การทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณต่ำสุดของไมทราไจนีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง

โดย
นางสาวภัทรธิดาพร มุ่งเครือ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณต่ำสุดของไมทราไจนีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง

โดย
นางสาวภัทรธิดาพร มุ่งเครือ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

PURIFICATION AND DETERMINATION MINIMUM CONCENTRATION OF MITRAGYNINE FROM *MITRAGYNA SPECIOSA KORTH* LEAVES BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)

By

MISS Phattidapond MOONGKHRUE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (FORENSIC SCIENCE)

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2018

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณต่ำสุดของไมทราไจนีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง
โดย	ภัทรธิดาพร มุ่งเครือ
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญเดช เบิกฟ้า)

57312318 : นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : กระท่อม, ไมทราไจนีน, ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

นางสาว ภัทรธิดาพร มุ่งเครือ: การทำให้บริสุทธิ์และหาปริมาณต่ำสุดของไมทราไจนีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา

ไมทราไจนีน (Mitragynine) เป็นสารอัลคาลอยด์สามารถพบได้ในพืชกระท่อมซึ่งออกฤทธิ์ต่อจิตและระบบประสาทส่วนกลาง มีสรรพคุณคล้ายยาแก้ปวด กดความรู้สึกเมื่อยล้าขณะทำงาน ต่อมามีการระบาดในกลุ่มวัยรุ่น นิยมเสพกระท่อมเพื่อความมึนเมา อาจก่อให้เกิดปัญหาอาชญากรรมตามมา ซึ่งกระท่อมเป็นพืชเสพติดให้โทษประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาวิธีดัดแปลง*การสกัดแยกไมทราไจนีนจากใบกระท่อม แผ่นใบ, ก้านใบ,และกิ่ง พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR หาปริมาณไมทราไจนีน ใบกระท่อม 2.5 กรัม มีปริมาณสารไมทราไจนีน 6.325 มิลลิกรัม และหาความเข้มข้นไมทราไจนีนต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง ซึ่งพบว่าความเข้มข้นไมทราไจนีน 0.158 มิลลิกรัม เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

57312318 : Major (FORENSIC SCIENCE)
Keyword : Kratom, Mitragynine, Thin layer chromatography

MISS PHATTIDAPOND MOONGKHRUE : PURIFICATION AND DETERMINATION MINIMUM CONCENTRATION OF MITRAGYNINE FROM *MITRAGYNA SPECIOSA KORTH* LEAVES BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC) THESIS ADVISOR : MUHAMMAD NIYOMDECHA

Mitragynine is an alkaloid found in *Mitragyna Speciosa Korth* leaves, it was reported that the compound produced an effect on mine and central nervous. Thai villagers have used it for a long time as a traditional medicine to relieve tiredness and muscle fatigue, and to treat some common illnesses such as diarrhea, coughing, muscle pain, diabetes, and hypertension. The most among teenager of popular drugs abuse. Mitragyna Speciosa is narcotic drugs under the Thai Narcotics Act B.E.2522. In the research interesting about method of extraction of Mitragynine from *Mitragynine Speciosa Korth* leaves. dentification with FT-IR, 1H-NMR, 13C-NMR. Qualitative analysis of leaf, blade, midrib and petiole . In Kratom leaf 2.5 g of can be found mitragynine 6.325 mg. And minimum detection limited of Mitragynine the results showed 0.158 mg/ml

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ พ่อแม่และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นแรงผลักดันสนับสนุนการเรียนและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณนายกิตติศักดิ์ เหมือนดาว ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำการการวิจัยจนสำเร็จ

ขอบคุณนางสาวจันทร์ญา แช่มช้อย, สพญ.รัชชุรส อินคำลือ, นสพ.ดร.มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์ และ สพญ.ดร.นวขนิษฐ์ สัจจานนท์ ฝ่ายสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่สนับสนุนให้ความรู้ ช่วยจัดสรรเวลาการเรียนและการทำงาน อีกทั้งเอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์ในการทดลอง ขอขอบคุณ คณาจารย์สาขานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้ความรู้ด้านวิชาการ นำไปประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง ประธานกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญเดช เบิกฟ้า กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำตรวจทานวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.มูฮำหมัด นิยมเดชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่อุทิศเวลาในการทำงาน และเวลาส่วนตัว เพื่อวางแผนการทดลอง ให้คำแนะนำ คัดกรอง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง ให้มีความสมบูรณ์ อีกทั้งให้กำลังใจการทำวิทยานิพนธ์เป็นที่ปรึกษาใจดีเสมอมา จนสำเร็จลุล่วงอย่างสง่างาม ขอกราบขอบพระคุณทุกท่านอย่างสุดหัวใจ

ภัทรธิดาพร มุ่งเครือ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญรูปภาพ ..... ฌ

บทที่ 1 1

ที่มาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1

สมมุติฐานของการวิจัย 2

ขอบเขตการวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

นิยามและคำศัพท์เฉพาะ 2

บทที่ 2 3

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

แนวคิดและทฤษฎี 3

พืชกระท่อม 3

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ 3

กฎหมายการควบคุมพืชกระท่อมในประเทศไทย 8

การสกัดสารในพืช 9

เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง Thin-layer chromatography (TLC) 11

เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) 12

เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) 16
วรรณกรรมและการรายงานพืชกระท่อม 18
บทที่ 3 20
วิธีดำเนินการวิจัย 20
อุปกรณ์และสารเคมี 20
อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม 20
สารเคมีสำหรับใช้ในการสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม 20
วิธีการทดลอง 21
การสกัดและแยกสารไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม 21
การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของไมทราไจนีน 23
หาความเข้มข้นต่ำสุดของไมทราไจนีนที่สามารถตรวจพบได้ 24
บทที่ 4 25
ผลการวิจัย 25
การสกัดและแยกสารไมทราไจนีน 25
การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) 28
การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 29
การหาความเข้มข้นไมทราไจนีนต่ำสุดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง 31
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง 32
ภาคผนวก 35
รายการอ้างอิง 38
ประวัติผู้เขียน 41

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของลำต้น และดอกกระท่อม 3

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของใบกระท่อมก้านเขียว และก้านแดง 4

ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของใบกระท่อม 4

ภาพที่ 4 ปริมาณสารอัลคาลอยด์ที่สำคัญในกระท่อม 5

ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของไมทราไจนีน 5

ภาพที่ 6 Speciogynine 6

ภาพที่ 7 Speciociliatine 6

ภาพที่ 8 Paynanthenine 6

ภาพที่ 9 7-Hydroxymitragynine 6

ภาพที่ 10 แสดงสารเสพติด สีคูณร้อย 7

ภาพที่ 11 แสดงแถบสารที่แยกบนแผ่น TLC 11

ภาพที่ 12แสดงวิธีคำนวนค่า R_f 12

ภาพที่ 13แสดงระดับพลังงาน 13

ภาพที่ 14 ตัวอย่าง 1H-NMR 13

ภาพที่ 15 ค่า Chemical shift 14

ภาพที่ 16 แสดงตัวอย่างสเปกตรัม 15

ภาพที่ 17 เครื่อง FT-IR 16

ภาพที่ 18 แสดงตัวอย่างของเลขคลื่นที่เกิดการดูดกลืน ของพันธะต่างๆ ในสารอินทรีย์ 16

ภาพที่ 19 แสดงการทำงานของ interferometer 17

ภาพที่ 20 แสดงวิธีการแปลงสัญญาณเป็น Sperctrum 17

ภาพที่ 21 แสดงลักษณะการสั่นภายในโมเลกุลสารอินทรีย์ 18

ภาพที่ 22 แสดงใบกระท่อมอบแห้งบดละเอียด 21
ภาพที่ 23 สกัดโดยใช้ความร้อน 21
ภาพที่ 24 แสดงการแยกชั้นของ Ethyl Acetate 22
ภาพที่ 25 หลังการปั่นเหวี่ยงจะเห็นการแยกชั้นที่ชัดเจน 22
ภาพที่ 26 การแยกไมทราไจนีนบนแผ่น TLC 23
ภาพที่ 27 การแยกของแถบไมทราไจนีน 23
ภาพที่ 28 กรองไมทราไจนีนส่วนที่สกัด 24
ภาพที่ 29 วิธีเจือจางไมทราไจนีน 24
ภาพที่ 30 แสดงการแยกของแถบไมทราไจนีน 25
ภาพที่ 31 แสดง Spectrum ของ Mitragynine ด้วยเทคนิค FT-IR 28
ภาพที่ 32 แสดง ^{1}H-NMR จากการสกัด 29
ภาพที่ 33 แสดงค่า ^{13}C-NMR จากการสกัด 30
ภาพที่ 34 ไมทราไจนีนบนแผ่น TLC ที่ความเข้มข้นต่างๆ 31

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญ

กระท่อม (kratom) เป็นสารเสพติดที่มีการแพร่ระบาดและเป็นปัญหายาเสพติดที่สำคัญในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ข้อมูลทางสถิติผลการจับกุมคดียาเสพติดทั่วประเทศไทยพบว่าในปี พ.ศ. 2560 มีการจับกุมคดียาเสพติดพืชกระท่อมสูง จำนวน 20,560 คดี เป็นอันดับ 2 รองจากยาบ้า ส่วนพื้นที่ที่มีการจับกุมยาเสพติดพืชกระท่อมมากที่สุดยังคงเป็นพื้นที่ทางภาคใต้ พบมากถึง 19,560 คดี [1] และมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี ทำให้พบปัญหาการแพร่ระบาดของยาเสพติดชนิดนี้ในหมู่วัยรุ่นใช้น้ำต้มใบกระท่อมผสมกับโค้ก ยาแก้ไอ และสารอื่น ๆ ที่รู้จักกันในชื่อ “สี่คูณร้อย” เสพติดเพื่อความมึนเมา จึงอาจส่งผลให้นำไปสู่การกระทำผิด เกิดปัญหาอาชญากรรม หรืออาจเกิดอุบัติเหตุได้

ไมทราไจนีน (Mitragynine) ชื่อทางเคมีคือ 9-methoxy-corynantheidine เป็นสารอัลคาลอยด์หลักสำคัญสามารถพบได้ในพืชกระท่อม สารสำคัญที่พบมีการออกฤทธิ์กับระบบประสาทส่วนกลาง มีส่วนช่วยรักษาและบรรเทาอาการปวด รักษาอาการไอ แก้ท้องร่วง กระตุ้นประสาท ลดการซึมเศร้า รักษาโรคเบาหวาน แต่หากได้รับในปริมาณที่สูงมาก ซึ่งเพิ่มความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดภาวะกดประสาทและกดการหายใจ จากฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ของยาและภาวะเสริมฤทธิ์ของยาหลายชนิดร่วมกัน เช่น สี่คูณร้อย เป็นต้น ซึ่งจะส่งผลเสียกับร่างกายร่วมกับอาการถอนยาที่พบได้ เช่น จิตหวาดระแวง มีอารมณ์รุนแรง ปวดกล้ามเนื้อและกระดูก มีอาการกระตุกของแขน ขา ไม่อยากอาหาร ไม่มีสมาธิ และนอนไม่หลับ การใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานจะทำให้มีสีผิวคล้ำขึ้น

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาวิธีการแยกสารสำคัญ ไมทราไจนีน (Mitragynine) ออกจากพืชกระท่อม เปรียบเทียบปริมาณไมทราไจนีนของ แผ่นใบ ก้านใบ และกิ่ง และหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ เพื่อนำประโยชน์ของสารไมทราไจนีนไปใช้เป็นสารมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์วัตถุพยานที่คาดว่ามีส่วนประกอบของพืชกระท่อม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการสกัดและการแยกสารไมทราไจนีนด้วยวิธีดัดแปลงการสกัดอัลคาลอยด์ จากส่วนของใบ กระท่อม ก้านใบ และกิ่งกระท่อม

2. ตรวจหาเอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีนด้วยเทคนิค FTIR, ^{1}HNmr และ ^{13}C NMR

3. หาความเข้มข้นต่ำสุดของไมทราไจนีนที่สามารถตรวจได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (TLC)

สมมุติฐานของการวิจัย

1. ส่วนประกอบของพืชกระท่อมที่พบ ได้แก่ แผ่นใบ ก้านใบ และกิ่ง จะสามารถพบว่ามีสารไมทราไจนีนในปริมาณที่แตกต่างกัน

2. ปริมาณความเข้มข้นของสารไมทราไจนีน มีผลกับการตรวจพบด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง

ขอบเขตการวิจัย

1. ตัวอย่างกระท่อม ได้จาก จ.ราชบุรี โดยกำหนดให้ ตัวอย่างที่ใช้มาจากกระท่อมต้นเดียวกันทุกการทดลอง โดยการทดลองใช้กระท่อมแห้งที่อบไล่ความชื้นออกจนหมดแล้ว 70 กรัม

2. การแยกสารไมทราไจนีนโดยใช้วิธีดัดแปลงการสกัด [2]

3. การยืนยันเอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีนใช้เทคนิค FTIR ^{1}H-NMR ^{13}C-NMR

4. หาความเข้มข้นต่ำสุดของไมทราไจนีนที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการตรวจสอบเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์กระท่อมหรือผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของกระท่อมอย่างง่าย

2. ทราบถึงปริมาณสารไมทราไจนีนความเข้มข้นต่ำสุดในพืชกระท่อมที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชุดทดสอบเบื้องต้นในอนาคตได้

นิยามและคำศัพท์เฉพาะ

1. การสกัด คือ การแยกสารอัลคาลอยด์ทั้งหมดที่มีไมทราไจนีนเป็นองค์ประกอบหลักออกจากพืชกระท่อม

2. การหาปริมาณต่ำสุด คือ การหาปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค โครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

3. การทำให้บริสุทธิ์ คือ การแยกสารไมทราไจนีนออกจากสารอัลคาลอยด์

4. ผงกระท่อม คือ การนำพืชกระไปอบในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วบดละเอียด

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

พืชกระท่อม

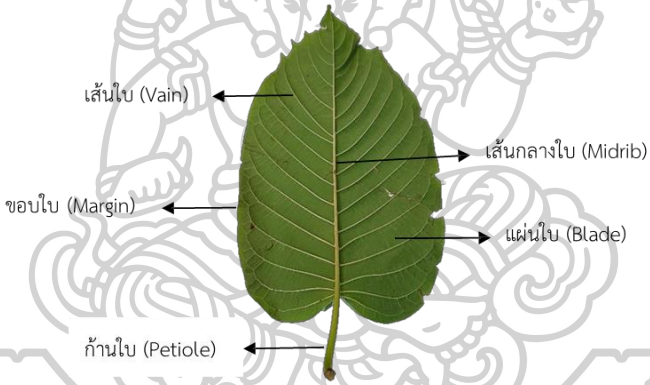
ลักษณะทางพฤษศาสตร์

พืชกระท่อม (Kratom) มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna Speciosa* (Korth) Havil. [3] จัดเป็น พืชในวงศ์ Rubiaceae พืชกระท่อมมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้นแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย มาลายู จนถึงเกาะกินีด้วย โดยมีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ความสูงประมาณ 15-30 เมตร ในประเทศไทยมีอยู่ 3 พันธุ์ คือ ก้านแดงด้านเขียวยักษาใหญ่ เป็นใบเดี่ยว รูปไข่แกมขอบขนาน สีเขียวคล้าย ใบกระดังงา ดอกมีสีขาวอมเหลือง ดอกเป็นชนิดสมบูรณ์เพศ ออกที่ปลายกิ่ง ช่อย่อยรูปทรงกลมคล้ายดอก กระถิน แต่ละช่อมีดอกย่อย ราว 70-80 ดอก ผลมีลักษณะแคปซูล ภายในผลย่อยมีเมล็ดอัดแน่น เมล็ดมีลักษณะแบน (flat seed) แต่ละพื้นที่จะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละที่ เช่น ภาคเหนือเรียกอีด่าง อีแดง กระอ่วม ภาคใต้ เรียกท่อม หรือท่ม ประเทศมาเลย์เรียก เบี๊ยะ (Biak) หรือ เคอตุ่ม (ketum) เป็นต้น สามารถพบพืชกระท่อมได้ในบางจังหวัดของภาคกลาง แต่จะพบมากในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของลำต้น และดอกกระท่อม

ที่มา: “กระท่อม” สุดยอดสมุนไพร-แต่ต้องห้าม [ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 เข้าถึงได้จาก https://kasettumkin.com

ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของใบกระท่อม

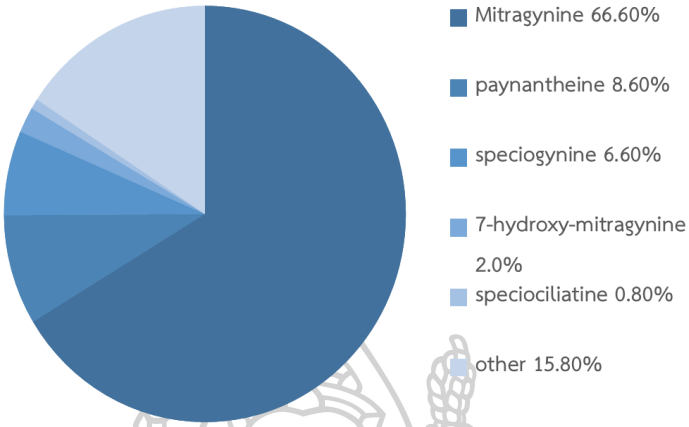


ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของใบกระท่อมก้านเขียว และก้านแดง

พฤกเคมีพืชกระท่อม

สารเคมีที่พบในพืชกระท่อมมีหลากหลายกลุ่ม ได้แก่ alkaloids, flavonoids, triterpenes, phenolic compounds เป็นต้น โดยสารกลุ่ม indole alkaloidsเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชกระท่อมซึ่งมีสารเคมีออกฤทธิ์สำคัญ 2 ชนิด คือ ไมทราไจนีน (Mitragynine) และ7-hydroxy-mitragynine โดย ไมทราไจนีน(Mitragynine) มีปริมาณที่พบในใบกระท่อมของไทยจะมีสูงถึง 66% [4] โดยผงใบกระท่อมปริมาณ 650 – 1300 มิลลิกรัม จะมี Mitragynine acetate ประมาณ 50 – 100 มิลลิกรัม แต่จากการศึกษาปัจจุบันพบว่า 7-hydroxy-mitragynine ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางรุนแรงกว่า ไมทราไจนีน (Mitragynine) และมอร์ฟีน 13 และ 43 เท่า ตามลำดับ

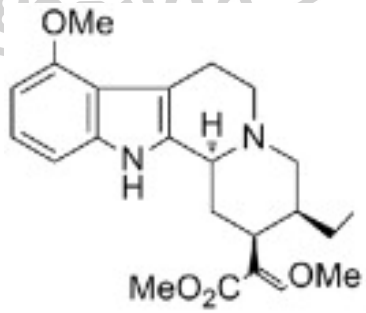
นอกจากนี้ยังพบสารเคมีอื่น ๆ ในพืชกระท่อมดังนี้ speciogynine, speciociliatine และ paynantheine[5]



ภาพที่ 4 ปริมาณสารอัลคาลอยด์ที่สำคัญในกระท่อม

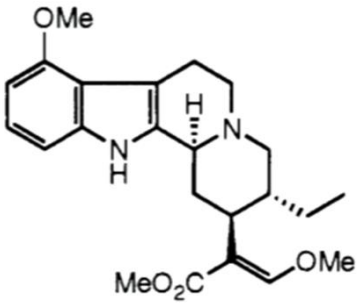
ที่มา : Mittraginine an overview [ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา https://www.sciencedirect.com/topics

สาร mitragynine จัดเป็น อัลคาลอยด์ ชนิด corynanthe มีสูตรทางเคมี $C_{23}H_{30}N_2O_4$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 398.503 กรัมต่อโมล อาจเรียกชื่อ mitragynine ตามลักษณะโครงสร้างว่า 9-methoxy- corynantheidine มีลักษณะเป็นผงสีขาว (white amorphous powder) มีคุณสมบัติสามารถละลายในตัวทำละลายชนิดแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และกรดอะซิติก โดยมีจุดเดือด (boiling point) และจุดหลอมเหลว (melting point) อยู่ที่ประมาณ 230-240 °C และ 110-115.6 °C ตามลำดับ



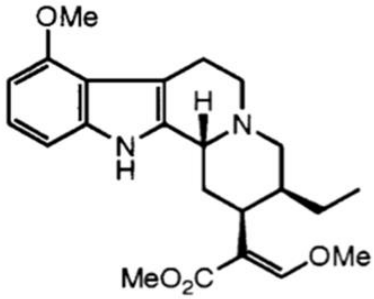
ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของไมทราไจนีน

ที่มา : Mittraginine an overview [ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา https://www.sciencedirect.com/topics



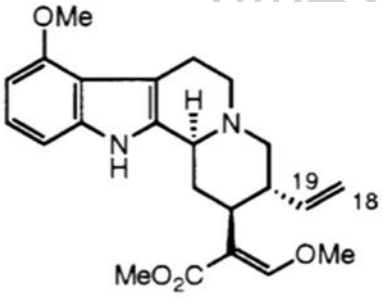
Molecular Formula	$C_{23}H_{30}N_2O_4$
Chemical Names	Speciogynine
Molecular Weight	398.503 g/mol

ภาพที่ 6 Speciogynine



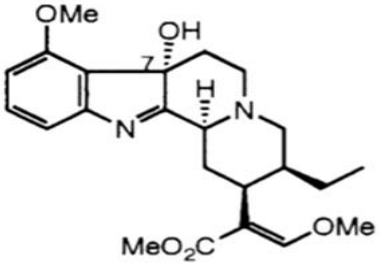
Molecular Formula	$C_{23}H_{30}N_2O_4$
Chemical Names	Speciociliatine
Molecular Weight	398.503 g/mol

ภาพที่ 7 Speciociliatine



Molecular Formula	$C_{23}H_{28}N_2O_4$
Chemical Names	Paynantheine
Molecular Weight	396.487 g/mol

ภาพที่ 8 Paynanthenine



Molecular Formula	$C_{23}H_{28}N_2O_4$
Chemical Names	7-Hydroxymitragynine
Molecular Weight	414.502 g/mol

ภาพที่ 9 7-Hydroxymitragynine

สรรพคุณของกระท่อม

แพทย์แผนไทยในสมัยโบราณนำกระท่อมมาใช้เป็นยาในตำรับยาแก้ท้องเสีย รักษาอาการปวดเบ่ง ปวดเมื่อยตามร่างกาย ท้องเฟ้อ ท้องร่วง และระงับประสาท ในมุมมองของแพทย์แผนไทยส่วนใหญ่ โดยหมอพื้นบ้านจะนำเปลือกและใบมาปรุงเป็นยา หรือนใบแกะก้านมาเคี้ยว และคายกากทิ้ง เพื่อรักษาแก้ท้องร่วง รักษาโรคกระเพาะ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง ทั้งนี้พืชกระท่อมมีส่วนประกอบสำคัญในตำราคัมภีร์ แพทย์แผนไทยโบราณ เช่น ตำรับยาประสะกระท่อม เนื่องจากใบกระท่อมนั้น มีความเป็นพิษอยู่ด้วยจึงต้องทำให้พิษอ่อนลง เรียกว่า “ประสะ” โดยการ ต้ม คั่ว หรือนำไปผสมกับสารอื่นความนิยมใช้พืชกระท่อม รักษาอาการ ลำดับ จากมากไปน้อย (นับเป็นร้อยละของหมอพื้นบ้าน) ได้แก่ อาการท้องร่วง (67%) เบาหวาน (63.3%) แก้ปวด เมื่อย (32.7%) แก้ไอ (26.5%) ขับพยาธิ (14.3%) ซึ่งสอดคล้องกับผู้ที่กินใบกระท่อม รักษาอาการเจ็บป่วยด้วยตัวเอง [6]

พฤติกรรมการเสพ

กินใบรูดสด รูดก้านหรือไม่รูดก้าน หรือบดใบแห้งให้เป็นผง ละลายน้ำดื่ม อาจจะเคี้ยว 2-3 ใบ และดื่มน้ำอุ่น หรือกาแฟร้อนตาม ใช้วันละ 3 - 10 ครั้งต่อวันตามอาการเหนื่อย เมื่อใช้ไประยะหนึ่ง จนเกิดการเสพติดจะมีปริมาณการใช้จะเพิ่มขึ้น จากเคี้ยวใบกระท่อมมาสู่การแปรรูปเป็น สารเสพติดชนิดใหม่เรียกว่า สี่คูณร้อย โดยการนำน้ำต้มใบกระท่อมไปผสมกับสารตัวอื่นเช่นยาแก้ไอ ยากันยุง เครื่องดื่มน้ำโค้ก ยากล่อมประสาท ประเภทอัลปราโซแลม ดังภาพที่ 10

ภาพที่ 10 แสดงสารเสพติด สี่คูณร้อย

ที่มาของภาพ : สารเสพติด 4 คูณ 100 คืออะไร [ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 เข้าถึงได้จาก http://oknation.nationtv.tv/blog/print.php?id=1020637

ผลจากการเสพและอาการขาดยา

พบว่าหลังเคี้ยวใบกระท่อมไปประมาณ 5-10 นาที จะทำให้มีอาการเป็นสุข กระปรี้กระเปร่า ไม่รู้สึกหิว ไม่อยากอาหาร กดความรู้สึกเมื่อยล้าขณะทำงาน ทำให้สามารถทำงานได้นาน และทนแดดมากขึ้น แต่จะเกิดอาการกลัวหนาวสั่นเวลาอากาศครึ้มฟ้าครึ้มฝน ผู้เสพจะมีผิวหนังแดงเพราะเลือดไปเลี้ยงผิวหนังมากขึ้น อาการข้างเคียง ได้แก่ ปากแห้ง ปัสสาวะบ่อย เบื่ออาหาร ท้องผูก อุจจาระแข็งเป็นก้อนเล็ก ๆ นอนไม่หลับ ถ้าเสพใบกระท่อมในปริมาณมาก ๆ จะทำให้มึนงง และคลื่นไส้อาเจียน บางรายเสพเพียง 3 ใบ ก็ทำให้เมาได้ ในรายที่เสพใบกระท่อมมาก ๆ หรือเป็นระยะเวลานาน มักจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีขึ้นที่บริเวณผิวหนัง ทำให้ผู้ที่รับประทานมีผิวคล้ำและเข้มขึ้น และยังพบอีกว่าเสพกระท่อมโดยไม่ได้รูดเอาก้านใบออกจากตัวใบก่อน อาจจะทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า “ถุงท่อม” ในลำไส้ได้ เนื่องจากก้านใบและใบของกระท่อมไม่สามารถย่อยได้ จึงตกตะกอนติดค้างอยู่ภายในลำไส้ ทำให้ขับถ่ายออกมาไม่ได้ เกิดพังผืดขึ้นมาหุ้มรัดอยู่โดยรอบก้อนกากกระท่อมนั้น ทำให้เกิดเป็นก้อนถุงขึ้นมาในลำไส้ บางรายจะมีอาการโรคจิตหวาดระแวง เห็นภาพหลอน คิดว่าคนจะมาทำร้ายตน และพูดไม่ค่อยรู้เรื่อง

อาการขาดยา (withdrawal symptom) ที่พบ คือ จะไม่มีแรง ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อและกระดูก แขนขากระตุก รู้สึกอ่อนเพลีย ไม่สามารถทำงานได้ มีอาการไอมากขึ้น อาเจียน คลื่นไส้ ถ่ายอุจจาระเหลว

กฎหมายการควบคุมพืชกระท่อมในประเทศไทย

ปี พ.ศ. 2486 ประเทศไทยเป็นประเทศแรกที่ประกาศควบคุมการใช้พืชกระท่อม โดยระบุห้ามปลูกและครอบครองรวมทั้งห้ามจำหน่ายและเสพใบกระท่อม ซึ่งเหตุผลที่แท้จริงของการออก พ.ร.บ.พืชกระท่อม พ.ศ. 2486 เนื่องจากฝิ่นที่รัฐเป็นผู้ผูกขาดผลิตฝิ่นสุก ฝิ่นดิบ มีราคาแพง ทำให้คนหันมาสูบกระท่อมแทนฝิ่น ดังนั้น จึงเห็นได้ว่าแท้ที่จริงการตรา พ.ร.บ.พืชกระท่อม พ.ศ. 2486 และใช้สืบเนื่องมาจนทุกวันนี้มีเหตุผลและหลักการทางการค้าทางภาษีของรัฐ มิใช่เพราะเหตุที่พืชกระท่อมเป็นพืชเสพติด นอกจากนี้ พ.ร.บ.ป่าไม้ พ.ศ. 2484 ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดย พ.ร.บ.ป่าไม้ (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2518 ได้กำหนดให้ต้นกระท่อมเป็นพืชหวงห้าม จะตัดฟันต้องได้รับอนุญาตจากเจ้าพนักงาน ทำให้เกิดปัญหาว่าหากประชาชนมีต้นกระท่อมอยู่ในสวนหรือที่ดินก็จะไปตัดโดยพลการไม่ได้ แต่ขณะเดียวกันการครอบครองกระท่อมก็ผิดกฎหมายตาม พ.ร.บ.ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522[7]

ในปี พ.ศ. 2522 ได้ยกเลิก พ.ร.บ.พืชกระท่อม และได้ระบุกระท่อมเป็นพืชเสพติดให้โทษประเภท 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 (ฉบับที่ 2)

“ผู้ใดผลิต จำหน่าย นำเข้า หรือส่งออกซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ต้องระวางโทษจำคุกตั้งแต่ 2 – 5 ปี และปรับตั้งแต่ 20,000 – 150,000 บาท ครอบครองโดยมิได้รับอนุญาต ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกิน 5 ปี หรือปรับไม่เกิน 100,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ”

ยาเสพติดให้โทษ

พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ได้ระบุประเภทของยาเสพติดให้โทษออกเป็น 5 ประเภท [7] ดังนี้

ประเภทที่ 1 ยาเสพติดให้โทษชนิดร้ายแรง เป็นยาที่ไม่มีการนำมาใช้ในทางการแพทย์ และทำให้เกิดการติดยาในระดับรุนแรง เช่น เฮโรอีน ยาบ้า ยาอี เป็นต้น

ประเภทที่ 2 ยาเสพติดให้โทษทั่วไป เป็นยาที่มีประโยชน์ในการรักษาโรคในระดับน้อยจนถึงมาก และทำให้เกิดการเสี่ยงต่อการติดยาของประชากรในระดับที่ต้องพึงระวัง เช่น มอร์ฟีน โคเคน โคเดอีน เป็นต้น

ประเภทที่ 3 ยาเสพติดให้โทษที่มียาเสพติดให้โทษในประเภท 2 เป็นส่วนผสมอยู่ด้วย ตามที่ได้ขึ้นทะเบียนตำรับไว้ เป็นยาที่ทำให้เกิดการเสี่ยงต่อการติดยาของประชากรน้อย แต่ยังคงมีอันตรายและมีประโยชน์ มากในการรักษาโรคเช่น ยาแก้ไอผสมโคเดอีน เป็นต้น

ประเภทที่4 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษในประเภท 1 หรือประเภท 2 เช่น Acetic Anhydride, Acetyl Chloride

ประเภทที่5 ยาเสพติดให้โทษที่มิได้อยู่ในประเภทที่1 ถึงประเภทที่4 เช่น กัญชา พืชกระท่อม เห็ดขี้ควาย เป็นต้น

การสกัดสารในพืช

การตรวจวิเคราะห์สารในพืชสามารถทำได้หลายวิธี[8] เช่น การตรวจลักษณะภายนอก (macroscopic examination) โดยดูรูปร่างของใบ แต่ถ้าอยู่ในรูปผงยาสามารถตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) [9] โดยพืชแต่ละชนิดมีองค์ประกอบสารสำคัญหลายชนิดรวมอยู่ มีคุณสมบัติแตกต่างกันดังนี้

1. สารกลุ่มไขมันไขมัน (Lipids) หมายถึงน้ำมันระเหยยาก (fixed oils) ไขมัน (fat) และไข (waxes) สารกลุมนี้เปนสารเอสเทอรของกลุมไขมัน และแอลกอฮอลในไขมันสายยาว

2. สารประกอบฟนอล (Phenols) อะโรมาติก ตอกับกลุมไฮดรอกซิล (hydroxyl) สารกลุ่มนี้พบมากในพืชโดยอยูรวมกับน้ำตาลในรูปของไกลโคไซดเรียกวาฟีนอลไกลโคไซด์

3. สารกลุ่มแทนนิน (tannins) มีโครงสร้างเป็นสารเชิงซ้อน มักพบในรูปของสารผสมของโพลีฟนอล (polyphenols) มักพบอยู่ตามสวนต่าง ๆ ของพืช เชน ผลเปลือก ลำต้น ใบ ราก เป็นต้น

4. สารกลุ่มอัลคาลอยด์เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นสวนประกอบ (Organic Nitrogen Compound) มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสรางซับซ้อนและแตกต่างกัน มากมาย

5. สารกลุ่มคารโบไฮเดรต คารโบไฮเดรตเป็นสารอินทรียที่ประกอบด้วย คารบอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน คารโบไฮเดรตเป็นกลุมสารที่ พบมากทั้ง ในพืชและสัตว์

6. สารกลุ่มไกลโคไซดเป็นสารประกอบอินทรียที่เกิดจากอะไกลโคน (aglycone หรือ genin) จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาลเรียกไกลโคน (glycone) ละลายน้ำได้ดี

7. สารกลุมน้ำมันหอมระเหย น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่พบมากในพืชเขตร้อน มีลักษณะน้ำเป็นมัน มีกลิ่นและรสเฉพาะตัวระเหยได่ง่ายในอุณหภูมิธรรมดา เบากวาน้ำสามารถสกัดจากสวนต่าง ๆ ของพืชไดโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) หรือการบีบ (expression)

ดังนั้นปัจจัยการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญจากพืช ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสาร ชนิดของสาร และชนิดของตัวทำละลาย จึงต้องเลือกวิธีสกัดให้เหมาะสม

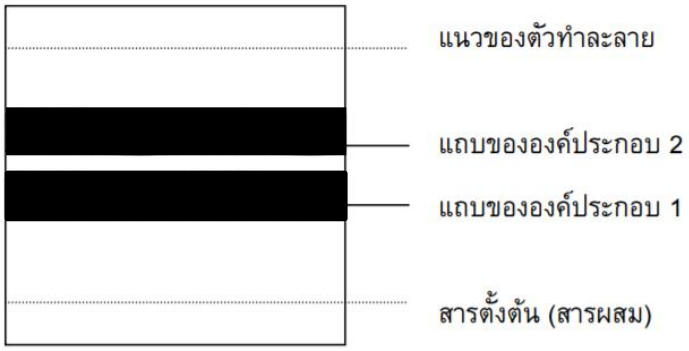
1. สกัดด้วยน้ำหรือแอลกอฮอล์เจือกรด จะได้อัลคาลอยด์ออกมาในรูปเกลือของกรดอินทรีย์ เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับสกัด อัลคาลอยด์ทางอุตสาหกรรม เนื่องจากค่าใช้จ่ายต่ำแต่การใช้น้ำสกัดจะทำให้ลดปริมาณได้ยาก มักเกิดฟอง และอาจมีสารอื่นปนออกมามาก

2. สกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่รวมตัวกับน้ำ เช่น คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ ไดคลอโรมีเธน การสกัดด้วยวิธีนี้จะต้องทำผงยาให้อยู่ในสภาพด่าง เพื่อเปลี่ยนอัลคาลอยด์ให้อยู่ในรูปอิสระ จึงทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ วิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดอัลคาลอยด์จากพืชปริมาณน้อยเช่นการวิจัย แต่ไม่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรม

3. สกัดด้วยตัวทำละลายที่ผสมกับน้ำได้ เช่น เอทธานอล เมทธานอล แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดอัลคาลอยด์ได้ทั้งในรูปเกลือและรูปอิสระ จึงเป็นที่นิยมใช้ในการ สกัดอัลคาลอยด์จากพืช

เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง Thin-layer chromatography (TLC)

Thin-layer chromatography (TLC) [10] เป็นเทคนิคการกระจายของสารสกัดระหว่างวัฏภาคนิ่งซึ่งเป็นตัวดูดซับที่จะเคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรือพลาสติกแข็ง และตัวทำละลายซึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่จะเคลื่อนผ่านตัวดูดซับ TLC จึงจัดเป็น solid-liquid adsorption chromatography นิยมใช้ TLC วิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยเพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม และใช้พิสูจน์จนสารโดยเปรียบเทียบ R_f ของสาร กับสารแท้ (authentic sample) ทั้งนี้ TLC ยังใช้สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสม ที่มีปริมาณมากโดยวิธีคอลัมนโครมาโตกราฟ TLC เป็นแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็ง เคลือบด้วยตัวดูดซับเป็นชั้นบาง ๆ ตัวดูดซับที่ใช้กับ TLC ได้แก ซิลิกาเจล อะลูมินา คิเซลกัวร์ (kieselguhr) และผงเซลลูโลส เป็นต้น ตัวดูดซับเหลานี้มักมีสารเรืองแสงผสมอยู่ เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยมองภายใต้แสง UV



ภาพที่ 11 แสดงแถบสารที่แยกบนแผ่น TLC

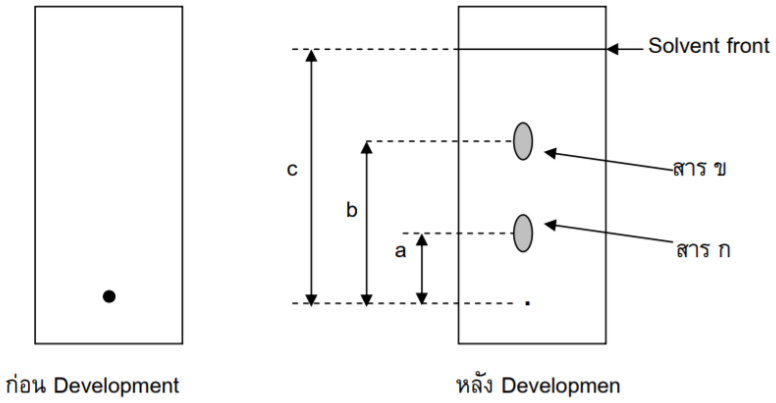
ที่มาของภาพ : Thin-layer Chromatography [ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM328/CM328-5.pdf

การคำนวณค่า R_f

ค่า R_f เป็นค่าประจำตัวของสารประกอบภายใต้สภาวะต่างๆ (ตัวดูดซับ,ตัวทำละลายและความหนาของชั้นตัวดูดซับ) ที่กำหนด คานี้แปรเปลี่ยนได้ถาสภาวะในการทดลองเปลี่ยน การคำนวณคา R_f ถูกนิยามไวดังนี้

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}$$

การพิสูจน์วาสารเป็นตัวเดียวกันหรือไม่โดยการเปรียบเทียบคา R_f ระหว่างสารจะใชขอมูลที่ได้จากการทดสอบโดยใช้ตัวทำละลายหลายๆ ระบบ สารประกอบต่างชนิดกันอาจมีค่า R_f เหมือนกันในตัวทำละลายหนึ่ง แต่จะมี R_f ที่แตกตางกันในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง



$$R_f \ (\text{สาร ก}) = \frac{c}{a} \qquad R_f \ (\text{สาร ข}) = \frac{b}{c}$$

ภาพที่ 12แสดงวิธีคำนวนค่า R_f

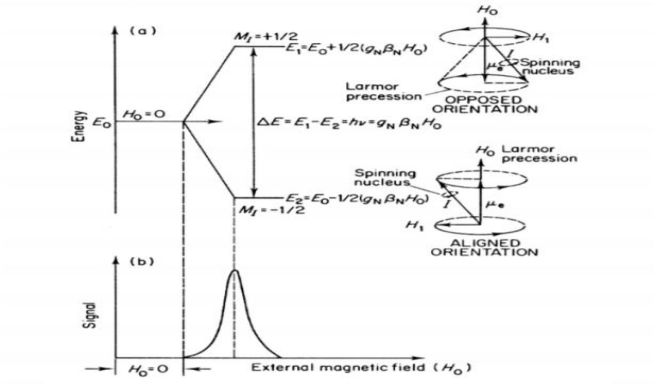
ที่มาของภาพ : Preparative Thin-layer Chromatography (PLC) [ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา http://e-book.ram.edu/e-book/c/CM328/CM328-5.pdf

ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมจากแผ่น TLC ตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกสารผสมได้ดีกับแผ่น TLC ควรเลือกระบบตัวทำละลายที่ทำให้สารตัวที่เคลื่อนที่เร็วที่สุด มีคา R_f ต่ำกว่า 0.5 ในการพัฒนาแถบเพียงครั้งเดียว ถ้าการพัฒนาแถบครั้งแรกไม่สามารถแยกสารออกจากกัน ใหทำการพัฒนาซ้ำการพัฒนาแถบหลายครั้งเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถแยกสารผสมที่มี R_f ใกลเคียงกันออกจากกัน

เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

หลักการ NMR เป็นเทคนิคการดูดกลืนพลังงานของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความถี่คลื่นวิทยุ ของนิวเคลียสในโมเลกุลสารตัวอย่างซึ่งวางอยู่ในสนามแม่เหล็กภายนอก พลังงานดังกล่าวเกิดขึ้นได้เนื่องจากนิวเคลียสของอะตอมมีการแยกออกเป็นระดับชั้น พลังงานสูงและต่ำ

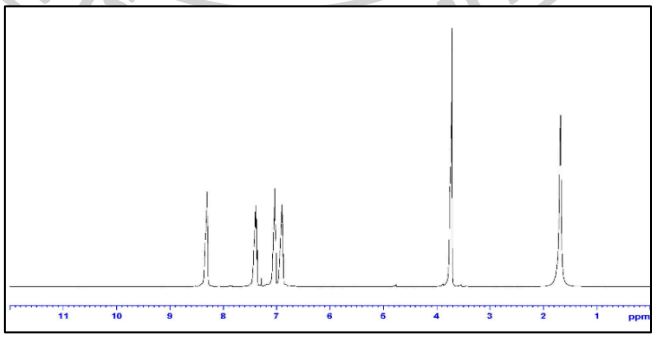
จะมีการแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ ระดับพลังงานที่ต่ำ ซึ่งเกิดจากนิวเคลียสหรือโปรตอนที่เรียงตัวขนานกับทิศทางของสนามแม่เหล็กภายนอก (aligned orientation) และระดับพลังงานที่สูงกว่า



ภาพที่ 13แสดงระดับพลังงาน

ที่มาของภาพ : การวิเคราะห์พอลิเมอรด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคป[ออนไลน์]เข้าใช้วันที่ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา http://www.seem.kmutt.ac.th/research.pdf

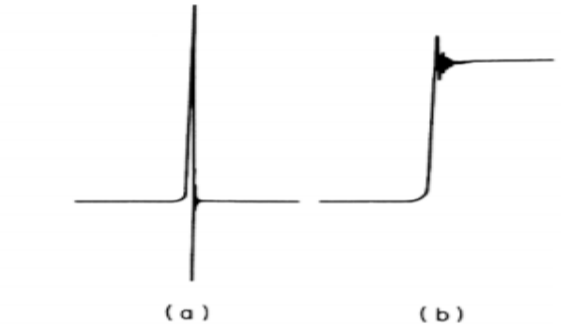
ซึ่งเกิดจากนิวเคลียสที่เรียงตัวในทิศทางที่ตรงกันข้ามกับสนามแม่เหล็กภายนอก (opposed orientation) นิวเคลียสที่อยู่ในระดับชั้นพลังงานที่ต่ำกว่าจะดูดกลืนพลังงานและย้ายขึ้นไปอยู่ในระดับพลังงานที่สูงกว่า ความแตกต่างของระดับชั้นพลังงานทั้งจะมีค่าตรงกับความถี่ในช่วงของคลื่นวิทยุ) ก็จะทำให้เกิดปรากฏการณ์เรโซแนนท์ ที่เรียกว่า nuclear magnetic resonance) และค่าพลังงานที่ถูกดูดกลืนจะถูกตรวจวัดได้ด้วย radio frequency detector



ภาพที่ 14 ตัวอย่าง 1H-NMR

ที่มาของภาพ : หลักการของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี[ออนไลน์]เข้าใช้วันที่ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา http://science.buu.ac.th/part/nmr/index.php/home/principles.html

การดูดกลืนพลังงานจากสนามแม่เหล็กของนิวเคลียสของธาตุแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน หรือแม้กระทั่งนิวเคลียสของธาตุชนิดเดียวกันที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันก็จะให้สัญญาณ



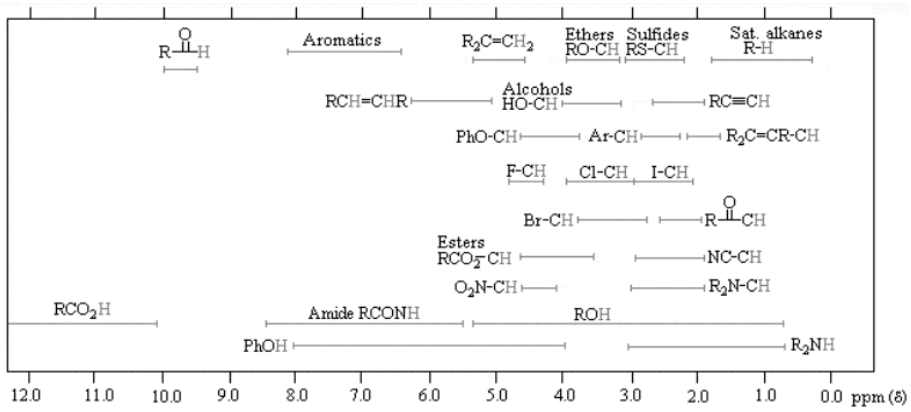
ภาพที่ 15 ค่า Chemical shift

ที่มาของภาพ : หลักการของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี[ออนไลน์]เข้าใช้วันที่ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา http://science.buu.ac.th/part/nmr/index.php/home/principles.html

การแปลความหมายของสเปกตรัม NMR

1. ตำแหน่งของพีค หากไม่มีปัจจัยภายนอกอื่น ๆ เช่น ชนิดของอะตอมข้างเคียง และการเรียงตัวของโมเลกุลเข้ามา เกี่ยวข้องแล้ว นิวเคลียส เช่นโปรตอนในเทคนิค ^{1}H-NMR ควรจะมีค่าพลังงานที่ดูดกลืนค่าเดียว ไม่ว่าจะเป็น โปรตอนในสารโมเลกุลใดก็ตาม แต่ทว่าในความเป็นจริงแล้วพบว่าโปรตอนที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันจะ มีค่าพลังงานทีดูดกลืนเพื่อให้เกิดปรากฏการณ์ เรโซแนนท์ที่ต่างกันทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากอิเลคตรอนที่อยู่ รอบ ๆ นิวเคลียส และหรือการมีสนามแม่เหล็กเล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นจากการ spin ของนิวเคลียส ปัจจัยเหล่านี้จะ ส่งผลให้เกิดการบดบังสนามแม่เหล็กภายนอก ระดับที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญคือ Inductive effect และ Anisotropic effect

2. พื้นที่ใต้พีค (Peak area หรือ Line intensity) คำว่า line intensity หมายถึงพลังงานทั้งหมดที่ถูกดูดกลืนโดยสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ ในขณะที่เกิดเรโซแนนซ์ซึ่ง line intensity ดังกล่าวจะหาได้จากการอินทริเกต (integration)



ภาพที่ 16 แสดงตัวอย่างสเปกตรัม

ที่มาของภาพ : การวิเคราะห์พอลิเมอรด้วยเทคนิคทางสเปคโตรสโคป[ออนไลน์]เข้าใช้วันที่ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา http://www.seem.kmutt.ac.th/research.pdf

3. การแยกของพีค (Line splitting) ของพีคในสเปกตรัม NMR ซึ่งเรียกว่าเกิด spin-spin splitting หรือ spin coupling เกิดขึ้นได้เนื่องจากการที่โปรตอน 2 กลุ่มที่อยู่ติดกัน (neighboring protons) มีแรงกระทำหรือ อันตรกิริยา (interaction) ระหว่างกันส่งผลให้ความน่าจะเป็นของการเรียงตัวของโปรตอน (ในแต่ละกลุ่มที่อยู่ ติดกัน) มีจำนวนมากขึ้น และส่งผลทำให้ระดับพลังงานของนิวเคลียสหรือโปรตอนมีจำนวนมากขึ้น จำนวนของพีคที่เกิดจากการ coupling จะไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนของโปรตอนชนิดนั้น ๆ แต่จะขึ้นอยู่ กับจำนวนโปรตอนในหมู่ที่อยู่ติดกัน โดยจำนวนพีคที่เกิดจากการ coupling จะมีค่าเท่ากับ n + 1 เมื่อ n คือ จำนวนโปรตอนในหมู่ที่อยู่ติดกัน

4.ความกว้างของพีค (Peak width) ที่เกิดขึ้นในสเปกตรัม NMR จะขึ้นอยู่กับ relaxation time หรือเวลาครึ่งชีวิต ที่นิวเคลียสจากระดับพลังงานสูงกลับคืนสู่ระดับพลังงานต่ำ ซึ่งค่า relaxation time ดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับความ หนืดของสาร โดยมีความสัมพันธ์กันดังนี้

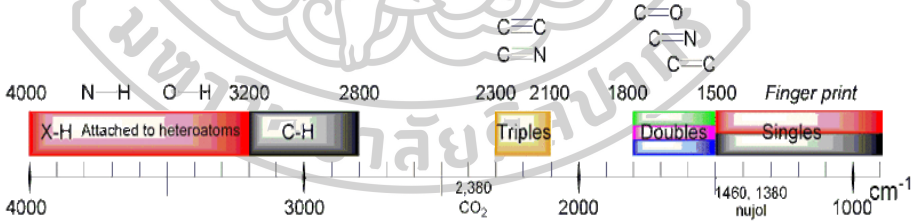
- ถ้าสารตัวอย่างมีความหนืดสูงมากหรือมีสภาพเป็นของแข็ง พบว่า relaxation time จะมีค่าน้อย และส่งผลให้พีคที่ได้มีความกว้างมาก (broad peak)
- ถ้าสารตัวอย่างมีความหนืดต่ำหรือเป็นสารละลายเจือจาง พบว่า relaxation time จะมีค่ามาก และส่งผลให้พีคที่ได้มีลักษณะแคบ (narrow peak)

เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

ภาพที่ 17 เครื่อง FT-IR

ที่มาของภาพ : หลักการ FT-IR [ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา https://www.slri.or.th/bdd/th/22-66-ftir-micro-spectrometer.html

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบเกี่ยวกับโมเลกุลของสาร โดยการกระตุ้นสารด้วยพลังงานแสงช่วงแสงอินฟราเรด (Infrared light) ที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ สามารถบอกหมู่ฟังก์ชันโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในตัวเครื่อง ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจยืนยันเอกลักษณ์ของสารเช่นเดียวกับเทคนิครามานสเปกโทรสโคปี ข้อดีคือเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจวัดสารที่มีความเป็นฟลูออเรสเซนต์ได้ดี นิยมใช้ในการตรวจสารเสพติด สารระเบิด สารตั้งต้น เป็นต้น มีความรวดเร็วในการออกผล และถูกต้อง แม่นยำ

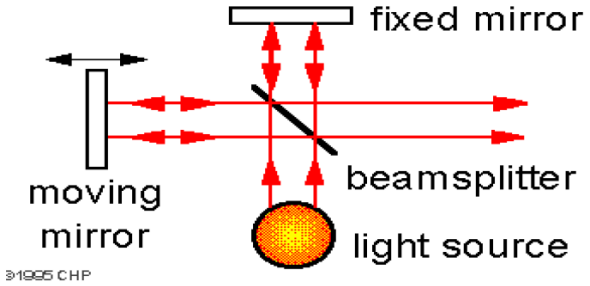


ภาพที่ 18 แสดงตัวอย่างของเลขคลื่นที่เกิดการดูดกลืน ของพันธะต่างๆ ในสารอินทรีย์

ที่มาของภาพ: Fourier-transform infrared spectroscopy[ออนไลน์]เข้าถึงเมื่อ30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา https://en.wikipedia.org

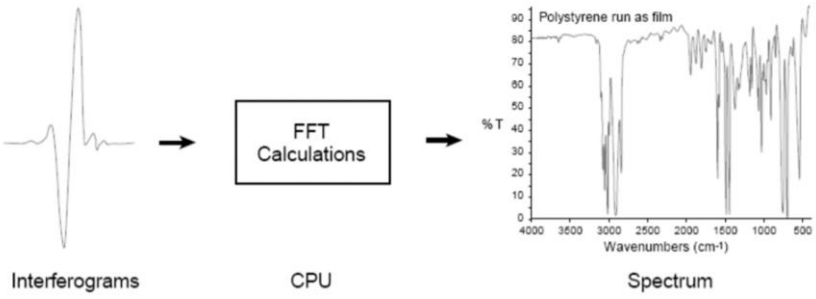
FTIR เป็นเทคนิคอินฟราเรดสเปคโตรสโคปีที่ใช้ อินเตอร์เฟอโรมิเตอร์ (Michelson Interferometer) ในการทำหน้าที่แยกแสงที่ผ่านออกจากเซลล์บรรจุสารตัวอย่างออกเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ สำหรับในอุปกรณ์ อินเตอร์เฟอโรมิเตอร์นั้น จะประกอบไปด้วยกระจกแบนราบ 2 แผ่นทำ

มุมตั้งฉากกัน โดยจะมี 1 แผ่นวางอยู่กับที่ ในขณะที่กระจกอีกหนึ่งแผ่นจะ เคลื่อนที่กลับไปกลับมาด้วยความเร็วคงที่ ในทิศทางที่ตั้งฉากกับระนาบของผิวกระจกดังกล่าว นอกจากนั้นยังมีตัวแยกลำแสง (beam splitter) ซึ่งวางทำมุม 45 องศา อยู่ระหว่างกระจกทั้ง 2 ซึ่ง beam splitter นี้จะทำหน้าที่แบ่งแยกลำแสงที่ออกมาจากแหล่งกำเนิดแสงให้แยกออกเป็น 2 ส่วน



ภาพที่ 19 แสดงการทำงานของ interferometer
ที่มาของภาพ: Polymer Spectroscopy[ออนไลน์]
เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มาwww.seem.kmutt.ac.th/research/pentec.

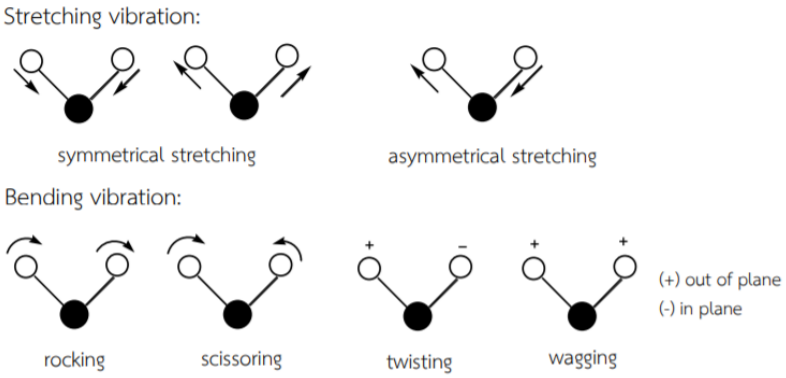
สัญญาณแสงที่ผ่าน Interferometer จะออกมาในรูป สัญญาณที่เรียกว่า interferogram ซึ่งต้องแปลงสัญญาณ ให้เป็น spectrum โดยใช้การคำนวณด้วย Fourier transform โดยใช้คอมพิวเตอร์ช่วยในการคำนวณ



ภาพที่ 20 แสดงวิธีการแปลงสัญญาณเป็น Sperctrum
ที่มาของภาพ: Polymer Spectroscopy[ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มา www.seem.kmutt.ac.th/research/pentec.

การสั่นพันธะภายในโมเลกุลสารอินทรีย์จะเป็นพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งเกิดจากแต่ละอะตอมใช้อิเล็กตรอน ร่วมกัน โดยปกติพันธะจะเกิดการสั่นอยู่ตลอด เรียกว่า การสั่นหลักมูล (fundamental vibration) จำแนกออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

1. แบบยืด (stretching) คือ พันธะระหว่างอะตอมยืดออกหรือหดตามแกน เกิดได้ทั้งแบบยืดสมมาตร (symmetrical stretching) และแบบยืดไม่สมมาตร (asymmetrical stretching)
2. แบบงอ (bending) คือ พันธะระหว่างอะตอมเปลี่ยนตำแหน่งไปจากแกนพันธะเดิม ส่งผล ทำให้มุมพันธะเปลี่ยนแปลง



ภาพที่ 21 แสดงลักษณะการสั่นภายในโมเลกุลสารอินทรีย์

ที่มาของภาพ: Polymer Spectroscopy[ออนไลน์]

เข้าถึงเมื่อ 30 พฤษภาคม 2562 แหล่งที่มาwww.seem.kmutt.ac.th/research/pentec.

วรรณกรรมและการรายงานพืชกระท่อม

Field และคณะ [11] สามารถทำการสกัดแยกสารอัลคาลอยด์จากใบกระท่อม คือ Mitragynine

นิวัติ แก้วประดับ [6] สามารถสกัดสารอัลคาลอยด์ออกมาได้ทั้งหมด 9 ชนิด จากพืชกระท่อม ได้ดังนี้ mitragynine, paynantheine, speiogynine, mitraciliatine, ajmalicine, isotoropodine, mitraphylline และ tetrahydroalitonine โดยที่ tetrahydroalitonine ไม่มีรายงานว่าเคยสกัดพบมาก่อนเนื่องจากความคงตัวไม่ดีจึงพบเฉพาะใบกระท่อมสดเท่านั้น

Chan, Pakiamและ Rahim [12] ได้นำพืชกระท่อมและน้ำต้มใบกระท่อมตรวจหา ไมทราไจนีน โดยใช้เทคนิค Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) และ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Parthasarathy[13] และคณะ ศึกษาสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้จากน้ำต้มกระท่อม โดยสารสกัดในชั้นน้ำของกระท่อม มีผลต่อการ ทำงานของเอนไซม์ glutathione transferase (GST) ในหนูขาว โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการกำจัดพิษออก จากร่างกาย ในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดชั้นน้ำมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีรายงาน ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด Salmonella typhi และ Bacillus subtilis อีกด้วย

Ori และคณะ [14] ศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัด mitragynine จากใบกระท่อมอินโดนีเซีย โดยใช้คลื่นเสียง ไมโคเวฟ และ solid-phase extraction พบว่าทำให้ได้ปริมาณสูงกว่าวิธีดั้งเดิม (Orio et al, 2012) และยังพบสาร alkaloid ตัวอื่น ๆ ได้อีก เช่น speciogynine, speciociliatine, paynantheine และ 7-hydroxy-mitragynine เป็นต้น

วราพงษ์ เสนะวีระกุล [15] ศึกษาและทำการทดลองการสกัดใบกระท่อมด้วย acetic acid และนำชั้นของ ethyl acetate มาวิเคราะห์ เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค gas chromatography ชนิด mass detector พบปริมาณสารสกัด mitragynine ที่ได้มีปริมาณสูงพอนำไปใช้เป็นสารเปรียบเทียบแทนสารมาตรฐาน mitragynine ได้

สมฤดี [16] ศึกษาผลกระทบด้านร่างกายและจิตใจของผู้ที่ใช้กระท่อมแบบเคี้ยวและน้ำต้มสี่คูณร้อย พบว่าทั้งสองให้ผลข้างเคียงไม่ต่างกันทางร่างกาย หัวใจเต้นเร็ว ปากแห้ คอแห้ง รองลงมาคือมีผิวคล้ำเข้มขึ้น รวมถึงอาการถอนยา และไม่พบผลกระทบด้านอาชญากรรม

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ [17]สรุปรายงานประจำปีงบประมาณ 2561 พบตัวอย่างยาเสพติดที่พบร่วมกับยาที่นำไปใช้ในทางที่ผิดมากที่สุด คือ น้ำต้มพืชกระท่อม ตรวจพบของกลางที่เป็นน้ำต้มพืชกระท่อม และน้ำต้มพืชกระท่อมผสมยาแผนปัจจุบัน คิด เป็นร้อยละ 38.1 และ 61.9 ตามลำดับ ยาแผนปัจจุบันที่พบผสมกับน้ำ ต้มพืชกระท่อม ได้แก่ ยาแก้แพ้ Chlorpheniramine, ยาแก้แพ้ Diphenhydramine และยาแก้ปวด Tramadol เพื่อท าให้มึนงงจากผลข้างเคียงของยา โดยตัวอย่างที่พบยาแผนปัจจุบันในน้ำต้มพืชกระท่อมมีสัดส่วนเพิ่มขึ้นในแต่ ละปี

ผลการปราบปราบยาเสพติดทั่วประเทศ [18]ปี พ.ศ.2560 จากสำนักงาน ป.ป.ส. พบว่าการจับกุมยาเสพติดคดีพืชกระท่อม 20,560 คดี และมีน้ำหนักของกลาง 94,425.37 กิโลกรัม มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ พ.ศ.2550 – พ.ศ.2560 เป็นต้นมา

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม

ตารางที่ 1 แสดงอุปกรณ์ในการสกัดไมทราไจนีน

อุปกรณ์	แหล่งที่มา
Centrifuge	Himac
Centrifuge tube	NEST
Vacuum Evaporator	Buchi
Chamber	Alltech
Hot plate stirrer	Cole-Parmer
เครื่องชั่งดิจิตอล	Mettler Toledo
กระดาษ Ph	Merck
TLC Silica gel	Merck
NMR	Bruker 300MHz

สารเคมีสำหรับใช้ในการสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดไมทราไจนีน

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acetic acid	Ecochem
Ammonium Solution 25%	Carlo Erba
Ethyl Acetate	Sigma
Hexane	Fluka
Methanol	BDH

วิธีการทดลอง

การสกัดและแยกสารไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม

ภาพที่ 22 แสดงใบกระท่อมอบแห้งบดละเอียด

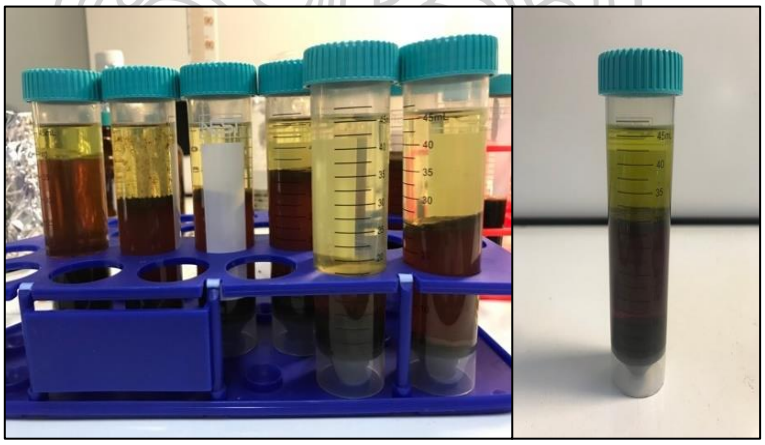
นำใบกระท่อมตากแห้งบดละเอียด ชั่งน้ำหนัก 2.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติม 50 % Acetic acid 40 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 30 นาที ทำการปรับกรด - ต่าง ด้วยการเติม Ammonium Solution 25% ได้ PH ≈ 9

ภาพที่ 23 สกัดโดยใช้ความร้อน

เติม Ethyl Acetate 40 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนสาร 1 นาที

ภาพที่ 24 แสดงการแยกชั้นของ Ethyl Acetate

แบ่งใส่ Centrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm เวลา 1 นาที

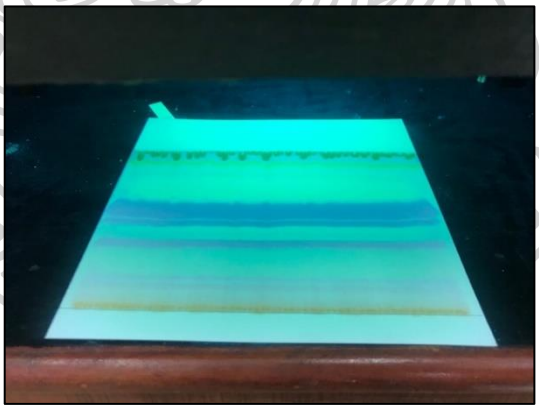


ภาพที่ 25 หลังการปั่นเหวี่ยงจะเห็นการแยกชั้นที่ชัดเจน

นำไประเหยด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator ที่อุณหภูมิ 30 – 50 องศาเซลเซียส นำตรวจสอบความถูกต้องของสารที่ต้องการด้วย Preparation TLC หยดสารลงบนแผ่นอะลูมิเนียมโครมาโตกราฟี

ภาพที่ 26 การแยกไมทราไจนีนบนแผ่น TLC

เตรียมระบบ โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ Hexane และ Ethyl Acetate อัตราส่วน 30 : 70 ตามลำดับ นำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV



ภาพที่ 27 การแยกของแถบไมทราไจนีน

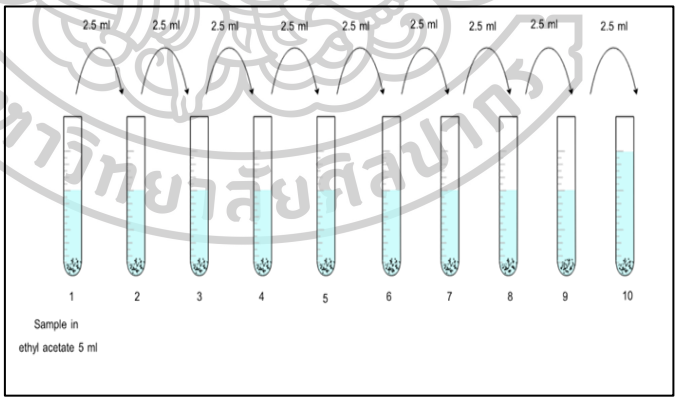
การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของไมทราไจนีน

ขูดแถบที่เป็นไมทราไจนีนจากแผ่น TLC เติม Ethyl Acetate เพื่อชะไมทราไจนีนออกมาจากแผ่นซิลิกา กรองผ่านกรวยกรองบุด้วยสำลี นำของเหลวที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator เพื่อแยกตัวทำละลายออกจนหมด ชั่งน้ำหนักไมทราไจนีนที่แยกได้ จากนั้นนำไป

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไมทราไจนีนด้วยเทคนิค FTIR ตรวจสอบเอกลักษณ์ ^{1}H-NMR, ^{13}C- NMR และทดสอบหาปริมาณต่ำสุดบนแผ่น TLC

ภาพที่ 28 กรองไมทราไจนีนส่วนที่สกัด

หาความเข้มข้นต่ำสุดของไมทราไจนีนที่สามารถตรวจพบได้



ภาพที่ 29 วิธีเจือจางไมทราไจนีน

เจือจางสารด้วย Ethyl Acetate อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC จนกว่าจะมองไม่เห็นแถบของสารไมทราไจนีน ด้วยแสงยูวี ที่ช่วงความยาวคลื่น 100 – 280 นาโนเมตร

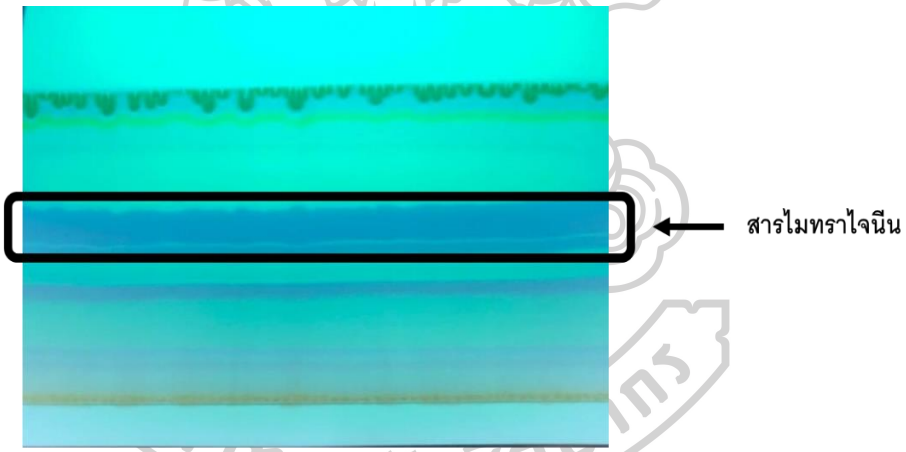
บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการทดลองการทำให้บริสุทธิ์สามารถใช้การสกัดและการแยกสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมโดยวิธีดัดแปลงการสกัดไมทราไจนีน [2] การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไมทราไจนีนด้วยเทคนิค FT-IR ตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR, ^{13}C NMR และหาปริมาณต่ำสุดของไมทราไจนีนจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

การสกัดและแยกสารไมทราไจนีน

การสกัดสารไมทราไจนีนด้วยวิธีดัดแปลง [2] และการทำให้สารไมทราไจนีน บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง Thin layer chromatography



ภาพที่ 30 แสดงการแยกของแถบไมทราไจนีน

การใช้ตัวทำละลายของไมทราไจนีนด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ Hexane : Ethyl Acetate ที่ 30:70 ตามลำดับ สามารถแยกไมทราไจนีนออกจากสารอื่น ๆ ได้ โดยมีค่า R_f อยู่ที่ 0.5 เซนติเมตร ค่า R_f (Rate of flow) เป็นค่าเฉพาะตัวของสาร จะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายและตัวดูดซับ ดังนั้นการบอกค่า R_f ของสารแต่ละชนิดจึงต้องบอกชนิดของตัวทำละลาย และตัวดูดซับเสมอ

ค่า R_f สามารถคำนวณได้จากสูตร เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกไมทราไจนีน ด้วยเทคนิค TLC สามารถคำนวณค่า R_f ของสารไมทราไจนีนได้ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (เซนติเมตร)}}$$

$$R_f \text{ สารไมทราไจนีน} = \frac{7}{14}$$

ดังนั้น ค่า R_f ของไมทราไจนีนที่สกัด = 0.5 เซนติเมตร

การทดลองสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมอบแห้ง ที่น้ำหนัก 2.5 กรัม เติมกรดอะซิติก ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 40 มิลลิลิตร ใช้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปรับ PH โดยใช้ ammonium solution 25% ปรับเบส ให้อยู่ในช่วง PH ≈ 9 ใช้ เอททิลอะซิเตทชะสารไมทราไจนีนที่สกัดนำไปปั่นเหวี่ยงเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจน นำไประเหยเพื่อทำให้สารสกัดมีความเข้มข้น และใช้ตัวทำละลายของไมทราไจนีนด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ Hexane : Ethyl Acetate ที่ 30:70 ตามลำดับ สามารถสกัดได้สารไมทราไจนีน 6.325 มิลลิกรัม

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ Yield ของสารไมทราไจนีนที่สกัดได้

$$\%\, Yield = \frac{\text{น้ำหนักสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณกระท่อมบดละเอียด (มิลลิกรัม)}} \times 100$$

$$\%\, Yield = \frac{6.325}{2500} \times 100$$

ดังนั้น เปอร์เซ็นต์ Yield ของสารไมทราไจนีนที่สกัดได้ = 0.253 เปอร์เซ็นต์

การสกัดไมทราไจนีนด้วยวิธีดัดแปลง [2]จากแผ่นใบกระท่อม ก้านใบกระท่อม และกิ่ง ชนิดละ 2.5 กรัม

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักไมทราไจนีน

การแยกสารไมทราไจนีน	น้ำหนักไมทราไจนีนจากการสกัดพืชกระท่อม (มิลลิกรัม)		
	แผ่นใบ	ก้านใบ	กิ่ง
ครั้งที่ 1	11.4	15.5	14.4
ครั้งที่ 2	17	12.6	20.5

จากการทดลองพบว่าน้ำหนักของสารไมทราไจนีนที่ได้จากการสกัด (Crude) ส่วนของพืชกระท่อมผลที่ได้ แผ่นใบมี 11.4 – 17 มิลลิกรัม ก้านใบมี 12.6 – 15.5 มิลลิกรัม และกิ่งมี 14.4 – 20.5 มิลลิกรัม เมื่อคำนวณ % Yield ให้ผลดังตารางที่ 4

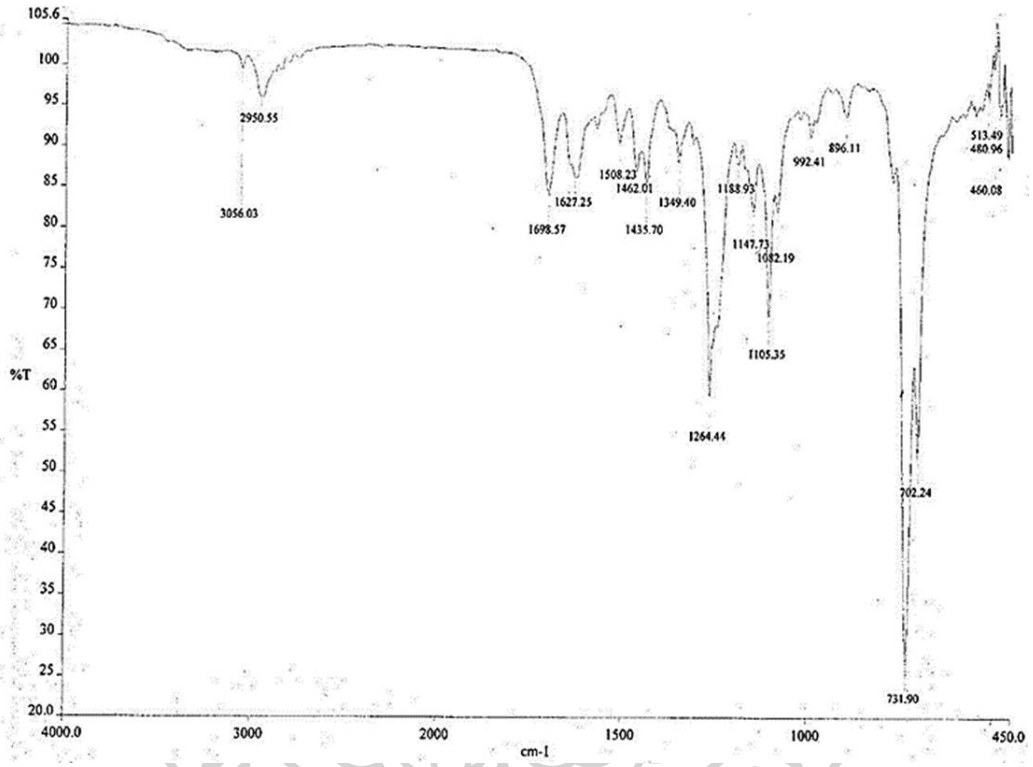
ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์ Yield

การแยกสารไมทราไจนีน	ปริมาณไมทราไจนีน (%Yield)		
	แผ่นใบ	ก้านใบ	กิ่ง
ครั้งที่ 1	0.46	0.62	0.58
ครั้งที่ 2	0.68	0.50	0.82
$\bar{x}$	0.57	0.56	0.70

จากตารางที่ 4 ผลผลิตจากการสกัดไมทราไจนีน ที่แผ่นใบมีประมาณ 0.57 % ก้านใบมีประมาณ 0.56 % และที่กิ่งมีประมาณ 0.70 % โดยที่ %Yield คือ การคำนวณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาเคมีในรูปร้อยละ

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วย Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไมทราไจนีนด้วยเทคนิค FTIR

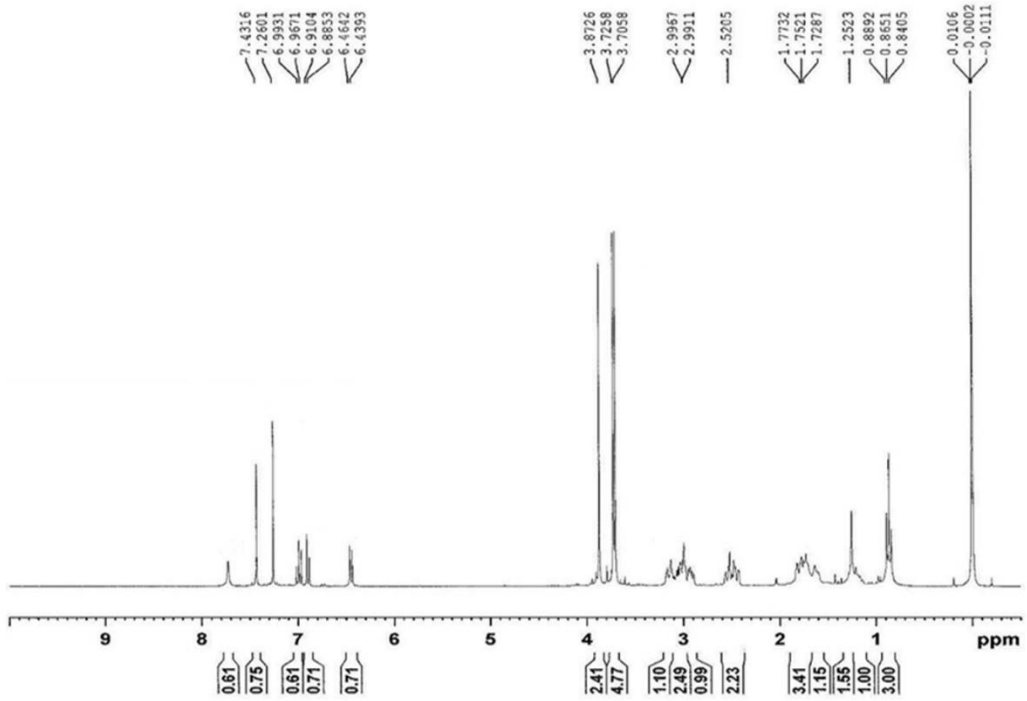


ภาพที่ 31 แสดง Spectrum ของ Mitragynine ด้วยเทคนิค FT-IR

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าพีคของ N-H ปรากฏตำแหน่งที่มากกว่า 3000 cm^{1} การดึงและการยืดของพันธะ C-H ปรากฏที่ 2950 ปรากฏพีคการดึง ของ carbonyl group ที่ 1698 cm^{-1} ปรากฏพีคของพันธะ C=C ของ aromatic ปรากฏที่ 1435 - 1508 cm^{-1} พีคของ C-O จากพันธะของ ether ปรากฏพีคที่ 1264 cm^{-1}

การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ^{1}H-NMR, (300 MHz, $CDCl_3$)

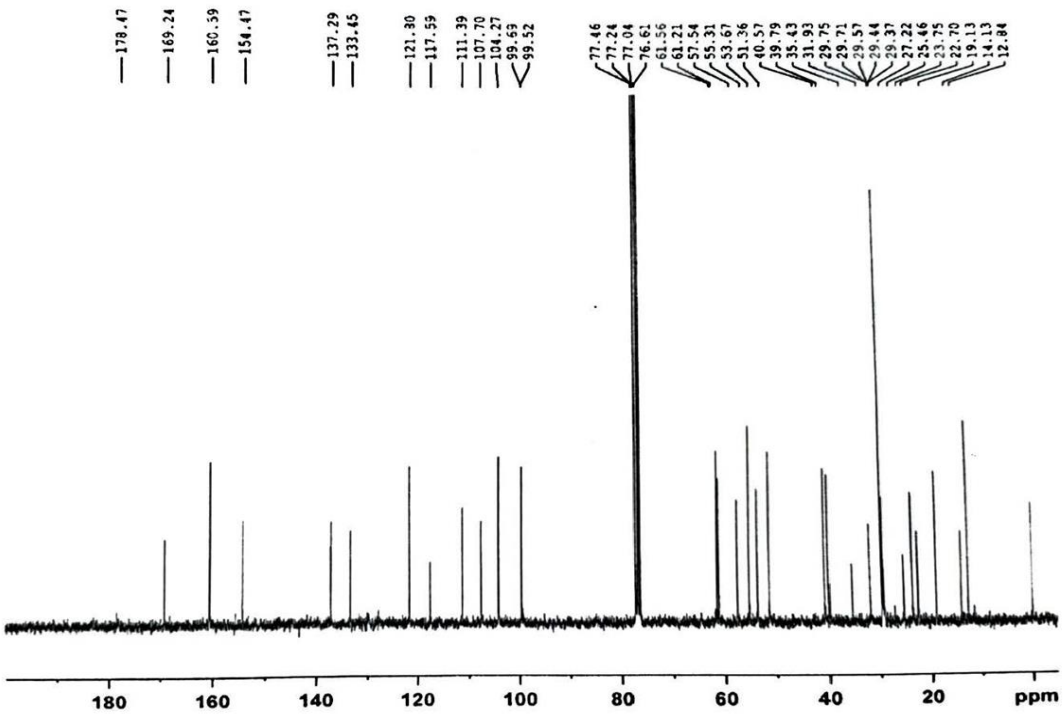


ภาพที่ 32 แสดง ^{1}H-NMR จากการสกัด

ตารางที่ 5 แสดงค่า Chemical Shift ^{1}H-NMR

Proton	Chemical Shift, ppm
R-CH_3	0.80
R_2-CH_3	1.20
R_3-C-H	1.70
OHC_3	3.7 - 4
Aromatic	6.4 - 7
N-H	7 - 8

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ^{13}C-NMR



ภาพที่ 33 แสดงค่า ^{13}C-NMR จากการสกัด

ตารางที่ 6 แสดงค่า Chemical Shift ^{13}C-NMR

Carbon	Chemical Shift, ppm
O=C-R	160 - 200
Aromatic C	110 - 150
C-O	40 - 77
C-C	0 - 40

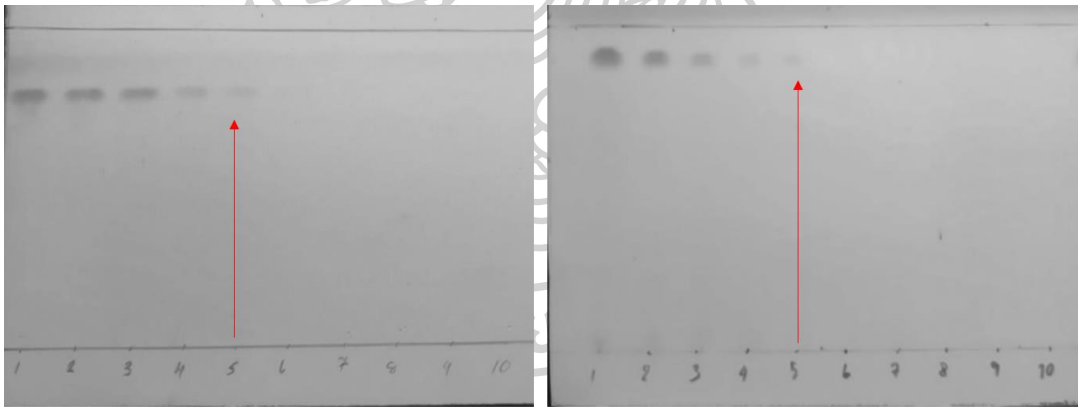
จากค่า Chemical Shift ของ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ในตำแหน่งต่างๆ ตรงกับไมทราไจนีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ [19]

การหาความเข้มข้นไมทราไจนีนต่ำสุดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง

ตารางที่ 7 แสดงความเข้มข้นไมทราไจนนีน

ตำแหน่งที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ความเข้มข้นของไมทราไจนีน mg/ml	2.530	1.265	0.633	0.316	0.158	0.079	0.040	0.020	0.010	0.005

หาความเข้มข้นต่ำสุดโดยการเจือจางสารด้วย Ethyl Acetate ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC จนกว่าจะมองไม่เห็นแถบของสารไมทราไจนีนภายใต้แสง UV ที่ช่วงความยาวคลื่น 100 – 280 นาโนเมตร



ครั้งที่ 1 ครั้งที่ 2

ภาพที่ 34 ไมทราไจนีนบนแผ่น TLC ที่ความเข้มข้นต่างๆ

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของไมทราไจนีนที่ตรวจได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี พบว่าผลของเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบางทั้ง 2 ครั้ง สามารถวิเคราะห์ไมทราไจนีนที่มีปริมาณความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 0.16 mg/ml

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการสกัดและการแยกสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมโดยวิธีดัดแปลงการสกัดไมทราไจนีน [2]สามารถนำมาใช้ในการสกัดเพื่อแยกไมทราไจนีนออกจากพืชกระท่อม เมื่อนำมาแยกบนแผ่น TLC ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจะได้ค่า R_f ที่ 0.5 ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง Hexane : Ethyl Acetate อัตราส่วน 30 : 70 ตามลำดับ ตัวทำละลายที่เหมาะสมทำให้สารที่นำมาแยกมีการเคลื่อนที่เร็ว และมีการแยกตัวจากสารชนิดอื่นๆชัดเจน น้ำหนักของสารไมทราไจนีนที่ได้จากการสกัด (Crude) ส่วนของใบกระท่อม 2.5 กรัม มีไมทราไจนีน 6.325 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield มีค่าเท่ากับ 0.253 %

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR เพื่อบอกถึงองค์ประกอบหมู่ฟังก์ชันที่ตรวจวิเคราะห์ได้ พบว่าพีคของ N-H ปรากฏตำแหน่งที่มากกว่า 3000 cm^{-1} การดึงและการยืดของพันธะ C-H ปรากฏที่ 2950 ปรากฏพีคการดึง ของ carbonyl group ที่ 1698 cm^{-1} ปรากฏพีคของพันธะ C=C ของ aromatic ปรากฏที่ 1435 - 1508 cm^{-1} พีคของ C-O จากพันธะของ ether ปรากฏพีคที่ 1264 cm^{-1} จากค่า frequency ที่แดงข้างต้นมีหมู่ฟังก์ชันตรงกับ Mitragynine การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR แสดงค่า Chemical shift ของ R-CH3 = 0.80, R2-CH3 = 1.20, R3-C-H = 1.70, OHC3 = 3.7 - 4 , Aromatic = 6.4 – 7, N-H = 7 - 8 และ ^{13}C-NMR แสดงค่า Chemical shift ของ O=C-R = 160 – 200, Aromatic C = 110 – 150, C-O = 40 – 77, C-C =0 - 40 ซึ่งในตำแหน่งต่าง ๆเป็นไปตามโครงสร้างของ Mitragynine สอดคล้องกับงานวิจัยของ [5, 20]

การหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของไมทราไจนีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) ในครั้งที่ 1 พบแถบไมทราไจนีนในตำแหน่งที่ 1 (2.53 mg/ml), 2 (1.26 mg/ml), 3 (0.63 mg/ml), 4 (0.32 mg/ml) และ 5 (0.158 mg/ml) และครั้งที่ 2 พบแถบไมทราไจนีนบนแผ่น TLC ได้เหมือนกับ ครั้งที่ 1 โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดในตำแหน่งที่ 5 มีความเข้มข้น 0.158 mg/ml

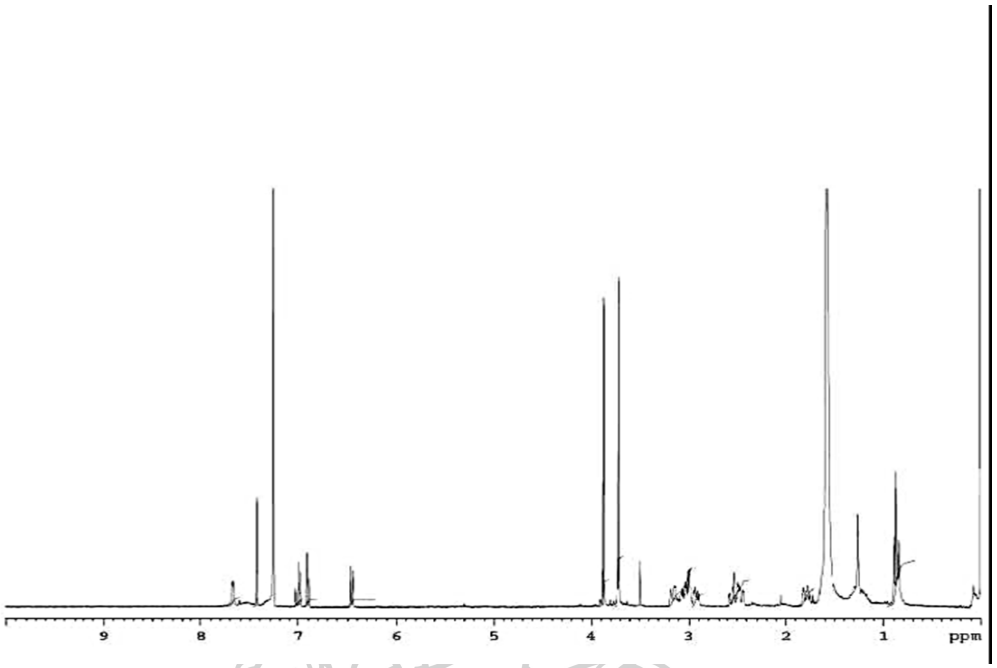
สรุปผลการสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม *Mitragyna Speciosa* (Korth) Havil. จากจังหวัดราชบุรี โดยใช้วิธีดัดแปลง[2] และแยกด้วยเทคนิค TLC สามารถแยกมาทราไจนีนออกจากสารชนิดอื่นๆได้ โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ Hexane : Ethyl Acetate อัตราส่วน 30 : 70 พบที่ตำแหน่ง R_f ที่ 0.5 เมื่อนำไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันและพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR, ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR สอดคล้องกับงานวิจัย*ปริมาณสารไมทรานีนที่ได้พบว่า ใบกระท่อม 2.5 กรัม มีไมทราไจนีน 6.325 มิลลิกรัม แผ่นใบกระท่อม 2.5 กรัม มี 11.4 – 17 มิลลิกรัม ก้านใบ 2.5 กรัม มี 12.6 – 15.5 มิลลิกรัม และกิ่งใบมี 14.4 – 20.5 มิลลิกรัม ไมทราไจนีนที่สามารตรวจด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (TLC) ต้องมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 0.158 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้คาดว่าสามารถนำวิธีการสกัดไปใช้สกัดสารไมทราไจนีนจากพืชกระท่อมเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ วัตถุพยาน หรือของกลางที่มี

ส่วนประกอบของพืชกระท่อม รวมถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่พบโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแผ่นบางนำไปพัฒนาเป็นชุดทดสอบเบื้องต้นของพืชกระท่อมเพื่อใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์

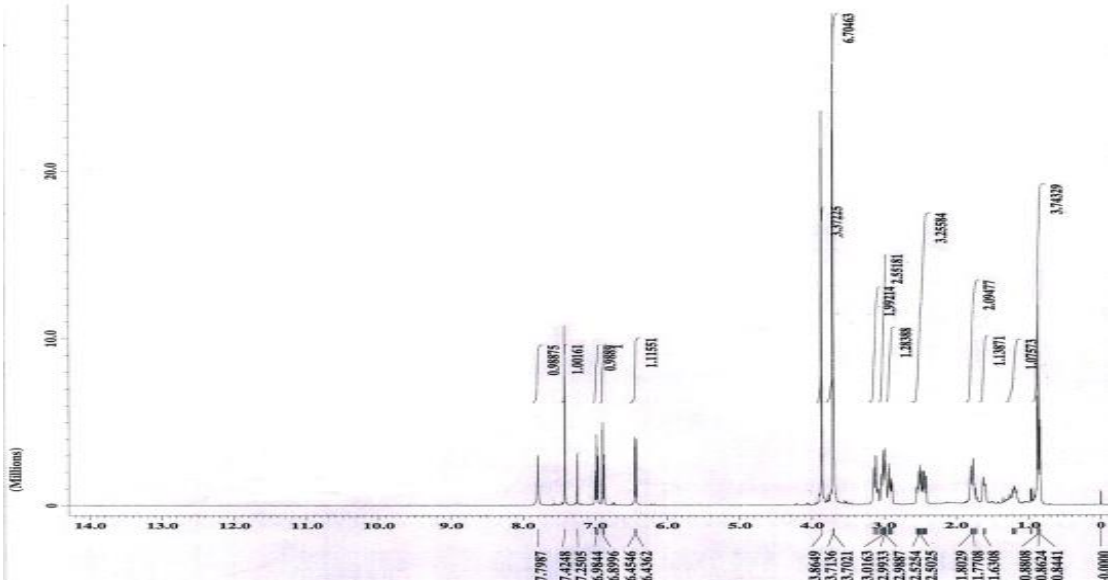
มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก

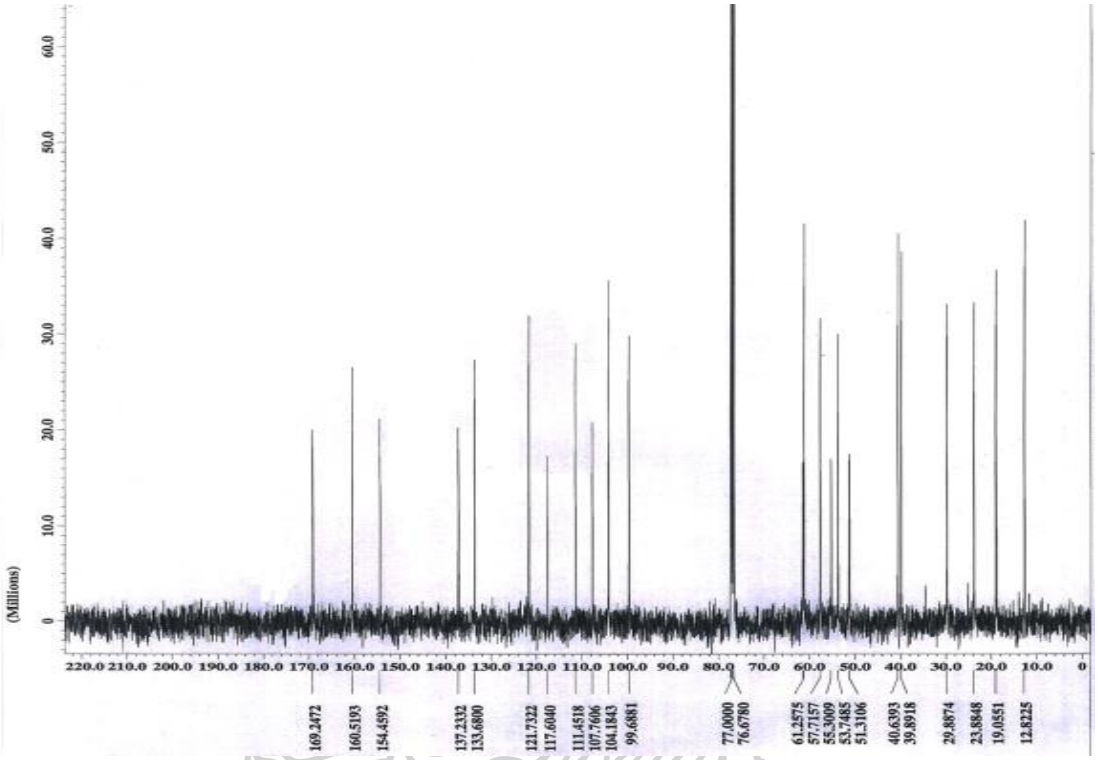
NMR ^{1}H-NMR spectrum (CDCl3, 300MHz) Mitragynine [5]



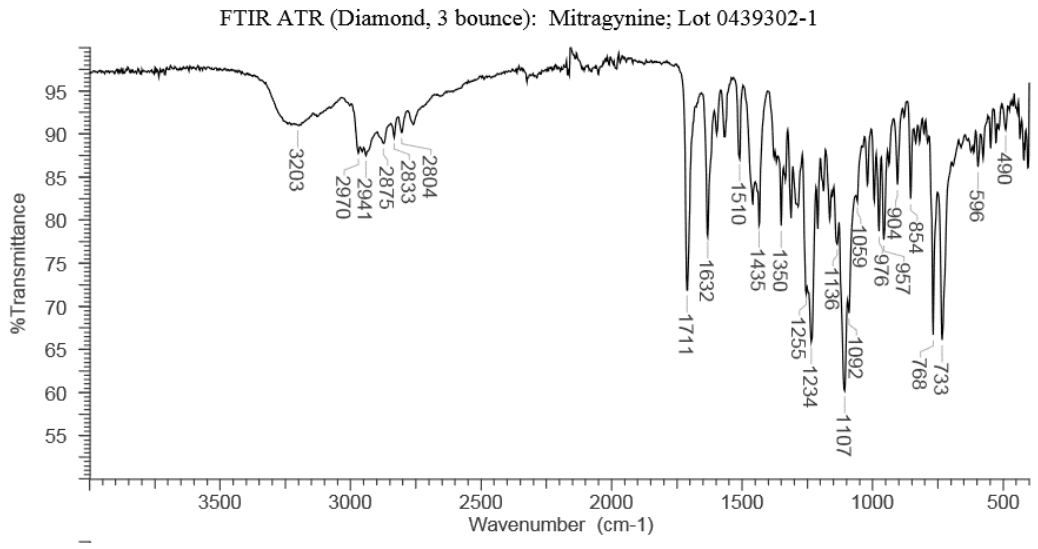
NMR ^{1}H-NMR spectrum [19]



NMR ^{13}C-NMR spectrum [19]



FT-IR mitragynine [21]



รายการอ้างอิง

1. ป.ป.ส., ส.ส., ผลปราบปรามยาเสพติดทั่วประเทศ 2560. 2560: ห้างหุ้นส่วนจำกัด บางกอกบล๊อก.
2. กิตติศักดิ์ เหมือนดาว, การเปรียบเทียบวิธีสกัดไมทราไจนีน จากใบกระท่อมเพื่องานทางนิติวิทยาศาสตร์. 2561.
3. เต็ม.สมิตินันท์, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. 2557, กรุงเทพฯ: จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด: บรรณาธิการ หน่วยระบาดวิทยา คณะ แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
4. หวังสินทวีกุล, จ., พืชออกฤทธ์ต่อจิตประสาท. 2554, สงขลานีโอพ้อยท์: เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
5. Isabel, K., *Total Synthesis Of Mitragynine And Analogues*. 2012, University Van Amsterdam.
6. นิวัติ แก้วประดับ, รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดใบกระท่อม. 2552: สงขลา.
7. กระทรวงยุติธรรม., ส.ป.ป.ส., รวมกฎหมายยาเสพติดพร้อมด้วยกฎกระทรวง ระเบียบข้อบังคับที่เกี่ยวข้อง. 2556, กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดบางกอกบล็อก.
8. อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ and นันทวัน บุณยะประภัศร, การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. 2536: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย มหิดล.
9. Kowalczuk, A.P., A. Łozak, and J.K. Zjawiony, *Comprehensive methodology for identification of Kratom in police laboratories.* Forensic Science International, 2013. 233(1): p. 238-243.
10. วรานุศุภากุล, พ., *Planar Chromatography*. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
11. Field, E., *Mitragynine and mitraversine, two new alkaloids from species of mitragyne.* Journal of the Chemical Society, Transactions, 1921. 119: p. 887-891.
12. Chan, K.B., C. Pakiam, and R.A. Rahim, *Psychoactive plant abuse: the identification of mitragynine in ketum and in ketum preparations.* Bull Narc, 2005. 57(1-2): p. 249-56.

13. 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(10).
14. Orio, L., et al., *UAE, MAE, SFE-CO2 and classical methods for the extraction of Mitragyna speciosa leaves.* Ultrasonics Sonochemistry, 2012. 19(3): p. 591-595.
15. เสนะวีระกุล, ว., การตรวจพิสูจน์ *Mitragynine* เชิงคุณภาพในน้ำต้มกระท่อม ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟ, in (เภสัชวิทยา). 2533, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.: กรุงเทพฯ.
16. สมฤดี เอี่ยมฤดี, ผลกระทบด้านร่างกาย จิตใจและพฤติกรรมผู้ใช้ใบกระท่อม, in คณะแพทย์ศาสตร์. 2560, จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย.
17. สำนักยาและวัตถุเสพติด, รายงานประจำปีงบประมาณ 2561 ยาเสพติด. 2560: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
18. สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด, พ.ร.บ. ยาเสพพติดให้โทษ. 2560.
19. Shamima, A.R., et al., *Antinociceptive action of isolated mitragynine from Mitragyna speciosa through activation of opioid receptor system.* International journal of molecular sciences, 2012. 13(9): p. 11427-11442.
20. บุรมรา, น., การหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย. 2554, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
21. swgdrug. *Mitragynine*. 2013; Available from: http://www.swgdrug.org/Monographs/Mitragynine.pdf.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ภัทรธิดาพร ทวีสุข
วัน เดือน ปี เกิด	22 01 2535
วุฒิการศึกษา	ปริญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์สุขภาพ สาขาเทคโนโลยีชีวการแพทย์ มหาวิทยาลัยคริสเตียน
ที่อยู่ปัจจุบัน	กรุงเทพมหานคร. ประเทศไทย