล้ายคลึงกัน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Juzeniene, et al., 2009; based on <http://anthro.palomar.edu/vary/>.

เม็ดสีเมลานินผลิตมาจากเซลล์สร้างเม็ดสี (melanocyte) เซลล์ชนิดนี้มีประมาณร้อยละ 8 ของเซลล์ในชั้นหนังกำพร้า ซึ่งนอกจากที่จะพบเซลล์สร้างเม็ดสีได้ที่ชั้นผิวหนังแล้วยังสามารถพบได้บริเวณลูกตา ก้านสมองและหูชั้นใน สำหรับที่ชั้นผิวหนังพบได้ที่บริเวณโคนรากขนและชั้นในสุด

ของหนังกำพร้า (stratum basale) (Bolognia and Orlow, 2008) โดยทุก ๆ 10 เซลล์ของผิวหนังชั้นในสุดจะเป็นเซลล์สร้างเม็ดสี 1 เซลล์ (Graham-Brown and Bourke, 2007) เม็ดสีเมลานินจะมีสองลักษณะ คือ สีน้ำตาลถึงดำของยูเมลานิน (brown-black eumelanin) และสีเหลืองถึงแดงของฟีโอเมลานิน (yellow-red pheomelanin) ซึ่งถูกหุ้มอยู่ในถุงที่เรียกว่าเมลานินโซม (melanosome) ภายหลังจากการสร้างเม็ดสีบรรจุในเมลานินโซม จะเกิดการเคลื่อนย้ายไปยังเซลล์ keratinocyte ที่อยู่รอบ ๆ บริเวณชั้นผิวหนังที่อยู่เหนือขึ้นไป (Brenner and Hearing, 2008) ผ่านทาง dendrite ของเซลล์สร้างเม็ดสี ทำให้เกิดสีผิวขึ้น (Roberta, et al., 2006) สำหรับความสำคัญของเม็ดสีเมลานินคือ ปกป้องการเข้าทำลายสารพันธุกรรม (DNA) จากการได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยวิธีการดูดกลืนและกระจายแสง (Park, et al., 2008) การ quenching oxidative free radicals ที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยการจัดวางตำแหน่งของเม็ดสีเมลานินจะอยู่เหนือนิวเคลียสด้านที่ได้รับแสงจากดวงอาทิตย์ ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ keratinocyte (Brenner and Hearing, 2008)

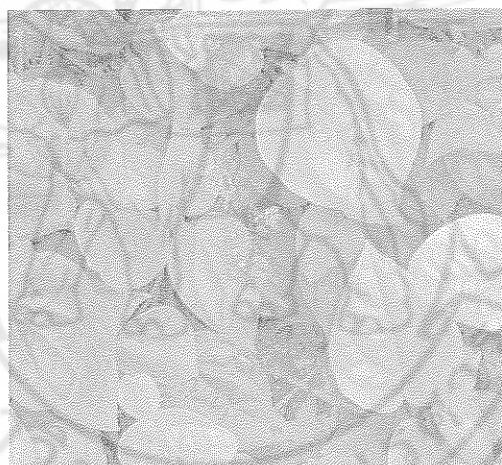


ภาพ 3 การทำหน้าที่ปกป้องการเข้าทำลายสารพันธุกรรม (DNA) ของเม็ดสีเมลานินจากการได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ตชนิดเอและบี

ที่มา: Garland, F., et al., 2003

สำหรับกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินประกอบด้วย 4 ระยะ โดยในระยะที่ 1 เป็นระยะที่ยังไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน เมื่อเข้าสู่ระยะที่ 2 เม็ดสีเมลานินจะถูกสร้างขึ้นในปริมาณเล็กน้อย จนกระทั่งในระยะที่ 4 เป็นระยะที่มีการผลิตเม็ดสีเมลานินในปริมาณมากที่สุด สำหรับผู้ที่มีสีผิวคล้ำจะมีเม็ดสีเมลานินอยู่ในระยะที่ 4 เป็นจำนวนมากกว่าผู้ที่มีผิวสีแทนซึ่งจะมีเม็ดสีเมลานินอยู่ในระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ส่วนผู้ที่มีสีผิวขาวจะมีเม็ดสีเมลานินอยู่ในระยะที่ 3 ถึงแม้ว่าผู้ที่มีสีผิวเข้มและผิวขาวจะมีสีผิวที่แตกต่างกันมากแต่ปริมาณของเซลล์สร้างเม็ดสีจะไม่มี ความแตกต่าง ความแตกต่างของสีผิวจะขึ้นอยู่กับขนาด การกระจายตัวและอัตราการสลายตัวของเมลานินภายในเซลล์ keratinocyte (Bolognia and Orlov, 2008)

พลู (*Piper betle* Linn.)



ภาพ 4 พลู (*Piper betle* Linn.)

- ชื่อไทย (Thai name) : พลู  
 ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) : *Piper betle* Linn.  
 วงศ์ (Genus) : Piperaceae  
 ชื่อสามัญ (Common name) : Betel Vine  
 ชื่ออื่นๆ (Other names) : พลูจีน, พลูเหลือง, พลูหลวง (ภาคกลาง),  
 ชีเก้อ, พลูเป้ายวน, ชีเก(ใต้), พลู(ทั่วไป), ฟู  
 (พายัพ), ชีเกะ(นราธิวาส), ก้อเจี้ย(แต่จิว),  
 จิวเจียง(จีนกลาง)

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Characteristic botany)

ลำต้น ไม้เถาเนื้อแข็ง รากฝอยออกบริเวณข้อใช้ยึดเกาะ ข้อโป่งนูน

ใบ เดี่ยว เรียงสลับ รูปหัวใจ กว้าง 8-12 เซนติเมตร ยาว 12-16 เซนติเมตร มีกลิ่น

### เฉพาะตัวและมีรสเผ็ด

ดอก ช่อ ออกที่ซอกใบ ดอกย่อยขนาดเล็กอัดแน่นเป็นรูปทรงระบอก แยกเพศ สีขาว

ผล เป็นผลสด กลมเล็กเบียดอยู่บนแกน พลูมีหลายพันธุ์ เช่น พลูเหลือง

### พลูทองเหลือง

พลูเป็นพืชใน Family Piperaceae มีชื่อท้องถิ่นว่า เป๋ายวน ซี้เก้อ พลูจีน ฯลฯ ลักษณะเป็นไม้เลื้อย มีข้อและปล้องชัดเจน มีใบเดี่ยวคล้ายใบโพธิ์ ปลายแหลม หน้าใบมัน มีสีเขียวอมเหลือง ออกดอกรวมกันเป็นช่อแน่น (พูกิ่ง ตริสุโกศล, 2544) มีถิ่นการแพร่กระจายพันธุ์อยู่ในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะภาคพื้นทวีปของมหาสมุทรแปซิฟิกในเอเชียตะวันออกเฉียง ซึ่งผู้คนบางประเทศนิยมนำใบสดของพลูมาเคี้ยวร่วมกับผลแห้งของพืชตระกูลปาล์มที่มีชื่อว่า *Areca catechu* และปูนแดง (calcium hydroxide) เรียกว่า การเคี้ยวหมากพลู (Norton, et al., 1998)

พลูให้สารสกัดในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) เป็นองค์ประกอบสำคัญโดยเฉพาะสารยูจีนอล (eugenol) และอนุพันธ์ ซึ่งมีรายงานถึงการใช้อย่างมีประสิทธิภาพของสารกลุ่มดังกล่าวในหลายด้านในตำรายาไทยใช้ใบพลู 3-4 ใบ ขยี้หรือตำจนละเอียด ผสมเหล้าโรงเล็กน้อย ทาบริเวณที่เป็นผื่นแดง แก้ลมพิษ (รุจิณา อรรถดิษฐ์ และคณะ, 2530) สารสกัดจากใบพลูมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านเชื้อรา (anti-fungal) (Evans, et al., 1984; Liao, et al., 1999) โดยในปี ค.ศ. 2005 กลุ่มนักวิทยาศาสตร์ที่สนใจคุณสมบัติของสารสกัดจากพลู ได้ทำการสกัดและใช้สารสกัดจากใบพลูทดสอบการต่อต้านเชื้อราที่มีชื่อ *Cladosporium* sp. (Arambewela, et al., 2005) และในปี 2007 มีรายงานเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพของสารสกัดพลูในการต่อต้านเชื้อราที่มีชื่อ *Aspergillus flavus* (Charoenwattana, 2007) นอกจากนี้สารสกัดพลูยังถูกใช้เป็นสารระงับเชื้อ (anti-septic) และสารกำจัดหนอนพยาธิ (anti-helminthic) (Evans, et al., 1984; Liao, et al., 1999) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดเปอร์ออกไซด์ของไขมัน (lipid peroxidation) จากการเหนี่ยวนำโดยรังสีแกมมา ( $\gamma$ -ray) และมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยต่อต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Bhattacharya, et al., 2005; Sarkar, et al., 2008; Singh, et al., 2009) ทั้งยังช่วยในการต่อต้านโรคเบาหวาน (anti-diabetic) (Arambewela, et al., 2005) สารยูจีนอลถูกใช้เป็นยาสลบใบปลา (อัญญา สงแก้ว และคณะ, 2550) สาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทคอล (4-allyl-pyrocatechol)

ที่พบในใบพลูมีฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรีย (anti-bacteria) และช่วยระงับกลิ่นปาก (Ramji, et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดชั้นน้ำจากใบพลูช่วยลดคราบแบคทีเรียในช่องปากได้ (Razak, et al., 2006) ภายหลังจากมีรายงานถึงคุณสมบัติของสารสกัดชั้นน้ำ (crude aqueous extract) ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชื่อ *Streptococcus mutans* (Nalina and Rahim, 2007) ในส่วนของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบพลู พบว่ามีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (NCTC 10148), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 10662), *Staphylococcus epidermidis* (NCTC 4276), *Staphylococcus aureus* (NCTC 8532), (*Streptococcus pyogenes*) (Arambewela, et al., 2005) และ *Mycobacterium tuberculosis* B19-3 (human) ในมนุษย์ (Gautam, et al., 2007) ส่วนสารสกัดจากช่อดอกของพลูมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระและต่อต้านการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือด (Lei, et al., 2003) อีกทั้งสารสกัดชั้นน้ำจากใบพลูยังมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (Dasgupta and De, 2004) โดยพบว่าสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล แควิเบทอล (chevibetol) (Jitesh, et al., 2006) และสารคาวิคอล (chavichol) เป็นอนุพันธ์ของยูจีนอลที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (Maisuthisakul, 2007) สารสกัดจากใบพลูที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีผลในการทำลายเชื้อโปรโตซัวบางชนิดจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) (Sarkar, et al., 2008) และในปี ค.ศ. 2009 Row และ Ho ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหย สารสกัดจากเมทานอลและสารสกัดชั้นน้ำจากใบพลูในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย การทำลายตัวอ่อนของยุงและการต่อต้านอนุมูลอิสระ (Row and Ho, 2009) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสาร hydroxycavichol ที่แยกได้จากใบพลูมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แซนทีน ออกซิเดส (xanthine oxidase) ภาวะสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) และแซนทีน (xanthine) ให้กลายเป็นกรดยูริก (uric acid) สาเหตุของโรคเกาต์ (Gout) (Murata, K., et al., 2009)

ผลข้างเคียงของการเคี้ยวหมากร่วมกับใบพลูเป็นสาเหตุทำให้ฟันเปลี่ยนสีเป็นแดงถึงดำ และเกี่ยวข้องกับอาการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง (precancerous lesion) Oral submucous fibrosis, Oral leukoplakia และมะเร็งช่องปาก (oral squamous cell carcinoma) (Norton, et al., 1998) และในปี ค.ศ. 1997 และ 2001 มีรายงานจากประเทศไต้หวันและประเทศไทย ตามลำดับ เกี่ยวกับการใช้ใบพลูหนึ่งประคบผิวหนังบริเวณใบหน้าเพื่อหวังผลให้ใบหน้าขาว โดยวางใบพลูที่ผ่านการนึ่งและผึ่งให้เย็นลงบนใบหน้าบริเวณที่มีผิวสีคล้ำแต่พบผลข้างเคียงที่ทำให้เกิดเป็นดวงตางขาวขนาด

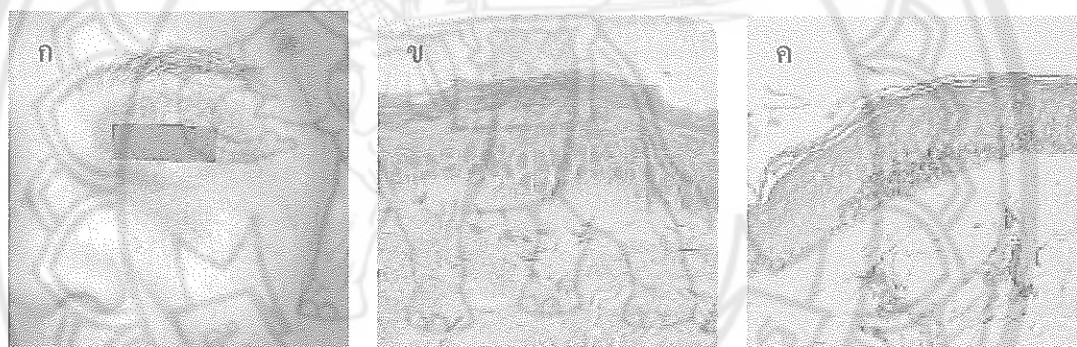
เล็กจำนวนมากในรอยดำขนาดใหญ่ (Leukomelanosis) (Liao, et al., 1999; พุกกลิ่น ตวีสุโกศล, 2544)

### สีผิวดำและรอยต่างขาว (Leukomelanosis) จากการใช้ใบพลู

ในบางประเทศ มีการเผยแพร่วิธีการทำให้ใบหน้าขาวจากการใช้ใบพลูที่ผ่านการนึ่ง มาทำการประคบบนผิวหนัง จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1999 มีรายงานผู้ป่วยจำนวน 15 คน จากประเทศไต้หวันและในปี ค.ศ. 2001 มีรายงานผู้ป่วยจำนวน 1 คน จากประเทศไทยเกี่ยวกับการใช้ใบพลูนี้ ประคบบนใบหน้าเพื่อหวังผลให้ใบหน้าขาวขึ้น โดยผู้ป่วยในหลายช่วงอายุมาพบแพทย์ เนื่องจากอาการข้างเคียงที่ได้รับภายหลังการใช้ จากการสอบถามอาการและระยะเวลาการใช้ ใบพลูนี้ของผู้ป่วย พบว่าระยะเวลาที่ผู้ป่วยประคบใบพลูนี้บนใบหน้าอยู่ในช่วงครึ่งชั่วโมง จนถึง 3 ชั่วโมงและที่มากที่สุดคือการประคบข้ามคืน ผู้ป่วยทั้ง 15 ราย จากประเทศไต้หวันกล่าวถึงอาการ ในช่วง 3 วันแรกของการใช้โดยเริ่มจากอาการคัน (stinging reaction) และมีอาการแดงของผิวหนัง (erythematous reaction) ผู้ป่วยบางรายมีอาการเจ็บ (painful sensation) ร่วมด้วย อาการผื่น และเจ็บแสบพบอยู่ในระยะเวลาไม่นานจึงหายไป แต่ปรากฏอาการผิวหนังแดงยังคงอยู่ได้นานถึง 2 วัน จากนั้นจึงเริ่มเกิดอาการสีผิวดำและรอยต่างขาวขึ้น ซึ่งโดยภาพรวมสามารถแบ่งอาการ ดังกล่าวออกได้เป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 การขาวขึ้นของผิวหนัง (bleaching stage) เป็นระยะ ที่สีผิวขาวขึ้น มีลักษณะอ่อนนุ่มแต่มีผลข้างเคียงจากอาการผื่นคัน (stinging reaction) มีอาการ เจ็บ (painful sensation) และแสบแดง (erythematous reaction) ต่อมาในระยะที่ 2 เกิดรอยดำ อย่างเห็นได้ชัด (mottled hyperpigmentation stage) บริเวณที่มีการประคบและอาจมีอาการ อักเสบภายหลังจากการเพิ่มขึ้นของเม็ดสีเมลานิน (ภาพ 5 ก) ส่วนในระยะสุดท้ายเป็นระยะที่มีรอย ต่างขาวเกิดขึ้นเป็นจุดเล็ก ๆ กระจายอยู่บนรอยดำขนาดใหญ่ (confetti-like depigmentation) (ภาพ 6 ก)

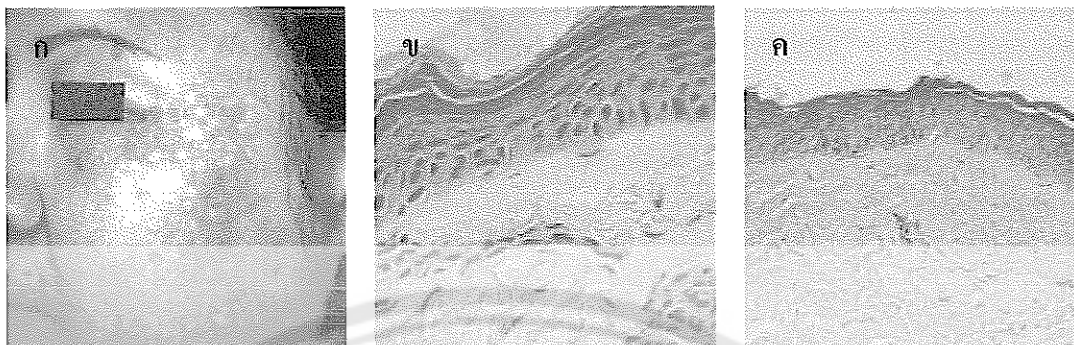
ทางคณะผู้วิจัยจากประเทศไต้หวัน ได้ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อบริเวณที่เกิดอาการ ผิดปกติของผู้ป่วยไปทำการตรวจสอปเพื่อดูลักษณะทางโครงสร้างของเซลล์ในชั้นผิวหนัง ด้วยวิธีการย้อมสี Hematoxylin-eosin ซึ่งเป็นสีที่ใช้สำหรับย้อมเซลล์ในส่วนของนิวเคลียส และไซโตพลาสซึมพบว่าทั้งในระยะ mottle hyperpigmentation และในระยะ confetti-like hypopigmentation มีการกระจายตัวของเซลล์ Melanophage ใน papillary dermis (ภาพ 5 ข)

และเมื่อใช้วิธี Masson-Fontana stain ที่อาศัยคุณสมบัติที่ว่าเม็ดสีเมลานินมีความสามารถในการรีดิวซ์สารละลายของ ammonium silver nitrate จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ metallic silver ที่มีสีดำ โดยไม่ต้องการตัว reduce ชนิดอื่นเข้าช่วยเร่งหรือทำให้เกิดปฏิกิริยา ผลการย้อมด้วย Masson-Fontana stain พบว่าในระยะ mottle hyperpigmentation มีการเพิ่มขึ้นของเม็ดสีเมลานินเป็นจำนวนมากในชั้นผิวหนัง แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ confetti-like hypopigmentation พบว่าไม่ปรากฏเม็ดสีเมลานิน อาจเป็นไปได้ว่าในระยะนี้เกิดการตายของเซลล์สร้างเม็ดสีในชั้นผิวหนัง ทำให้ไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานินเกิดขึ้น (ภาพ 5 ก และภาพ 6 ค) อีกทั้งเมื่อทำการตรวจการมีอยู่ของเซลล์สร้างเม็ดสีโดยวิธี S-100 stain พบว่าให้ผลเป็นลบทั้งระยะ mottle hyperpigmentation และระยะ confetti-like hypopigmentation (ภาพ 7 ก และ 7 ข)



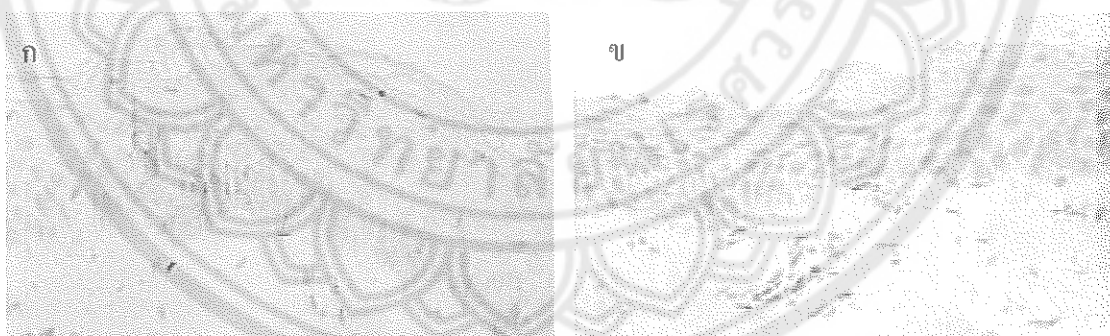
- ภาพ 5 ก) อาการผิวดำและรอยด่างขาวในระยะที่ 2 mottle hyperpigmentation พบรอยดำขนาดใหญ่กระจายทั่วใบหน้าทั่วบริเวณที่มีการใช้ใบพลูหนึ่งประคบ
- ข) Hematoxylin-eosin stain ของระยะ mottle hyperpigmentation พบเซลล์เมลานโนฟาร์จ (melanophage) กระจายตัวอยู่ใน papillary dermis
- ค) Masson-Fontana stain ของระยะ mottle hyperpigmentation จะเห็นจำนวนของเม็ดสีเมลานินที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

ที่มา: ดัดแปลงจาก Liao, et al., 1999



ภาพ 6 ก) อาการผิวดำและรอยด่างขาวในระยะที่ 3 confetti-like hypopigmentation พบ รอยด่างขาวกระจายอยู่บนรอยดำขนาดใหญ่  
 ข) Hematoxylin-eosin stain ของระยะ confetti-like hypopigmentation เซลล์สร้าง เม็ดสีมีการหายไป  
 ค) Masson-Fontana stain ของระยะ confetti-like hypopigmentation เม็ดสี เมลานินมีการหายไปจากชั้นหนังกำพร้า

ที่มา: ดัดแปลงจาก Liao, et al., 1999



ภาพ 7 ก) mottle hyperpigmentation และ ข) confetti-like hypopigmentation ทั้งสองกลุ่ม เมื่อย้อมสีด้วยวิธี S-100 stain เพื่อตรวจการมีอยู่ของเซลล์สร้างเม็ดสีให้ผลเป็น ลบและมีการหายไปของเม็ดสีเมลานินบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่พบการ หายไปของเม็ดสีเมลานินซึ่งตรวจสอบโดยวิธี Masson-Fontana stain

ที่มา: ดัดแปลงจาก Liao, et al., 1999

กระบวนการสกัดและองค์ประกอบทางเคมีของสารจากพลู (Extraction and chemical components from *Piper betle* Linn)

ปัจจุบันกระบวนการสกัดสารอินทรีย์จากพืชสมุนไพรถูกพัฒนาขึ้นอย่างมาก สำหรับกระบวนการสกัดสารเคมีจากพลูเพื่อให้ได้องค์ประกอบที่ตรงตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนั้น นักวิทยาศาสตร์ในหลายกลุ่มงานวิจัยได้มีการแยกองค์ประกอบและศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากพลูโดยวิธีการดังนี้

### 1. การสกัดด้วยไอน้ำ (Steam Extraction)

การแยกสารโดยใช้วิธีการกลั่นธรรมดาในบางครั้งอาจไม่เหมาะสมกับการแยกของเหลวออกจากสิ่งเจือปนต่างๆ ที่สามารถละลายในของเหลวนั้นได้ โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการสกัดเพื่อแยกสารที่มีจุดเดือดสูง หากใช้การกลั่นแบบธรรมดา สารที่ต้องการสกัดอาจเกิดการสลายตัวหรือเกิดการออกซิไดซ์เมื่อได้รับความร้อนสูง ดังนั้น การนำวิธีการสกัดด้วยไอน้ำมาใช้ในการแยกองค์ประกอบหรือสกัดสารจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือก โดยสารที่ต้องการแยกออกจากกันต้องมีคุณสมบัติ คือ ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำและระเหยได้ง่าย เช่น น้ำมันหอมระเหย (Organic Chemistry Laboratory II, 2006) การสกัดด้วยไอน้ำอาศัยหลักการเดียวกันกับการกลั่นโดยทั่วไป เป็นการทำให้ของเหลวที่ต้องการสกัด กลั่นตัวออกมาพร้อม ๆ กับไอน้ำ โดยอาศัยหลักการ คือ ของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน เมื่ออยู่รวมกัน ความดันไอของของเหลวทั้งสองจะไม่มีอิทธิพลต่อกัน แต่ความดันไอของของผสมจะเท่ากับผลรวมของความดันย่อย (Partial Pressure) ของสารทั้งสอง เมื่อความดันไอของสารทั้งสองรวมกันเท่ากับความดันบรรยากาศเหนือของผสมที่ต้องการกลั่นของเหลวจะเกิดการเดือด ตัวอย่างเช่น ของผสม A และ B มีคุณสมบัติไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน จะเดือดเมื่อมีความดันรวมเท่ากับความดันบรรยากาศหรือ  $P_A^o + P_B^o = 1$  ความดันบรรยากาศ (คณาจารย์ภาควิชาเคมี, 2548) และเมื่อใช้กฎของอาโวกาโดร (Avogadro's law) คือ ก๊าซที่มีปริมาตรเท่ากันที่อุณหภูมิและความดันเดียวกันจะมีจำนวนโมเลกุลที่เท่ากัน และถ้าก๊าซทั้งสองชนิดมีปริมาตรที่เท่ากัน ณ อุณหภูมิเดียวกันกับความเข้มข้นของก๊าซแต่ละชนิด จะขึ้นอยู่กับความดันย่อย ซึ่งในที่นี้ คือ ความดันไอของสาร ถ้า  $C_A$  คือความเข้มข้นของสาร A และ  $C_B$  คือความเข้มข้นของสาร B ตามลำดับ จะได้ความสัมพันธ์ของความดันและความเข้มข้นสามารถแสดงได้ดังสมการดังนี้

$$C_A = kP_A \text{ และ } C_B = kP_B$$

มวลของสารและความเข้มข้น มีความสัมพันธ์กันดังนี้

$$W_A = C_A M_A \text{ และ } W_B = C_B M_B$$

หรือ 
$$C_A = W_A/M_A \text{ และ } C_B = W_B/M_B$$

จากสมการความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้น สามารถหาความสัมพันธ์ของความดันไอ และมวลของสารทั้งสองคือ

$$W_A/M_A = kP_A \text{ และ } W_B/M_B = kP_B$$

ดังนั้นจะได้สัดส่วนความดันของสารทั้งสองเป็น

$$W_A/M_A \times W_B/M_B = P_A/P_B$$

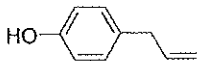
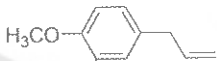
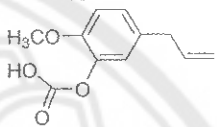
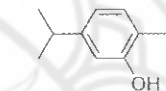
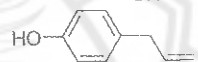

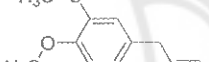
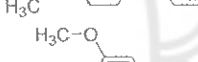
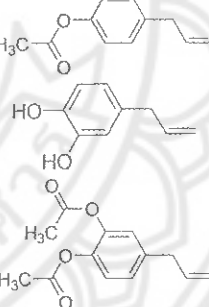
เมื่อคูณด้วย  $M_A/M_B$  ทั้งสองข้างจะได้

$$W_A/W_B = P_A M_A / P_B M_B$$

สมการดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการคำนวณเพื่อหาปริมาณของสารที่กลั่นตัวออกมาได้ จากหลักการดังกล่าวจะเห็นว่าในการกลั่นด้วยไอน้ำ ของเหลวที่สกัดได้จะกลั่นตัวออกมาที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเดือดของสารเสมอ ดังนั้นวิธีการนี้จึงนิยมนำมาแยกสารที่มีจุดเดือดสูงและสลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิที่สูง เช่น การสกัดน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสารดังกล่าวมักเกิดการสลายตัวง่ายเมื่อสกัดด้วยการกลั่นแบบธรรมดาและสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงเวลาใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำคือ สารที่จะสามารถนำมากลั่นด้วยไอน้ำได้ต้องมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ สารที่กลั่นตัวออกมากับไอน้ำสามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยการแยกเอาน้ำและใช้การดูดความชื้นเพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ (Organic Chemistry Laboratory II, 2006)

ในปี ค.ศ. 1989 มีรายงานถึงการศึกษารายการประกอบของน้ำมันหอมระเหยซึ่งพบสารยูจีนอลและอนุพันธ์เป็นองค์ประกอบหลัก ดังตาราง 1

ตาราง 1 สารยูจีนอลและอนุพันธ์ องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากใบพลู

Chemicals	Chemical structure
Chavicol	
Chevibetol	
Chavibetol	
Cavacrol	
Eugenol	
Methyl eugenol	
Eugenol acetate	
4-Allyl-pyrocatechol	
4-Allyl-pyrocatechol diacetate	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Rawat, et al., 1987

ในปี ค.ศ. 1996/1997 มีรายงานถึงวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากลำต้นใต้ดินที่มีลักษณะคล้ายราก (rhizome) เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโทรสโกปี (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy; GC-MS) ควบคู่กับเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR) ซึ่งสามารถวิเคราะห์องค์ประกอบของสารเคมีได้มากกว่า 40 ชนิด ดังตาราง 2 (Thanh, 1996/1997) และตัวอย่างข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสาร แควิเบทอล (chevibetol) และ 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล (4-allyl-pyrocatechol) แสดงดังต่อไปนี้

3-Hydroxy-4-methoxyallylbenzene (Chevibetol; CHV) โครงสร้างสาร CHV แสดงในตาราง 1

Infrared spectroscopy (film):  $3,509\text{ cm}^{-1}$  (H-O stretching band),  $3,070\text{ cm}^{-1}$  (C-H stretching band of aromatic),  $3,003\text{ cm}^{-1}$  (C-H stretching band of alkene),  $1,638\text{ cm}^{-1}$  (C=C- stretching band of alkene),  $1,509\text{ cm}^{-1}$  และ  $1,350\text{ cm}^{-1}$  (-C-C- stretching of aromatic),  $1,236\text{ cm}^{-1}$ ,  $1,175\text{ cm}^{-1}$ ,  $1,129\text{ cm}^{-1}$ ,  $995\text{ cm}^{-1}$ ,  $865\text{ cm}^{-1}$ ,  $760\text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (CHV ใน  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) ค่า chemical shift ( $\delta$ ) ที่  $3.28\text{ ppm}$  แสดงรูปแบบสเปกตรัมแบบ doublet ( $J$ ; 6.5 Hz) ของ 2 โปรตอนจาก ethylene group ที่ต่ออยู่กับ aromatic ring ( $\text{Ar-CH}_2$ -) ส่วนค่า chemical shift ที่  $3.85\text{ ppm}$  แสดงสเปกตรัมแบบ singlet จาก 3 โปรตอน methoxy group ( $-\text{OCH}_3$ ) ส่วนในช่วง  $5.01$  ถึง  $5.09\text{ ppm}$  แสดงสเปกตรัมแบบ multiplex จาก 2 โปรตอน olefin ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) ที่  $5.58\text{ ppm}$  แสดงพีค broad จาก 1 โปรตอนของ hydroxyl group ที่ต่ออยู่กับ aromatic ring ( $\text{Ar-OH}$ ) และในช่วง  $5.82$  ถึง  $5.99\text{ ppm}$  แสดง multiplex peak ของ 1 โปรตอนจากหมู่ olefin ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) และสุดท้ายค่า chemical shift ในช่วง  $6.63$  ถึง  $6.79\text{ ppm}$  แสดงรูปแบบสเปกตรัมแบบ multiplex ของ 3 โปรตอนจาก aromatic ring ( $\text{Ar-H}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (CHV ใน  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) แสดงค่า chemical shift ( $\delta$ ) ของคาร์บอน 9 ตำแหน่ง ดังต่อไปนี้  $38.1\text{ ppm}$ ,  $55.7\text{ ppm}$ ,  $114.8\text{ ppm}$ ,  $118.2\text{ ppm}$ ,  $122.4\text{ ppm}$ ,  $130.4\text{ ppm}$ ,  $132.2\text{ ppm}$ ,  $141.4\text{ ppm}$  และ  $147.5\text{ ppm}$

Mass spectroscopy ( $m/z$ , rel. int.): 56 (57), 66 (39), 78 (67), 92 (100), 103 (43), 105 (40), 121 (31), 132 (25), 150 (26), 165 ( $M + 1^+$ ; 37) (Rathee, *et al.*, 2006)

3,4-Dihydroxyallylbenzene (4-allyl-pyrocatechol; APC) โครงสร้างสาร APC แสดงในตาราง 1

Infrared spectroscopy (film):  $3,398\text{ cm}^{-1}$  (H-O stretching band),  $1,606\text{ cm}^{-1}$  (C=C- stretching band of alkene),  $1,444\text{ cm}^{-1}$  และ  $1,282\text{ cm}^{-1}$  (-C-C- stretching of aromatic),  $1,195$ ,  $1,114\text{ cm}^{-1}$ ,  $964\text{ cm}^{-1}$ ,  $863\text{ cm}^{-1}$ ,  $789\text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (APC ใน  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz) ค่า chemical shift ( $\delta$ ) ที่  $3.28\text{ ppm}$  แสดงรูปแบบสเปกตรัมแบบ doublet ( $J$ ; 6.5 Hz) ของ 2 โปรตอนจาก ethylene group ที่ต่ออยู่กับ aromatic ring ( $\text{Ar-CH}_2$ -) ส่วนค่า chemical shift ที่  $4.99$  ถึง  $5.08\text{ ppm}$  แสดงสเปกตรัมแบบ multiplex จาก 2 โปรตอน olefin ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) ที่  $5.36\text{ ppm}$  แสดงพีค broad จาก 2 โปรตอนของ

hydroxyl group ที่ต่ออยู่กับ aromatic ring (Ar-OH) ค่า chemical shift ในช่วง 5.80 ถึง 6.01 ppm แสดงสเปกตรัมแบบ multiplex จาก 1 โปรตอนของหมู่ olefin (-C=C-) และในช่วง 6.59 ถึง 6.79 ppm แสดงรูปแบบสเปกตรัมแบบ multiplex ของ 3 โปรตอนจาก aromatic ring (Ar-H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (APC ใน  $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz): แสดงค่า chemical shift ( $\delta$ ) ของคาร์บอน 8 ตำแหน่ง ดังต่อไปนี้ 38.2 ppm, 114.6 ppm, 118.2 ppm, 122.4 ppm, 131.2 ppm, 132.5 ppm, 139.7 ppm และ 145.1 ppm

Mass spectroscopy ( $m/z$ , rel. int.): 56 (38), 66 (82), 78 (100), 91 (51), 103 (100), 111 (30), 123 (100), 132 (100), 150 ( $M^+$ , 100) (Rathee, et al., 2006)

## 2. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์ในด้านเคมีอินทรีย์ โดยเฉพาะงานแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์ หลักการของการสกัด คือ การใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการแยกออกจากส่วนผสม ซึ่งสามารถแบ่งกระบวนการสกัดออกได้เป็น 3 วิธีการ ดังนี้

2.1 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกจากของผสมที่เป็นของแข็ง (Liquid-Solid Extraction; LSC)

2.2 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกจากของผสมที่เป็นของเหลว (Liquid-Liquid Extraction; LLC)

2.3 การสกัดโดยอาศัยปฏิกิริยากรด-เบสเพื่อการแยกสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรดแก่ กรดอ่อน เป็นกลางหรือเป็นเบสออกจากกัน (Acid-Base Extraction) (คณาจารย์ภาควิชาเคมี 2548)

ในกระบวนการสกัด การเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อละลายสารที่ต้องการออกจากของแข็งผสมจะทำได้ดีหรือไม่ขึ้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลายของเหลว รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดจะนานหรือสั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวถูกละลายที่อยู่ในสารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง หากตัวถูกละลายเพียงดูดซับอยู่ในบริเวณผิวของของแข็งแล้ว กระบวนการสกัดสามารถทำได้ง่ายและใช้เวลาน้อย แต่ถ้าตัวถูกละลายถูกดูดซับอยู่ในเนื้อของแข็งอย่างเหนียวแน่น กระบวนการสกัดย่อมจะใช้เวลานานกว่าและในกรณีที่การกระจายของตัวของตัวทำละลายเข้าสู่ภายในของแข็งเกิดขึ้นได้ช้ามาก

สามารถบดของแข็งให้ละเอียดก่อนที่จะทำการสกัด การสกัดของแข็งด้วยตัวทำละลายสามารถนำมาประยุกต์ใช้เกี่ยวกับการสกัดสารทางชีววิทยา สารอินทรีย์ ตลอดจนเกลือของสารอินทรีย์ได้ เช่น การสกัดแยกแคลเซียมออกจากสทรอนเซียม ถ้าแคลเซียมอยู่ในรูปของเกลือไนเตรตจะสกัดแยกออกจากสารตัวอย่างได้โดยใช้แอลกอฮอล์ที่บริสุทธิ์ผสมกับเอทิลอีเทอร์ หรือถ้าต้องการแยกโซเดียมออกจากโพแทสเซียม สามารถทำได้โดยการสกัดเกลือโซเดียมเปอร์คลอเรตออกจากสารตัวอย่างด้วยเอทิลอะซิเตต เป็นต้น วิธีการสกัดของแข็งสามารถทำได้โดย 2 วิธี คือ



ตาราง 2 องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากลำต้นไต้ดินหรือรากของพญา

Compound	Retention	Percentage	Identification methods	Compound	Retention	Percentage	Identification methods
<i>alpha</i> -pinene	928	0.7	GC, MS	<i>alpha</i> -opaene	1370	1.7	GC, MS, NMR
camphene	940	1.8	GC, MS, NMR	<i>beta</i> -bourbonene	1377	tr	GC, MS
sabinene	962	0.1	GC, MS	<i>beta</i> -elemene	1384	0.3	GC, MS
<i>beta</i> -pinene	967	0.5	GC, MS	<i>beta</i> -caryophyllene	1411	1.6	GC, MS
myrcene	982	0.2	GC, MS	<i>alpha</i> -humulene	1444	0.6	GC, MS
<i>alpha</i> -terpinene	1008	tr	GC, MS	allo-aromadendrene	1451	tr	GC, MS
<i>para</i> -cymene	1010	tr	GC, MS	<i>gamma</i> -muurolene	1466	2.3	GC, MS, NMR
1,8-cineole	1016	0.9	GC, MS	germacrene D	1470	4.6	GC, MS, NMR
limonene	1019	0.1	GC, MS	<i>alpha</i> -muurolene	1489	2.7	GC, MS
<i>gamma</i> -terpinene	1047	0.2	GC, MS	<i>gamma</i> -cadinene	1501	3.5	GC, MS, NMR
terpinolene	1077	tr	GC, MS	<i>cis</i> -calamenene	1505	0.8	GC, MS
linalool	1084	tr	GC, MS	<i>delta</i> -cadinene	1510	11.7	GC, MS, NMR
camphene hydrate	1127	0.2	GC, MS	cubenene	1520	0.6	GC, MS
borneol	1144	0.1	GC, MS	<i>alpha</i> -cadinene	1525	0.7	GC, MS
terpinen-4-ol	1158	0.6	GC, MS	(E)-nerolidol	1547	1.7	GC, MS, NMR
<i>alpha</i> -terpineol	1169	0.3	GC, MS	ledol	1585	0.8	GC, MS
saifrole	1259	tr	GC, MS	epicubendi	1609	4.7	NMR
bornyl acetate	1265	tr	GC, MS	T-cadinol + T-murolol	1621	20.7	NMR
<i>para</i> -eugenol	1327	tr	GC, MS	<i>delta</i> -cadinol	1623	3.5	GC, MS
<i>delta</i> -elemene	1330	tr	GC, MS	<i>alpha</i> -cadinol	1632	26.2	GC, MS, NMR
<i>ortho</i> -eugenol	1339	0.9	GC, MS	cadalene	1650	0.4	GC, MS
<i>alpha</i> -cubebene	1344	0.4	GC, MS	other compounds		3.5	

วิธีที่ 1 การสกัดตัวถูกละลายที่อยู่ในสารตัวอย่างของแข็ง โดยสารนั้นเพียงแค่ดูดซับที่ผิวและสภาวะของการละลายในตัวสกัดมีค่าสูง การสกัดนั้นสามารถทำได้ง่ายโดยการนำสารตัวอย่างบดใส่ลงในบีกเกอร์หรือขวดปากกว้างแล้วทำการเติมตัวสกัดหรือตัวทำละลายลงไป จากนั้นทำการคนด้วยเครื่องคนหรือถ้าใช้ขวดปากกว้างที่มีฝาปิดสนิทได้ก็สามารถที่จะให้เครื่องเขย่าและเมื่อทำการคนเป็นเวลานานพอจนแน่ใจว่าตัวถูกละลายละลายในตัวสกัดหมดแล้ว ให้ใช้วิธีการกรองเอาตะกอนของแข็งแยกออกจากสารละลายที่มีตัวถูกละลายละลายอยู่ด้วยเทคนิคนี้สามารถที่จะแยกตัวถูกละลายออกจากสารตัวอย่างของแข็งได้ เทคนิคนี้จึงเหมาะสมสำหรับใช้ในการแยกสารประกอบประเภทเกลือของสารอินทรีย์และเป็นเทคนิคที่สำคัญในกระบวนการชะล้าง (Leaching operation)

วิธีที่ 2 ถ้าตัวถูกละลายเป็นสารประกอบอินทรีย์หรือสารทางชีววิทยา ซึ่งโมเลกุลของสารประกอบที่ต้องการสกัดยึดจับอย่างเหนียวแน่นกับของแข็งตัวอย่างที่นำมาสกัด โดยที่สภาวะการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลายทำได้ไม่ดีในสภาวะการสกัดแบบปกติ การสกัดจะสมบูรณ์ได้อาจต้องใช้ระยะเวลาที่นานกว่าหรือใช้ความร้อนเข้าช่วยในการสกัด ซึ่งในกระบวนการสกัดจำเป็นที่จะต้องใช้เครื่องมือสกัดและการสกัดอย่างต่อเนื่อง โดยเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดอย่างต่อเนื่องมี 2 แบบ คือ

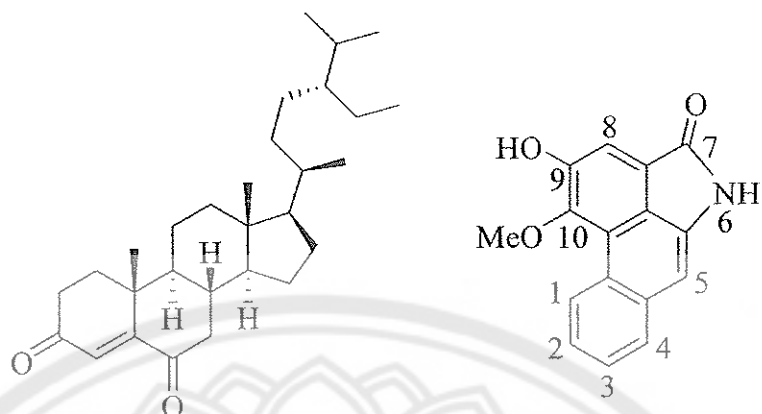
1. Continuous-infusion extraction
2. Discontinuous-infusion extraction

เครื่องมือสำหรับทำการสกัดแบบธรรมดา เรียกว่า Continuous-infusion extractor สามารถทำการสกัดได้โดยเมื่อตัวทำละลายที่บรรจุใน round Bottom Flask และได้รับความร้อน จะเกิดการระเหยขึ้นมากระทบส่วนควบแน่น (condenser) จากนั้นตัวทำละลายจะกลั่นตัวหยดลงสู่ส่วนบรรจุสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งเกิดการชะสารกลับลงสู่ round Bottom Flask ซึ่งกระบวนการเช่นนี้จะเกิดเรื่อยไปตลอดการสกัด ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีการสกัดแบบ Continuous-infusion extraction นี้มีข้อดี คือ ใช้ตัวทำละลายหรือตัวสกัดไม่มากนัก เพราะสามารถถูกกลั่นให้บริสุทธิ์ และนำมาใช้งานใหม่ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่เสียเวลาเฝ้าดู แต่มีข้อเสีย คือ ตัวทำละลายที่ไหลผ่านมาสกัดตัวถูกละลายจะมีเวลาสัมผัสกับตัวถูกละลายเพียงเล็กน้อย เครื่องกลั่นสกัดที่ถูกออกแบบ

ให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น คือ เครื่องสกัดแบบ Discontinuous-infusion extractor หรือที่รู้จักกันในชื่อ ซอกเลต (Soxhlet extractor) (ธวัชชัย ศิริวิบูลย์, 2545)

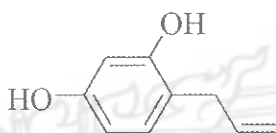
ในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการศึกษา "พลู" ในประเทศศรีลังกา เกี่ยวกับสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดของพลูชนิดย่อย 6 ประเภท ได้แก่ Malabulath (ใบมีสีเขียวอมเหลือง) Galdalu (ใบมีสีเขียวอมเหลือง) Mahamanera (ใบมีสีเขียวอมเหลือง) Kudamanera (ใบมีสีเขียวอมเหลือง) Ratadalu (ใบมีสีเขียว) และ Nagawalli (ใบมีสีเขียวแซมเหลือง) โดยการสกัดน้ำมันหอมระเหยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ การสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ใช้วิธีการสกัดร้อนแบบต่อเนื่องด้วยซอกเลต (Soxhlet) ซึ่งองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยหลังจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี แมสสเปกโทรสโกปี (GC-MS) พบว่าสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ เซฟโรล (safrole) ยูจีนอล (eugenol) 4-อัลลิล-ไพโรคาทีคอล ไดอะซิเตต (4-allyl-pyrocatechol diacetate) คาวิเบทอล อะซิเตต (chavibetol acetate) และเบต้า เฟลแลนดรีน (beta-phyllandrene) (Arambewela, et al., 2005)

มีรายงานถึงการแยกองค์ประกอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากรากของต้นพลู โดยใช้วิธีการสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) และแอลกอฮอล์ (alcohol) ซึ่งสารสกัดที่ได้ในขั้นแรก (crude extracts) ภายหลังจากการแยกองค์ประกอบด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี (silica gel column chromatography) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์เมื่อนำไปผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เบนซีนเป็นตัวชะ คือ กรดสเตียริก (stearic acid) และเบต้าไซโตสเตอรอล (beta-sitosterol) และเมื่อใช้เบนซีน (benzene) เป็นตัวชะพบว่าสารเคมีที่แยกได้ คือ diketosteroids เช่น Stigmast-4-en-3, 6-dione ส่วนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และนอร์มอลบิวทานอล (n-butanol) พบว่าภายหลังจากการผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เบนซีนเป็นตัวชะให้สาร 4-allyl-resorcinol เมื่อชะด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกันสามารถแยกได้องค์ประกอบทางเคมีที่มีชื่อว่า aristolactam A-II (Ghosh, and Bhattacharya, 2005)



ก) Stigmast-4-en-3,6-dione

ข) aristolactam A-II



ค) 4-allyl-resorcinol

ภาพ 8 โครงสร้างทางเคมีของสารอินทรีย์ที่สกัดได้จากใบพลู ก) stigmast-4-en-3,6-dione ข) aristolactam A-II และ ค) 4-allyl-resorcinol

ที่มา: Ghosh, and Bhattacharya, 2005

1. Stigmast-4-en-3,6-dione โครงสร้างสารแสดงในภาพ 8ก (Ghosh and Bhattacharya, 2005)

Infrared spectroscopy  $\nu_{\max}$  (KBr) 2920  $\text{cm}^{-1}$ , 2840  $\text{cm}^{-1}$ , ที่ 1675  $\text{cm}^{-1}$  รูปแบบสเปกตรัมของ  $\alpha, \beta$ -unsaturated ketone, 1455  $\text{cm}^{-1}$ , 1240  $\text{cm}^{-1}$  และ 1220  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  ของ Stigmast-4-en-3,6-dione ใน  $\text{CDCl}_3$  แสดงค่า chemical shift ( $\delta$ ) ที่ 0.72 ppm ของ 3 โปรตอนตำแหน่ง Me-18 รูปแบบพีคแบบ singlet ในช่วง 0.74 ถึง 0.95 ppm แสดงรูปแบบพีค multiplex ของ 12 โปรตอนหมู่ methyl 4 ตำแหน่งภายในโครงสร้าง ค่า chemical shift ที่ 1.16 ppm แสดงรูปแบบพีคชนิดที่เรียกว่า singlet จาก 3 โปรตอนของหมู่ methyl ตำแหน่งที่ 19 และค่า chemical shift ที่ 6.17 ppm แสดงรูปแบบพีคชนิดที่เรียกว่า singlet จาก 1 โปรตอนของโปรตอนตำแหน่งที่ 4

EIMS (70 eV)  $m/z$  (relative intensity, %): 426( $[M]^+$ , 25), 412(9), 411(12), 408(10), 398(11), 384(7), 285(30), 275(13), 257(10), 243(25), 229(13.5), 189(10), 175(10), 149(10), 137(66), 133(16), 97(23), 69(48), 55(91)

2. 4-allyl-resorcinol โครงสร้างสารแสดงในภาพ 8ค (Ghosh and Bhattacharya, 2005)

Infrared spectroscopy  $\nu_{\max}$  (thin film) ค่าการดูดกลืนรังสี IR ที่ช่วง 3400-3250  $\text{cm}^{-1}$  แสดงพีด O-H stretching รูปแบบพีด broad ของหมู่ hydroxyl ที่ 3060  $\text{cm}^{-1}$ , 2950  $\text{cm}^{-1}$ , 2890  $\text{cm}^{-1}$  และ 1630  $\text{cm}^{-1}$  เป็นรูปแบบพีดการดูดกลืนรังสี IR ของหมู่ alkene (C=C) ส่วนที่ 1600  $\text{cm}^{-1}$ , 1520  $\text{cm}^{-1}$  และ 1400  $\text{cm}^{-1}$  เป็นรูปแบบพีดของ aromatic C=C skeletal in-plane vibration ที่ 1355  $\text{cm}^{-1}$  แสดงรูปแบบพีด C-O stretching ของฟีนอล ที่ 1285  $\text{cm}^{-1}$  และ 1200  $\text{cm}^{-1}$  เป็นสเปกตรัมของหมู่ hydroxyl รูปแบบการสั่นแบบ bending ของฟีนอล สุดท้ายคือรูปแบบการสั่นแบบอื่น ๆ ที่ปรากฏ คือที่ 1115  $\text{cm}^{-1}$ , 970  $\text{cm}^{-1}$ , 865  $\text{cm}^{-1}$ , 815  $\text{cm}^{-1}$ , 790  $\text{cm}^{-1}$  และ 760  $\text{cm}^{-1}$  (out of plane bending)

$^1\text{H-NMR}$  ของ 4-allyl-resorcinol ใน  $\text{CDCl}_3$  แสดงค่า chemical shift ( $\delta$ ) ที่ 3.25 ppm เป็นรูปแบบ doublet ของ ( $J$ ; 9 Hz) ของ 2 โปรตอนจาก ethylene group ที่ต่ออยู่กับ aromatic ring ( $\text{Ar-CH}_2$ -) ส่วนที่ 5.05 ppm แสดงสเปกตรัมแบบ multiplex จาก 2 โปรตอน ที่ olefin ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) ที่ 5.69 ppm แสดงพีด broad จาก 2 โปรตอนของ hydroxyl group ที่ต่ออยู่กับ aromatic ring ( $\text{Ar-OH}$ ) ที่ 5.91 ppm แสดงสเปกตรัมแบบ multiplex จาก 1 โปรตอน ที่ olefin ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) ค่า chemical shift ที่ 6.61 ppm แสดงรูปแบบของพีดแบบ doublet of doublet ( $J$ ; 9, 1.8 Hz) ของ 1 โปรตอนตำแหน่งที่ 6 ของวงอะโรมาติก ค่า chemical shift ที่ 6.70 ppm แสดงรูปแบบของพีดแบบ doublet ( $J$ ; 1.8 Hz) ของ 1 โปรตอนตำแหน่งที่ 2 ของวงอะโรมาติก และที่ 6.78 ppm แสดงรูปแบบของพีดแบบ doublet ( $J$ ; 9 Hz) ของ 1 โปรตอนตำแหน่งที่ 5 ของวงอะโรมาติก

EIMS  $m/z$  (relative intensity): 150 ( $[M]^+$ , 86), 123(100), 95(56), 67(43)

3. Aristolactam A-II โครงสร้างสารแสดงในภาพ 8ข (Ghosh and Bhattacharya, 2005)

Infrared spectroscopy  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3425, 1675(C=O), 1620, 1500, 1455, 1415, 1365, 1325, 1290, 1270, 1230, 1195, 1120, 1060, 1035, 890, 875, 835, 735, 690

$^1\text{H-NMR}$  ของ Aristolactam A-II ใน  $\text{DMSO}-d_6$  แสดงค่า chemical shift ( $\delta$ ) ที่ 4.04 ppm รูปแบบ singlet ของ 3 โปรตอนที่มีหมู่ methoxy! ตำแหน่ง 10 ในโครงสร้างหลัก ส่วนที่

7.12 ppm เป็นรูปแบบ singlet พีคของโปรตอนตำแหน่งที่ 5 ในโครงสร้างหลัก ค่า chemical shift ที่ 7.54 ppm แสดง multiplex พีคของ 2 โปรตอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ในโครงสร้างหลัก ส่วนที่ 7.76 ppm เป็น singlet พีคของโปรตอนตำแหน่งที่ 8 และที่ 7.93 แสดง multiplex พีคของโปรตอนตำแหน่งที่ 4 ค่า chemical shift ที่ 9.27 ppm แสดง multiplex พีคของโปรตอนตำแหน่งที่ 1 ค่า chemical shift ที่ 10.19 ppm แสดง singlet พีคของโปรตอนหมู่ hydroxy ( $D_2O$  exchangeable,  $-OH$ ) และที่ 10.63 ppm แสดง broad singlet พีคของโปรตอนหมู่ amine ( $D_2O$  exchangeable,  $-NH$ )

EIMS(70 eV)  $m/z$  (relative intensity, %): 265 ( $[M^+]$ , 100), 250(55), 222(28), 166(34), 150(7), 139(21), 133(8), 105(7), 83(8), 69(12), 60(9), 55(13), 44(18)

การแยกองค์ประกอบของสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์ (Purification)

เทคนิคโครมาโตกราฟี (Chromatography Technique)

โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคและวิธีการแยกอีกประเภทหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสามารถนำไปใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณและการแสดงเอกลักษณ์หรือใช้ในงานทางคุณภาพวิเคราะห์ โครมาโตกราฟีเป็นการทำให้ส่วนผสมของสารแยกออกจากกันเป็นส่วน ๆ เกิดการกระจายตัวระหว่างเฟสสองเฟส คือ เฟสที่เคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) (คณาจารย์ภาควิชาเคมี 2548)

1. ทฤษฎีการชะทางโครมาโตกราฟี (Theories of Elution Chromatography)

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ไหลลงยังส่วนบนของคอลัมน์ จะเกิดการแบ่งส่วนกันระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ เมื่อทำการเติมเฟสเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์อีก คือ เติมตัวชะจะเกิดการผลักดันด้วยแรงขับให้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสารตัวอย่างละลายอยู่เกิดการเคลื่อนที่ลงสู่ส่วนล่างของคอลัมน์ สารตัวอย่างที่ถูกชะลงมาจะพบกับเฟสอยู่กับที่ส่วนใหม่ และเกิดการแบ่งส่วนกันระหว่างเฟสทั้งสองอีกครั้ง เป็นเช่นนี้เรื่อยไปจนสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ในที่สุด เพราะว่าการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างนั้นสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากการพาของเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้น อัตราเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในคอลัมน์จึงขึ้นอยู่กับเศษส่วนของเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ถ้าสารตัวอย่างที่นำมาใส่ในคอลัมน์ มีตัวถูกละลายมากกว่าหนึ่งชนิด และตัวถูกละลายมีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายหรือสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน

ต่างกัน พบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายที่ต่างกัน จะทำให้สามารถแยกตัวถูกละลายทั้งสองชนิดออกจากกันได้ หากโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีพฤติกรรมที่เหมือนกัน การเคลื่อนที่ของโมเลกุลตัวถูกละลายจะสามารถเคลื่อนที่ได้เท่ากันหมดเช่นกันและไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่เนื่องจากโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวนั้นมีพฤติกรรมไม่เหมือนกัน บางโมเลกุลเคลื่อนที่เร็ว บางโมเลกุลเคลื่อนที่ช้า พฤติกรรมดังกล่าวทำให้สารสามารถเกิดการแยกออกจากกันได้ (ธวัชชัย ศรีวิบูลย์, 2545)

## 2. โครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบาง (Thin-Layer Chromatography; TLC)

โครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการแยกองค์ประกอบ การยืนยันความบริสุทธิ์ของสาร โดยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทางโครมาโตกราฟีชนิดอื่น ๆ นับว่ายังมีข้อบกพร่องในเรื่องความถูกต้องแม่นยำ แต่มีบางคุณลักษณะที่ทำให้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ ประหยัดค่าใช้จ่าย ในกระบวนการวิเคราะห์ สามารถใช้ตรวจสอบสารได้หลายตัวอย่างในครั้งเดียว ใช้แยกสารที่มีปริมาณน้อย ๆ และประหยัดเวลา อีกทั้งยังสามารถปรับใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ได้อย่างหลากหลาย โครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางอาจเป็นแบบ Analytical Thin Layer Chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคเบื้องต้นที่ใช้ในการตรวจและวิเคราะห์จำนวนองค์ประกอบของสารผสม สามารถใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณน้อย ๆ และอีกประเภทหนึ่งคือ Preparative Thin Layer Chromatography ซึ่งโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางชนิดนี้เป็นการประยุกต์จาก Analytical Thin Layer Chromatography ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เหมาะสำหรับใช้ในการแยกสารที่มีปริมาณมากขึ้น ซึ่งภายหลังจากกระบวนการแยกแถบ การแยกของสารตัวอย่างสามารถขูดออกจาก plate เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์หรือนำไปแยกองค์ประกอบในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาที่กำลังดำเนินอยู่ว่าสมบูรณ์หรือไม่และใช้หาตัวดูดซับและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีชนิดอื่น

หลักการและเทคนิคของการวิเคราะห์โครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางมีความเหมือนกับวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษทุกประการ แตกต่างกันตรงที่ในโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบาง เฟสอยู่กับที่จะถูกฉาบอยู่บนแผ่นค้ำจุนที่เป็นแผ่นแก้วหรืออะลูมิเนียมแทนที่จะ

ป  
๑๕  
๔๙๕  
-๗๖  
๗๔๒๙  
๒๕๖๓

1.5533739

๒๘ ส.ย. ๒๕๕๔



เป็นกระดาษ โดยที่ตัวดูดซับจะถูกฉาบเป็นแผ่นบางๆ บนแผ่นแก้วหรือพลาสติก หรืออะลูมิเนียมที่เป็น  
ตามปกติของแข็งที่ใช้เป็นตัวดูดซับจะถูกฉาบเป็นแผ่นบางๆ มีความหนาระหว่าง 0.1-10 มิลลิเมตร  
วิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางกว่าวิธีโครมาโตกราฟี  
แบบกระดาษ เพราะสามารถที่จะเลือกใช้เฟสอยู่กับที่ได้หลากหลายชนิด สำหรับตัวทำละลาย  
ที่ทำหน้าที่เป็นตัวชะหรือตัว Develop ที่สามารถใช้กับโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ จะสามารถ  
ใช้ในงานโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางได้ทั้งหมด โดยการเลือกของแข็งที่เป็นตัวดูดซับ  
และตัวชะที่เป็นตัวเข้าคู่กันได้อย่างถูกต้องและเหมาะสมจะทำให้สามารถแยกสารได้อย่างดี

วิธีการทำงานของโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางนั้น สารที่ต้องการแยกจะถูกจุดลง  
บนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางที่ปลายด้านหนึ่งเป็นจุดเล็ก ๆ นำแผ่นโครมาโตกราฟี  
แบบแผ่นเยื่อบางที่เตรียมขึ้นนี้จุ่มในภาชนะที่มีตัวทำละลายบรรจุอยู่ โดยนำปลายด้านที่มีสารจุด  
อยู่จุ่มลงไปในตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ซึ่งจะพาสารบนตัวดูดซับเคลื่อนที่  
ไปตามแผ่นโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบางโดยการซึมตามรูขนาดเล็ก ในขณะที่เดียวกันตัวดูดซับ  
จะพยายามดึงหรือยึดเหนี่ยวเอาสารนั้นไว้ตามความสามารถในการละลายและความสามารถในการ  
การถูกดูดซับ จึงทำให้สารที่เป็นองค์ประกอบเคลื่อนที่ได้ในระยะทางไม่เท่ากัน เกิดการแยกออก  
จากกันอัตราส่วนของระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางสูงสุดที่ตัวทำละลาย  
เคลื่อนที่จะมีค่าคงที่ เรียกว่าค่า Retention Factor ( $R_f$ ) และเป็นค่าเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด  
ดังนั้นสารที่ต่างกันจึงมีค่า  $R_f$  ที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามสารที่มีค่า  $R_f$  เท่ากันไม่จำเป็นต้องเป็นสาร  
ชนิดเดียวกัน เพราะปกติค่า  $R_f$  จะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของตัวดูดซับ ชนิดของตัวทำละลาย  
และความหนาแน่นของตัวดูดซับที่เคลือบบน plate

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

ในการศึกษาการแยกของสารที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเยื่อบาง  
สามารถสังเกตเห็นจุดการเคลื่อนที่ของสารได้จากการเรืองแสงภายใต้หลอด fluorescence  
ด้วยแสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและการย้อมสีสามารถใช้ได้ทั้งการย้อมสีด้วย vanillin

ซึ่งเตรียมได้จากการนำ vanillin 15 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 250 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร หรือการย้อมสีด้วยเหล็กคลอไรด์ (Ferric Chloride) เตรียมได้จาก 1 % เหล็ก (III) คลอไรด์ ในสารละลายร้อยละ 50 ของเมทานอลในน้ำ จากนั้นนำมาให้ความร้อนก็จะปรากฏจุดที่เกิดการแยกของสารฟีนอลิกบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Jork, et al., 1990)

### 3. คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

หลักการของคอลัมน์โครมาโตกราฟีเหมือนกับหลักการของโครมาโตกราฟีโดยทั่ว ๆ ไป คอลัมน์ที่ใช้เป็นหลอดแก้วกลวง ปลายข้างหนึ่งจะมีการทำให้เล็กลงเพื่อที่จะต่อเข้ากับตัวควบคุมการไหลของตัวทำละลาย โดยขนาดของคอลัมน์มีได้หลายขนาด ตั้งแต่เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ถึง 5 เซนติเมตร และยาว 10 ถึง 50 เซนติเมตร ความสูงและขนาดของเฟลอยู่กับที่ซึ่งบรรจุอยู่ภายในคอลัมน์จะมีผลต่ออัตราการไหลของเฟลเคลื่อนที่ ซึ่งถ้าเฟลอยู่กับที่มีขนาดเล็กและบรรจุภายในคอลัมน์สูงมาก ๆ จะมีผลทำให้อัตราการไหลของเฟลเคลื่อนที่ช้ามากและใช้เวลาในการแยกนาน สามารถแก้ไขปัญหการไหลที่ช้าได้โดยการต่อเครื่องมือกับเครื่องปั๊มที่ดูดอากาศออกเพื่อลดความดันและจะไปมีผลในการเพิ่มอัตราการไหลของเฟลเคลื่อนที่ให้เร็วขึ้น (อวัชชัย ศิริวิบูลย์, 2545)

### การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี

การหาโครงสร้างของสารอินทรีย์ต้องอาศัยข้อมูลทั้งทางด้านปฏิกิริยาเคมี ข้อมูลทางด้านคุณสมบัติทางกายภาพและข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีประเภทต่าง ๆ การทดสอบทางเคมีจะให้ข้อมูลทางด้านองค์ประกอบว่ามีธาตุต่าง ๆ อะไรบ้าง เป็นกรด เบสหรือเป็นกลาง การวิเคราะห์ธาตุและเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีจะให้น้ำหนักโมเลกุลของสาร รวมทั้งข้อมูลด้านอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหาโครงสร้าง ดังนี้

#### 1. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก สำหรับใช้ในการศึกษาทางด้านเคมีอินทรีย์ (Stanley, 1987) มีพื้นฐานคล้ายกับอินฟราเรด

สเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy; IR) และอัลตราไวโอเล็ตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet Spectroscopy; UV) กล่าวคือ ผลการวิเคราะห์ที่ได้ออกมาเป็นสเปกตรัม ภายใต้สนามแม่เหล็ก สารตัวอย่างสามารถที่จะดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความถี่ของวิทยุ (radio frequency) และให้ข้อมูลออกมาในรูปแบบนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมซึ่งสามารถจะบอกได้ว่า นิวเคลียสที่ดูดกลืนพลังงานนั้นมีสภาพแวดล้อมเป็นอย่างไร นิวเคลียสนั้นมีกี่นิวเคลียสและอยู่ใน ตำแหน่งใดของโมเลกุล (Robert, et al., 2005) เทคนิคทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์และคาร์บอน 13 เอ็นเอ็มอาร์ (Stanley, 1987)

## 2. อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy)

อินฟราเรดเป็นเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ตรวจสอบ พิสูจน์ และศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลของสารได้ในทุกสถานะ เกี่ยวข้องกับการสั่นและการหมุนของโมเลกุล อินฟราเรดเป็นช่วงหนึ่งของสเปกตรัมของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีเลขคลื่น (wave number) อยู่ในช่วงประมาณ 12,800-10 ต่อเซนติเมตร หรือช่วงความยาวคลื่นจาก 0.78-1,000 ไมโครเมตร พบว่าเมื่อโมเลกุลของสารเคมีดูดกลืนพลังงานจากรังสีอินฟราเรดจะทำให้โมเลกุลของสารอยู่ใน สภาวะกระตุ้น มีพลังงานสูงกว่าสภาวะพื้น จากการได้รับพลังงานอย่างพอเหมาะกับสภาวะทรานซิชัน แล้วเกิดการคู่ควบอย่างพอดีระหว่างสนามไฟฟ้าจากการแผ่รังสีกับสารนั้น เมื่อดูดกลืนพลังงาน แล้วจะทำให้เกิดโมเมนต์ขั้วคู่ของสารที่เปลี่ยนไป โดยเกิดขึ้นบริเวณหมู่ฟังก์ชัน ดังนั้นอินฟราเรด เป็นเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีที่ใช้ในการตรวจสอบจำนวนหมู่ฟังก์ชันของสาร (แมน อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2534)

## 3. แมสสเปกโทรสโกปี (Mass Spectroscopy)

แมส สเปกโทรสโกปีเป็นวิธีการทางฟิสิกส์ ซึ่งทำให้สารกลายเป็นไอออนแล้วแยก ไอออนกับส่วนที่เกิดการเสื่อมสลายของไอออนออกจากกันตามค่ามวลต่อประจุของไอออน เหล่านั้น ให้ผลการวิเคราะห์ออกมาในรูปแบบแมสสเปกตรัม ใช้ในการยืนยันน้ำหนักโมเลกุลของสาร (วิชัย ธีวตระกูล และคณะ, 2526)

## การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Animal Cell Culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เป็นเทคนิคพื้นฐานที่สำคัญเกี่ยวกับเทคโนโลยีเซลล์สัตว์ โดยเป็นเทคนิคที่ว่าด้วยกรรมวิธีการรักษาดำรงความมีชีวิต การเจริญ และการพัฒนาของเซลล์ ภายใต้สภาวะนอกร่างกายอย่างต่อเนื่องและยาวนาน ซึ่งมีผลให้ศึกษาเซลล์ หรือนำเซลล์ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนามาช้านาน หลังจากเกิดทฤษฎีเซลล์ และปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ไปใช้กันอย่างแพร่หลายทางชีววิทยาและชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งก่อให้เกิดความรู้เพิ่มเติมมากมายเกี่ยวกับเซลล์สัตว์ จนสามารถนำเซลล์สัตว์ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ได้ เซลล์เพาะเลี้ยงมีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้มากมาย อย่างไรก็ตามการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จได้นั้นผู้เลี้ยงเซลล์จะต้องมีความสามารถในการเลี้ยงเซลล์ให้อยู่รอดได้ อีกทั้งยังสามารถทวีจำนวนหรืออาจแสดงคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงไปสู่เซลล์ชนิดอื่น (differentiation) ตามสื่อสัญญาณที่มีผลกับเซลล์ (cell signaling) (Freshney, 2005)

### 1. การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

โดยทั่วไปเซลล์สัตว์มีการเจริญแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

- 1.1 เซลล์เกาะผิว (anchorage dependent cell)
- 1.2 เซลล์แขวนลอย (suspended cell)

การที่จะเป็นเซลล์รูปแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้เซลล์เกาะผิวบางชนิด อาจมีการเปลี่ยนแปลงเกิด transformation กลายเป็นเซลล์เกาะผิวที่สามารถเจริญแขวนลอยในอาหารในระบบการเลี้ยงกวนหรือในอาหารวันกิ่งแช่แข็งได้ ดังนั้นในกระบวนการเลี้ยงเซลล์จึงควรที่จะทราบเทคนิคการเลี้ยงเซลล์ในแต่ละชนิดเพื่อความเหมาะสมกับชนิดของเซลล์ที่ต้องการเลี้ยง

### 2. การรักษาสภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง

โดยทั่วไปการรักษาสภาพเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถทำได้โดย

- 2.1 การเปลี่ยนถ่ายอาหารให้กับเซลล์
- 2.2 การถ่ายเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงไปสู่สภาวะเลี้ยงใหม่ (subculture)
- 2.3 การเก็บเซลล์แช่แข็ง

### 3. การเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ปกติจะมีรูปแบบการเจริญเป็นแบบซิกมอยด์ (sigmoid) ซึ่งแสดงถึงการปรับตัวของเซลล์ การปรับสภาพแวดล้อม การที่พื้นที่ผิวและอาหารเพียงพอต่อการสร้างเซลล์ใหม่ ขั้นตอนในการปฏิบัติระหว่างที่เซลล์มีการเจริญเติบโตมีดังนี้

#### 3.1 การวัดการเจริญของเซลล์

ในการศึกษาการเจริญของเซลล์นั้นมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นอย่างมากจะทำให้ทราบคุณสมบัติการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่ดีที่สุดในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ ค่าการเจริญของเซลล์ที่เหมาะสม และค่า Planting efficiency ของเซลล์ ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่าง ๆ ซึ่งมีประโยชน์ในการตรวจสอบซีรัม อาหาร ภาชนะเลี้ยง เป็นต้น

#### 3.2 การคำนวณอายุของเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งการบอกอายุของเซลล์ มี 2 วิธี คือ

3.2.1 Passage ซึ่งใช้บอกจำนวนครั้งที่เซลล์ได้ผ่านการถ่ายเลี้ยง และเป็นค่าอย่างหยาบที่พอจะประมาณอายุของเซลล์ที่เลี้ยงได้

3.2.2 Cumulative population doubling เป็นค่าที่ได้จากการคำนวณอายุของเซลล์

#### 3.3 การนับจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง

ในการเลี้ยงเซลล์จำเป็นที่จะต้องทราบจำนวนเซลล์เริ่มต้น และจำนวนเซลล์ทั้งหมดหลังจากการเลี้ยง ซึ่งเซลล์แขวนลอยทำได้โดย

3.3.1 การใช้ hemocytometer คือการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

3.3.2 การใช้เครื่องมือกึ่งอัตโนมัติที่เป็น electronic particle counter ที่เรียกว่า coulter counter

3.3.3 การนับจำนวนเซลล์ที่เกาะกับพื้นผิว ซึ่งมีหลายวิธีที่ใช้ในการบอกปริมาณของเซลล์ เช่น การนับเซลล์หรือนิวคลีไอร์ของเซลล์ตัวอย่างที่มีชีวิตหรือที่ตายบนพื้นที่หนึ่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยใช้ densitometer การวัด DNA เพื่อประมาณการเปลี่ยนแปลงของประชากร การวัดสี ซึ่งอาจใช้ประมาณจำนวนเซลล์ได้

### 3.4 ประสิทธิภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง

การเกาะติดพื้นผิวของเซลล์ และความสามารถในการสร้างโคโลนีของเซลล์ สามารถที่จะวัดค่าได้ จึงเป็นค่าที่ใช้ในการประเมินพฤติกรรมของเซลล์ เช่น ความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์หลังการเก็บเซลล์โดยวิธีแช่แข็ง ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับวัสดุที่ใช้เกาะ และผลจากอายุเซลล์ เป็นต้น

### 3.5 วงจรเซลล์ (Phase of cell cycle)

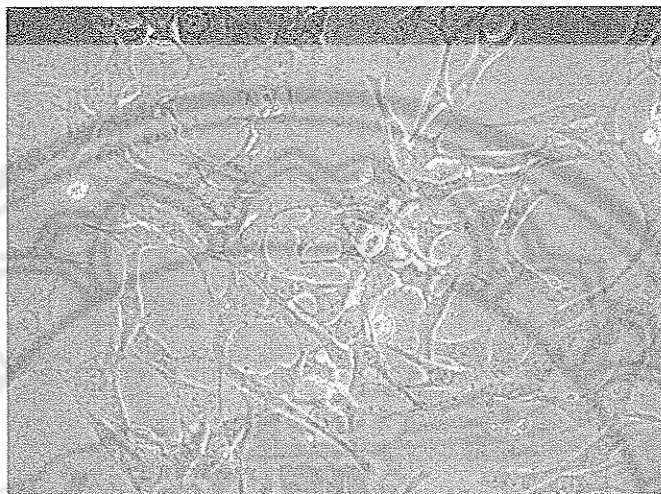
เวลาทั้งหมดของวงจรเซลล์และระยะเวลาต่าง ๆ ในวงจรเซลล์ เช่น ระยะเวลา  $G_1$ , S,  $G_2$ , และ M สามารถหาได้โดยวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไป คือ การตรวจสอบการสังเคราะห์ DNA หรือการหาปริมาณ DNA ในแต่ละเซลล์ โดยปกติเซลล์จะสังเคราะห์ DNA ในช่วง S phase การใส่ nucleotide ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี เช่น  $[^3H]$  thymidine ที่ใช้กับเซลล์ในช่วงนี้ สามารถช่วยให้ติดตามการสร้าง DNA ของเซลล์ได้โดยวัดปริมาณการนำเข้าของรังสีด้วยวิธี autoradiography นอกจากนี้คำนวณหา labeling index ซึ่งเป็นค่าดัชนีที่ได้จากสัดส่วนของเซลล์ที่ติดรังสี โดยค่านี้ใช้แทนเปอร์เซ็นต์เซลล์ในช่วง S phase ที่มีการนำ  $[^3H]$  thymidine เข้าเซลล์ และใช้ในการบอกการตอบสนองของประชากรเซลล์กับสารกระตุ้นพวก mitogenic stimulus ได้

### 4. การเก็บรักษาเซลล์และการนำเซลล์กลับมาเลี้ยงใหม่

เซลล์ที่อยู่ในระหว่างการเลี้ยงมักมีความไม่เสถียร อาจมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหน้าตา รูปแบบการเจริญ และ karyotype ได้ cell line ก็มีการเปลี่ยนแปลงตามอายุของเซลล์ บางชนิดอาจมีการเปลี่ยนแปลงเอง ทำให้หน้าที่และการเจริญของเซลล์ผิดไปจากเดิมได้ การเก็บแช่แข็งเซลล์เป็นวิธีที่สามารถเก็บเซลล์ไว้ได้นาน โดยที่ไม่ทำให้คุณสมบัติของเซลล์เปลี่ยนไป อีกทั้งยังเป็นการลดปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์และเซลล์อื่น ๆ ได้ (กัลยาณี จิระศรีพงศ์พันธ์ และนวนลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2548)

### เซลล์ไลน์ (Cell lines)

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้คือเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 mouse fibroblast cell line จาก American Type Culture Collection (ATCC) ดังแสดงตามภาพ 9



ภาพ 9 เซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 (10X) จาก American Type Culture Collection (ATCC)

ชื่อ (Designation)	:	BALB/3T3 โคลน A31
โครงสร้าง (Morphology)	:	Fibroblast
สิ่งมีชีวิต (Organism)	:	Mus musculus (mouse)
แหล่งกำเนิด (Source)	:	
อวัยวะ (Organ)	:	Embryo
ประเภทเซลล์ (Cell type)	:	Adherent
อาหารเลี้ยงเซลล์ (Medium)	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
ซีรัม (Serum)	:	Newborn Calf Bovine Serum (NBCS)

### ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

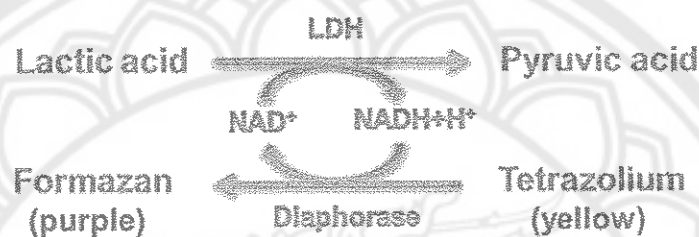
การเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบ ชนิดของเซลล์ การตอบสนองของเซลล์ วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ และรูปแบบหรือกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงมีความหมายแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับลักษณะที่ทำการศึกษ กล่าวคือ เซลล์ต่างชนิดกันย่อมมีการตอบสนองและแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ไม่เหมือนกัน รวมถึงระดับความเป็นพิษอาจแตกต่างกันไป (กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ, 2548) ปัจจุบันกระบวนการตรวจสอบความเป็นพิษของสารเคมีที่มีผลต่อการตายของเซลล์มีหลายวิธี การย้อมสีเซลล์เป็นวิธีวัดการติดสีและไม่ติดสีของเซลล์ในสารละลายสีย้อม เช่น trypan blue, eosin y, nigrosin green, erythrosin B ฯลฯ ซึ่งเป็นสีย้อมที่ให้ผลในการติดสีเฉพาะเซลล์ตาย นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจสอบความมีชีวิตโดยการนำสารเรืองแสงเข้าสู่เซลล์ เช่น diacetyl fluorescein ที่ทำให้เซลล์เป็นติดสีเขียวเรืองแสง ส่วน propidium iodide จะทำให้เซลล์ที่ตายติดสารเรืองแสงสีแดง (Freshney, 2005) สำหรับงานวิจัยเรื่องการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบพลูต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ในหลอดทดลอง จะกล่าวถึงการวิเคราะห์หรือยลชะของความมีชีวิตด้วยวิธีเอ็มทีที

### การวิเคราะห์ความมีชีวิตโดยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

เอ็มทีทีเป็นหนึ่งในวิธีการวิเคราะห์แบบ microtitration assay เอ็มทีทีหรือ 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide เป็นสารเคมีสีเหลืองของเกลือ tetrazolium salt ที่มีคุณสมบัติการละลายน้ำได้ดี ในกระบวนการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีที่สนใจต่อเซลล์ที่ต้องการใช้ในการศึกษาด้วยวิธีเอ็มทีที อาศัยหลักการ เซลล์ที่รอดชีวิตจากกระบวนการทดสอบกับสารพิษหรือสารเคมีที่ใช้ทดสอบไม่มีผลต่อเซลล์ ภายในเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการดำเนินไปของกระบวนการเมแทบอลิซึมและมีการสร้าง  $\text{NADH}+\text{H}^+$  จากการที่กรดแลคติกเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกอย่างเป็นปกติ โดย  $\text{NADH}+\text{H}^+$  ที่เกิดขึ้นสามารถถูกออกซิไดซ์ได้ด้วยเตตระโซเลียมซอลท์เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีม่วงของ formazan ซึ่งเมื่อละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO สามารถตรวจวัดค่าการดูดกลืนรังสี UV-Visible ได้ในช่วงความยาวคลื่น 540-570 นาโนเมตร แต่ในทาง

ตรงกันข้ามหากเซลล์เกิดการตายจากการได้รับสารพิษที่ใช้ในการทดสอบ กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์จะหยุดลงและจะไม่มีการสร้าง  $\text{NADH}+\text{H}^+$  ขึ้น ดังนั้น tetrazolium salt จึงไม่สามารถรีดิวซ์ไปรตอนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีม่วงของ formazan ได้

ค่าการดูดกลืนรังสี UV-Visible ของสาร formazan ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งเซลล์ผลิตขึ้นสามารถนำไปหาค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ได้ (Freshney, 2005)



ภาพ 10 กลไกการเกิดผลิตภัณฑ์สีม่วงของ formazan ภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ผ่านจากกระบวนการวิเคราะห้ด้วยวิธีเอ็มทีที