วิธีสกัด การตรวจหาสารพฤกษเคมี ปริมาณสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดย
นายสมโภช บุญเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา แผน ก แบบ ก 2
ภาควิชาเคมี
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2567
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

วิธีสกัด การตรวจหาสารพฤกษเคมี ปริมาณสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดย
นายสมโภช บุญเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา แผน ก แบบ ก 2
ภาควิชาเคมี
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2567
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EXTRACTION, PHYTOCHEMICAL SCREENING, QUANTIFICATION OF MITRAGYNINE FROM KRATOM LEAVES, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY TESTING

By

MR. Sompod BOONLERT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science CHEMICAL STUDIES

Department of CHEMISTRY

Academic Year 2024

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	วิธีสกัด การตรวจหาสารพฤกษเคมี ปริมาณสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
โดย	นายสมโภช บุญเลิศ
สาขาวิชา	เคมีศึกษา แผน ก แบบ ก 2
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรกช ชั้นจิรกุล)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กฤช เศรษฐการ)

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

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(อาจารย์ ดร. จันจิรา จรามรบูรพงศ์)

660720003 : เคมีศึกษา แผน ก แบบ ก 2
คำสำคัญ : ใบกระท่อม, ไมทราไจนีน, การสกัดด้วยไมโครเวฟ, คลื่นอัลตราโซนิก, สารต้านอนุมูลอิสระ

นาย สมโภช บุญเลิศ: วิธีสกัด การตรวจหาสารพฤกษเคมี ปริมาณสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา

พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้าน มีการใช้งานเพื่อบรรเทาอาการปวด อ่อนเพลีย ลดอาการอักเสบ โดยใบกระท่อมมีสารสำคัญคือ ไมทราไจนีน (Mitragynine) เป็นสารหลักที่พบจากใบคิดเป็นร้อยละ 66.20% ของสารทั้งหมด ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของพืชชนิดนี้ ผลทางเภสัชวิทยาของใบกระท่อมที่ได้รับการศึกษาเช่น ยาแก้ปวดยาลดไข้ ยากดประสาท ยากระตุ้นประสาท ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารไมทราไจนีน (Mitragynine) จากใบกระท่อมสายพันธุ์ก้านแดง (*Mitragyna speciosa*) โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยไมโครเวฟ (Microwave-Assisted Extraction, MAE) และไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก (Microwave-Ultrasonic-Assisted Extraction, MUAE) ร่วมกับตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และเอทานอล โดยใช้กรดซิตริกเป็นตัวช่วยในการสกัด และศึกษาผลของการปรับค่า pH ต่อประสิทธิภาพการสกัด การตรวจหาสารพฤกษเคมี ทดสอบความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน และประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH assay ผลการศึกษาพบว่า การสกัดด้วยไมโครเวฟโดยไม่ปรับค่า pH และใช้ตัวทำละลายเอทานอลล้วน ร่วมกับการสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน (DCM) ให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด (%Yield = 68.34%) ในขณะที่การใช้ไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิกในสภาวะเดียวกันให้ผลผลิตลดลง (%Yield = 46.25%) การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สารสกัดที่ได้จากไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก ปรับค่า pH ใช้ตัวทำละลายเอทานอลล้วน และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน (DCM) ให้ความบริสุทธิ์สูงสุดของสารไมทราไจนีน (87.954%) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ที่แสดงค่า R_f ตรงกับสารมาตรฐาน (R_f = 0.72) การตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีพบว่า สารสกัดจากใบกระท่อมมีสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และฟีนอลิก ซึ่งอาจมีส่วนช่วยในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดที่ได้จากไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก ปรับค่า pH ใช้ตัวทำละลายเอทานอลล้วน และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน (DCM) มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (520.25 µg/mL) แสดงถึงประสิทธิภาพใน

การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ สรุปได้ว่า เทคนิคการสกัดด้วยไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก ปรับค่า pH ใช้ตัวทำละลายเอทานอลล้วน และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน (DCM) เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม ทั้งในด้านปริมาณผลผลิต ความบริสุทธิ์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการวิจัยนี้มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเวชสำอางต่อไป

660720003 : Major CHEMICAL STUDIES
Keyword : Kratom leaves, Mitragynine, Microwave-assisted extraction, Ultrasonic-assisted extraction, Antioxidant activity

MR. Sompod BOONLERT : Extraction, Phytochemical Screening, Quantification of Mitragynine from Kratom Leaves, and Antioxidant Activity Testing
Thesis advisor : Dr. Muhammad Niyomdecha

Kratom (*Mitragyna speciosa*) is a traditional medicinal plant widely used in Southeast Asia to alleviate pain, fatigue, and inflammation. The leaves of kratom contain mitragynine as the major bioactive alkaloid, accounting for approximately 66.20% of the total alkaloid content. Pharmacological studies have demonstrated various biological effects of kratom leaves, including analgesic, antipyretic, sedative, stimulant, anti-inflammatory, and antibacterial activities against pathogens such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. This study aimed to extract mitragynine from the red vein variety of *Mitragyna speciosa* using microwave-assisted extraction (MAE) and microwave-ultrasonic-assisted extraction (MUAE), with different solvent systems distilled water, water-ethanol mixtures, and pure ethanol. Citric acid was used as an extraction aid, and the effect of pH adjustment on extraction efficiency was investigated. Phytochemical screening, purity analysis of mitragynine, and antioxidant activity using the DPPH assay were performed. The results showed that MAE using pure ethanol without pH adjustment, followed by re-extraction with dichloromethane (DCM), yielded the highest crude extract yield (%Yield = 68.34%). In contrast, MUAE under the same conditions resulted in a lower yield (%Yield = 46.25%). HPLC analysis revealed that the highest purity of mitragynine (87.954%) was obtained from MUAE with pH adjustment, using pure ethanol and subsequent DCM extraction. TLC analysis also confirmed this result with an R_f value matching the standard (R_f = 0.72). Phytochemical analysis indicated the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, and phenolic compounds, which are likely contributors to the extract's biological activity. In the DPPH assay, the extract obtained under MUAE with pH adjustment and using pure ethanol as the solvent showed the lowest IC_{50} value

(520.25 µg/mL), indicating the strongest antioxidant activity among all tested samples. In conclusion, the microwave-ultrasonic-assisted extraction method with pH adjustment, pure ethanol as the solvent, and DCM as a secondary extraction solvent was the most effective technique for extracting mitragynine from kratom leaves in terms of yield, purity, and antioxidant capacity. These findings demonstrate the potential application of this extraction method in the pharmaceutical and cosmeceutical industries.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.มูฮำหมัด นิยมเดชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิจัยที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ตลอดจนการตรวจสอบและปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในรายงานวิจัยฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤช เศรษฐการ และอาจารย์ ดร.จันจิรา จรามรบูรพงศ์ ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบ และให้คำแนะนำสำหรับงานวิจัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์การทดลองสารเคมีต่าง ๆ ตลอดการวิจัย ผู้วิจัยหวังอย่างยิ่งว่างานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจต่อไป

สมโภช บุญเลิศ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ซ

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง 1

สารบัญรูปภาพ 2

หน้า 2

บทที่ 1 4

บทนำ 4

ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 4

วัตถุประสงค์ 6

สมมติฐานงานวิจัย 6

ขอบเขตของงานวิจัย 7

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7

บทที่ 2 8

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

พืชกระท่อม 8

สารไมทราไจนีน (Mitragynine) 9

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชกระท่อม 11

อนุมูลอิสระ (Free Radical) 12

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) 15

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16

บทที่ 3 18

วิธีการดำเนินงาน 18

ตอนที่ 1 วิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และ เอทานอล มีการใช้กรดซิตริกร่วมด้วยในการปรับค่า pH แล้วตามด้วยการสกัดต่อโดยใช้เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน และค่า pH ส่งผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบ และความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน 18

ตอนที่ 2 การตรวจหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic).. 19

ตอนที่ 3 การตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และเทคนิค HPLC..... 21

ตอนที่ 4 ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนสกัดหยาบเปรียบเทียบกับความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผ่านการทดสอบ DPPH assay..... 22

บทที่ 4 23

ผลดำเนินการวิจัย..... 23

ตอนที่ 1 ผลการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และเอทานอล มีการใช้กรดซิตริกร่วมด้วยในการปรับค่า pH แล้วตามด้วยการสกัดต่อโดยใช้เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน..... 23

ตอนที่ 2 ผลการตรวจหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อม 25

ตอนที่ 3 ผลการตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)..... 26

ตอนที่ 4 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค HPLC 29

ตอนที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) 31

บทที่ 5 35

สรุป และอภิปรายผล 35
สรุปผล 35
อภิปรายผล 36
รายการอ้างอิง 38
ประวัติผู้เขียน 45

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation และแบ่งย่อยโดย ลักษณะของการเป็น radical ของโมเลกุล.....13

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน.....23

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (ไม่ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน.....24

ตารางที่ 4 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟและคลื่นอัลตราโซนิก (ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน.....24

ตารางที่ 5 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟและคลื่นอัลตราโซนิก (ไม่ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน.....25

ตารางที่ 6 ผลการตรวจหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ และ ไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก.....26

ตารางที่ 7 ตารางวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค TLC.....27

ตารางที่ 8 ความบริสุทธิ์ของสารของสารไมทราไจนีนในสารสกัดหยาบ.....29

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชกระท่อม.....32

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 (a) แสดงลักษณะของใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงในประเทศไทยและ (b) โครงสร้างของสารไมทราไจนีน และสารสำคัญกลุ่มอัลคาลอยด์อื่นๆ ที่พบในใบกระท่อม.....5

ภาพที่ 2 ลักษณะใบกระท่อมที่พบทางภาคใต้ของไทย.....8

ภาพที่ 3 โครงสร้างสารไมทราไจนีน.....9

ภาพที่ 4 โครงสร้างสารกลุ่มอัลคาลอยด์อื่นๆ ที่พบในใบกระท่อม.....10

ภาพที่ 5 Molecular orbital ของ oxygen ในสเตทต่างๆ ปรับปรุงโดย (ดร.อธิป สกุลเผือก. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ.คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์).....14

ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของ ROS ไปเป็นโมเลกุลน้ำและการเกิด RS ต่างๆ ปรับปรุงโดย (ดร.อธิป สกุลเผือก.อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ.คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์).....14

ภาพที่ 7 แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารสำคัญในใบกระท่อมก้านแดงในรูปสารสกัดหยาบ.....18

ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบโดยวิธีไมโครเวฟ ปรับค่า pH และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน H_2O : EtOH เป็น (25 : 75).....30

ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบโดยวิธีไมโครเวฟ ไม่ปรับค่า pH และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน H_2O : EtOH เป็น (25 : 75).....30

ภาพที่ 10 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบโดยวิธีไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก ปรับค่า pH และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน H_2O : EtOH เป็น (0 : 100).....31

ภาพที่ 11 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบโดยวิธีไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก ไม่ปรับค่า pH และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน H_2O : EtOH เป็น (100 : 0).....31

ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสาร M-ADCM-4 ในอัตราส่วน H_2O:EtOH (25 : 75).....33

ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสาร M-UDCM-4 ในอัตราส่วน H_2O:EtOH (25 : 75).....33

ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสาร MU-ADCM-5 ในอัตราส่วน H_2O:EtOH (0 : 100).....34

ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสาร MU-UDCM-1 ในอัตราส่วน H_2O : EtOH (100 : 0).....34

บทที่ 1

บทนำ

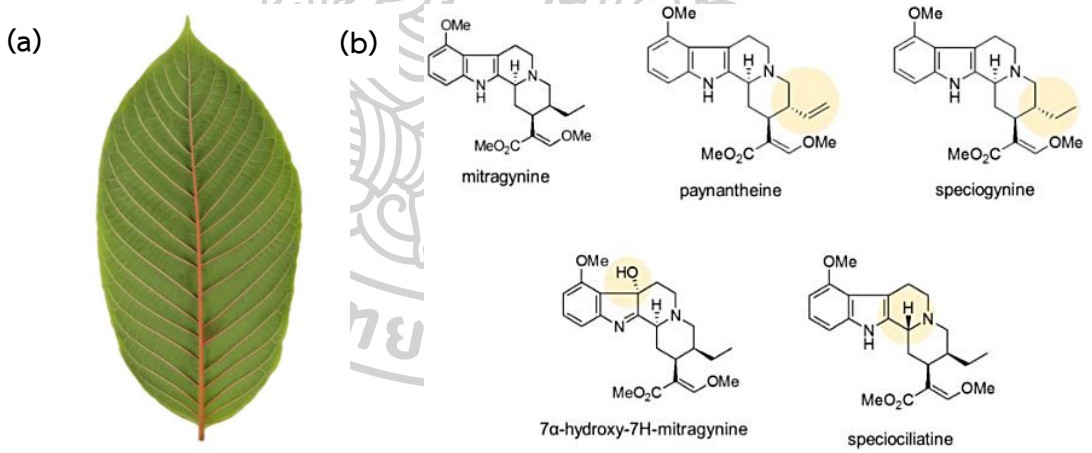
ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae เป็นพืชพื้นเมืองของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย[1] พบหนาแน่นในป่าธรรมชาติทางภาคใต้ของประเทศไทย และภาคกลางบางจังหวัด เช่น ปทุมธานี และนนทบุรี ซึ่งมีการใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านและชาวนาชาวสวนมานานหลายศตวรรษ ใบกระท่อม (**ภาพที่ 1a**) ถูกใช้เพื่อบรรเทาอาการปวด อ่อนเพลีย ลดการอักเสบ และรักษาการเสพโอปิออยด์ในท้องถิ่น[2] งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในใบกระท่อม คือไมทราไจนีน (Mitragynine) ผลทางเภสัชวิทยาของใบกระท่อมที่ได้รับการศึกษาเช่น ยาแก้ปวดยาลดไข้ ยากดประสาท ยากระตุ้นประสาท[3] ต้านการอักเสบ[4] ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*[5] และต้านอนุมูลอิสระ[6]

รายงานจากฐานข้อมูล NAPRALERT (Natural Product Alert Database) ของมหาวิทยาลัยอิลลินอยด์แห่งชิคาโก ได้รวบรวมและรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีที่พบในพืชกระท่อม ให้ข้อมูลว่าพืชกระท่อมสร้างและสะสมสารเคมีหลายกลุ่มโดยเฉพาะสารกลุ่มอินโดอัลคาลอยด์[7](Indole alkaloids) เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดมีสารไมทราไจนีนเป็นสารสำคัญหลัก และยังพบสาร ฟลาโวนอยด์[8] ไตรเทอร์ปีนอยด์[9] สารประกอบฟีนอลิก[10] จากส่วนใบ เปลือก ลำต้น เปลือกราก ผล และการหมักด้วยแบคทีเรีย[11] ปริมาณสารไมทราไจนีนที่พบอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพของดิน ฤดูกาล และความชื้น เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมของไทยกับมาเลเซีย ใบกระท่อมของไทยมีปริมาณสารไมทราไจนีนสูงกกว่าประมาณ 5 เท่า[12] ใบของกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.) ที่โตเต็มที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารกลุ่มอัลคาลอยด์ โดยเฉพาะ mitragynine เป็นสารหลักที่พบจากใบคิดเป็นร้อยละ 66.2% ของสารทั้งหมด และที่พบรองลงมาเป็นนุพันธ์ของไมทราไจนีน คือ paynantheine speciogynine 7α-hydroxy-7H-mitragynine และ speciociliatine[7, 13-21] เป็นต้น (**ภาพที่ 1b**)

อนุมูลอิสระ (Free Radicals) เป็นโมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียร และทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วกับสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน ไขมัน และ DNA มีทั้งรูปของ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) คืออนุมูลอิสระและไม่ใช่อนุมูลอิสระซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่เช่น $RO^{\bullet}$ นำไปสู่การทำลายโครงสร้างของเซลล์ในร่างกาย เมื่อเกิดความเสียหายจากอนุมูลอิสระในระดับสูง อาจทำให้เกิดภาวะความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative Stress) ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ และหลอดเลือด โรคเบาหวาน และโรคทางระบบประสาท เช่น อัลไซเมอร์ และพาร์กินสัน[6]

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เป็นสารที่ช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) ช่วยลดและกำจัดปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้ไปทำลายเนื้อเยื่อหรือสารภายในเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งหลักเช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน ไลโคพีน ซิลีเนียม โพลีฟีนอล กลูตาไทโอน และยังพบในผัก และผลไม้ต่างๆ[22, 23] ซึ่งมีส่วนช่วยป้องกันการเกิดโรค มีการรายงานว่าใบของ *M. speciosa* พบสารประกอบทางชีวภาพในกลุ่มเคมีต่างๆ เช่น อัลคาลอยด์ อินโดล ฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน และไกลโคไซด์[24]



ภาพที่ 1 (a) แสดงลักษณะของใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงในประเทศไทยและ (b) โครงสร้างของสารไมทราไจนีน และสารสำคัญกลุ่มอัลคาลอยด์อื่นๆ ที่พบในใบกระท่อม

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาวิธีการสกัดในระบบตัวทำละลายต่างๆ ที่เหมาะสม การปรับค่า pH ของสารสกัดส่งผลต่อปริมาณของสารสำคัญกลุ่มอัลคาลอยด์จากใบกระท่อม และความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนที่ตรวจพบได้รวมถึงการศึกษาสารพฤกษเคมีต่างๆ ของสารสกัด และนำไปทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และ เอทานอล มีการใช้กรดซิตริกร่วมด้วยในการปรับค่า pH แล้วตามด้วยการสกัดต่อโดยใช้เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน และค่าพีเอชส่งผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบ และความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน
2. เพื่อหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic)
3. เพื่อตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และเทคนิค HPLC
4. เพื่อทดสอบการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนสกัดหยาบเปรียบเทียบกับความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผ่านการทดสอบ DPPH

สมมติฐานงานวิจัย

1. การใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และ เอทานอล มีการใช้กรดซิตริกร่วมด้วยในการปรับค่า pH แล้วตามด้วยการสกัดต่อโดยใช้เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน สามารถเพิ่มปริมาณสารสกัดหยาบ และความบริสุทธิ์ของไมทราไจนีนจากใบกระท่อมได้
2. การปรับค่า pH ของสารละลายที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์และปริมาณของไมทราไจนีนในสารสกัด
3. สารสกัดจากใบกระท่อมที่ผ่านกระบวนการสกัดด้วยไมโครเวฟ (Microwave) และคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) มีองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีในกลุ่มที่มีศักยภาพทางชีวภาพ เช่น อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก และแทนนิน เป็นต้น
4. สารสกัดหยาบที่มีความบริสุทธิ์ของไมทราไจนีนสูงแสดงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญโดยสามารถลดอนุมูลอิสระในเซลล์ผ่านการทดสอบ DPPH assay

ขอบเขตของงานวิจัย

1. การสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมก้านแดงจากจังหวัดราชบุรีด้วยไมโครเวฟ (Microwave) และคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และ เอทานอล มีการใช้กรดซิตริกร่วมด้วยในการปรับค่า pH แล้วตามด้วยการสกัดต่อโดยใช้เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน ใช้กรดซิตริก 15 กรัม ต่อตัวทำละลาย (น้ำ : เอทานอล) ในปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร และวิเคราะห์สารสกัดหยาบเบื้องต้นด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) ภายใต้แสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
2. ศึกษาผลของการปรับค่าพีเอชต่อประสิทธิภาพการสกัด
3. ศึกษาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อม
   3.1 ศึกษาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave)
   3.2 ศึกษาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) ร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic)
4. วิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากใบกระท่อมด้วยเทคนิค thin-layer chromatography (TLC) เพื่อหาสารสำคัญไมทราไจนีน เทียบกับสารไมทราไจนีนมาตรฐาน
5. ศึกษาสารออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากส่วนสกัดหยาบที่มีความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนี ปริมาณมาก ด้วยวิธี DPPH assay
6. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนด้วยเทคนิค HPLC และการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น
7. ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์อื่น เช่น ต้านเชื้อรา ต้านมะเร็ง เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสกัด แยกสารสำคัญกลุ่มอัลคาลอยด์จากพืชกระท่อมที่มีฤทธิ์แก้ปวด ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชกระท่อม

พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Korth.) จัดเป็นพืชในวงษ์ Rubiaceae มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้นพบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่นประเทศไทย มาลายู และหมู่เกาะในประเทศปาปัวนิวกินี พืชกระท่อมที่พบในประเทศไทยมีดังนี้ กระท่อมพันธุ์ก้านแดง กระท่อมพันธุ์ก้านเขียว (พันธุ์แตงกวา) และกระท่อมพันธุ์ยักษ์ใหญ่ (บริเวณปลายใบมีรอยหยักคล้ายเขี้ยว) (**ภาพที่ 2**) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์[25] กระท่อมเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ปานกลาง มีแก่นเป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 10 -15 เมตร อยู่ในตระกูล *Mitragyna speciosa* ใบคล้ายใบกระดังงา มีชนิดก้านใบแดงและใบเขียว ดอกกลมโตขนาดเท่าผลพุทรา ใบเป็นใบเดี่ยวสีเขียว เรียงตัวเป็นคู่ตรงข้าม แผ่นใบขนาดกว้างประมาณ 5-10 ซม. ยาวประมาณ 8-14 ซม. ดอกมีสีขาวอมเหลืองออกเป็นช่อตุ้มกลมขนาด 3-5 ซม. แหล่งที่พบ ในบางจังหวัดของภาคกลาง เช่น ปทุมธานี แต่จะพบมากในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้ เช่น สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง สตูล พัทลุง สงขลา ยะลา ปัตตานี นราธิวาส และตอนบนของประเทศมาเลเซีย

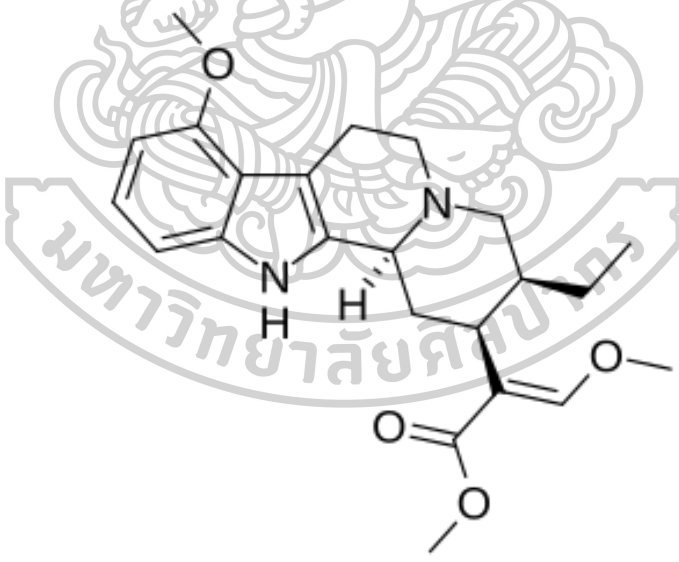
ภาพที่ 2 ลักษณะใบกระท่อมที่พบทางภาคใต้ของไทย

ที่มา บทสรุปของพืชกระท่อม ศูนย์ศึกษาปัญหาการเสพติดหน่วยระบาดวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิยาลัยสงขลานครินท์. เข้าถึงเมื่อ 5 พฤษภาคม 2568. เข้าถึงได้จาก https://cads.in.th/cads/media/upload/1594881548-Kratom%20Final.pdf.

ตำรายาไทยใบกระท่อม ระบุสรรพคุณใช้ระงับอาการปวดท้อง โรคกระเพาะอาหาร เบาหวาน ความดันโรหิตสูง ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านและตำหรับยาแผนโบราณ ดังตัวอย่าง คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ เล่ม 3 ขุนโสภิตบรรณลักษณ์ (อำพัน กิตติขจร) (สมาคม เภสัชกรรมไทยโบราณแห่งประเทศไทย) เช่น ยาประสะกระท่อม ยาทำให้อดฝิ่น ยาหนุมานจองถนนปิดมหาสมุทร ยาแก้บิดลงเป็นเลือด ยาแก้บิดหัวลูก ยาประสะกาฬแดง ยาเหลืองกระท่อมเป็นต้น

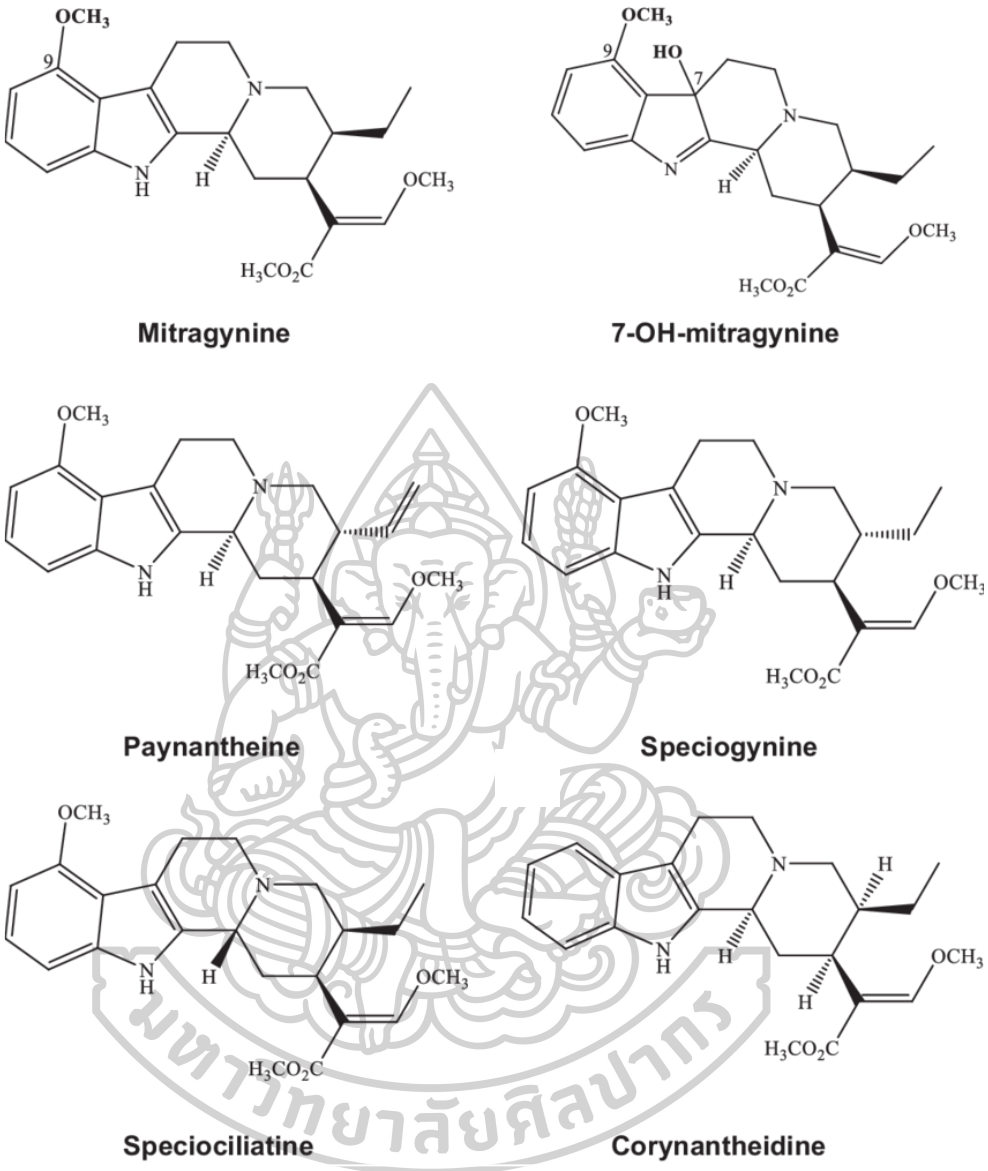
สารไมทราไจนีน (Mitragynine**)**

สารไมทราไจนีน (Mitragynine) เป็นอินโดลอัลคาลอยด์ (indole alkaloid) ที่พบมากที่สุดในใบของพืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae โดยมีรายงานว่าปริมาณของไมทราไจนีนในใบกระท่อมสามารถมีได้ตั้งแต่ 4–66 มก./กรัม ของน้ำหนักแห้ง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุของใบ ฤดูกาล และแหล่งปลูก[26] ไมทราไจนีนมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{30}N_2O_4$ (**ภาพที่ 3**) และน้ำหนักโมเลกุล 398.50 g/mol จัดเป็นสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloid มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงอินโดล (indole ring) และหมู่เมทอกซีหลายตำแหน่ง ซึ่งเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย[27]



ภาพที่ 3 โครงสร้างสารไมทราไจนีน

ในใบกระท่อมยังพบสาร alkaloid ตัวอื่นๆ ได้อีก เช่น speciogynine, speciociliatine, paynantheine และ 7-hydroxy-mitragynine เป็นต้น ตัวอย่างโครงสร้าง alkaloid ที่พบในพืชกระท่อม[28] (**ภาพที่ 4**)



ภาพที่ 4 โครงสร้างสารกลุ่มอัลคาลอยด์อื่นๆ ที่พบในใบกระท่อม

การจัดประเภทของสารอัลคาลอยด์สามารถดำเนินการได้หลายแนวทาง เช่น การจำแนกตามกลุ่มพืชที่เป็นแหล่งกำเนิดของอัลคาลอยด์ การพิจารณาจากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา การจัดกลุ่มตามสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการชีวสังเคราะห์ รวมถึงการวิเคราะห์ตามโครงสร้างทางเคมี แนวทางที่ใช้อ้างอิงกันอย่างแพร่หลาย คือ การจำแนกตามชนิดของสารตั้งต้นในกระบวนการชีวสังเคราะห์ โดยสามารถจำแนกอัลคาลอยด์ออกเป็น 3 กลุ่มหลัก[29-31]

1. อัลคาลอยด์แท้จริง (true alkaloids) สูตรโครงสร้าง มีอะตอมไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อะตอม ที่มาจากกรดอะมิโน และ อะตอมไนโตรเจนเป็นส่วนของวงเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic ring) กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยด์ กลุ่มนี้ เช่น แอล-ออร์นิธีน (*L*-ornithine) แอล-ไลซีน (*L*-lysine) แอล-ฟีนิลอะลานีน (*L*-phenylalanine)/แอล-ไทโรซีน (*L*-tyrosine) แอล-ทริปโตเฟน (*L*-tryptophan) และ แอล-ฮีสทิดีน (*L*-histidine) ตัวอย่างสารอัลคาลอยด์ที่แท้จริง เช่น โคเคน (cocaine) นิโคติน (nicotine) พิเพอริดีน (piperidine) พิเพอรีน (piperine) มอร์ฟีน (morphine) และอะโทรปีน (atropine) เป็นต้น

2. โพรโทอัลคาลอยด์ (protoalkaloids) เช่น เมสคาลีน (mescaline) ฮอร์ดินีน (hordenine) และโยฮิมบีน (yohimbine) เป็นกลุ่มของสารอัลคาลอยด์ที่อะตอมไนโตรเจนในโครงสร้าง มาจากกรดอะมิโนเช่นเดียวกับอัลคาลอยด์แท้จริง แต่โครงสร้าง มีอะตอมไนโตรเจนอยู่นอกวงเฮเทอโรไซคลิก สารตั้งต้น ในชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ แอล-ไทโรซีน และแอล-ทริปโตเฟน

3. ซูโดอัลคาลอยด์ หรืออัลคาลอยด์เทียม (pseudoalkaloids) เป็นอัลคาลอยด์ที่โครงคาร์บอน (carbon skeleton) ไม่ได้มาจากกรดอะมิโน สูตรโครงสร้างประกอบด้วยอะตอม ไนโตรเจนในวงเฮเทอโรไซคลิก สารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ของ อัลคาลอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ แอซิเตต (acetate) กรดไพรูวิก (pyruvic acid) กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) เจอรานิออล (geraniol) ซาโปนิน (saponins) และอะดีนีน (adenine)/ กวานีน (guanine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) หรือสารที่เกิดจากกระบวนการเปลี่ยนของสารตั้งต้น (postcursor) ของกรดอะมิโน ตัวอย่างสารอัลคาลอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น คาเฟอีน (caffeine) แคปไซซิน (capsaicin) ธีโอโบรมีน (theobromine) และธีโอฟิลลีน (theophylline)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชกระท่อม

ไมทราไจนีนมีฤทธิ์ระงับปวดโดยออกฤทธิ์คล้ายมอร์ฟีน นอกเหนือจากนั้น 7-hydroxymitragynine ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ในใบกระท่อมเช่นกันมีฤทธิ์ระงับปวดดีกว่า มอร์ฟีน[32] แต่ทั้งไมทราไจนีน (mitragynine) และ 7-ไฮดรอกซีไมทราไจนีน (7-hydroxymitragynine) มีข้อดีกว่ามอร์ฟีนคือการเกิดการเสพติดยา ภาวะทนต่อยา และกลุ่มอาการถอนยาจะน้อยกว่ามอร์ฟีน[33] รวมทั้งการทำให้เกิดอาการท้องผูกก็น้อยกว่าผลที่เกิดจากมอร์ฟีน (ผลข้างเคียงน้อยกว่ามอร์ฟีน)

รายงานวิจัย Kruegel et al. (2016)[34] ได้รายงานการศึกษาสาร mitragynine โดยการทำ molecular docking ต่อการจับกับตัวรับออปิออยด์ที่ได้แยกได้จากมนุษย์ผลการทดลองให้ผลสรุปว่า mitragynine และ 7-hydroxymitragynine เป็น partial μ opioid agonist และเป็น competitive antagonist ต่อ δ และ κ opioid receptor ดังนั้นสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท mitragynine และ 7- hydroxymitragynine มีคุณสมบัติแก้ปวด ผ่านการจับกับ μ opioid receptor

อนุมูลอิสระ (Free Radical**)**

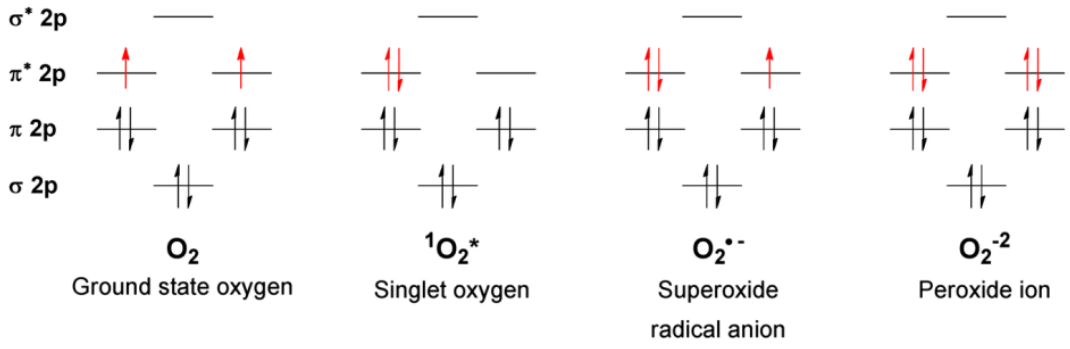
อนุมูลอิสระ หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ยังไม่จับคู่กันอย่างน้อยหนึ่งตัว ซึ่งมักเกิดขึ้นเมื่อพันธะเคมีระหว่างอะตอมสลายตัว ส่งผลให้เกิดอนุภาคที่มีความไม่เสถียรและมีแนวโน้มที่จะเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารรอบข้างได้อย่างรวดเร็ว โดยมักจะดึงหรือให้อิเล็กตรอนเพื่อทำให้ตนเองเข้าสู่สภาวะเสถียร ซึ่งการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเช่นนี้จะทำให้โมเลกุลที่อยู่ใกล้เคียงกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ และนำไปสู่กระบวนการแพร่กระจายของปฏิกิริยาในลักษณะลูกโซ่ (chain reaction)[35] อย่างไรก็ตาม การมองว่าอนุมูลอิสระทั้งหมดมีผลเสียต่อร่างกายอาจเป็นการเหมารวมที่ไม่ถูกต้องนัก เนื่องจากร่างกายมนุษย์มีระบบที่สามารถควบคุมสมดุลของอนุมูลอิสระ และอนุมูลอิสระบางชนิดก็มีบทบาททางสรีรวิทยา เช่น การส่งสัญญาณภายในเซลล์[36] สิ่งที่ควรนำมาพิจารณาเพื่อประเมินผลกระทบต่อสุขภาพคือ ความสามารถในการออกซิไดซ์ (oxidizing capacity) ของสารเหล่านั้นต่อสารชีวโมเลกุล เช่น ไขมัน โปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก หากมีความสามารถในการออกซิไดซ์สูง สารเหล่านี้จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า สารก่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Reactive Species: RS)[37] สารในกลุ่ม RS นี้ไม่ได้จำกัดเฉพาะอนุมูลอิสระเท่านั้น แต่ยังรวมถึงสารในรูปแบบ non-radical ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระผ่านปฏิกิริยาทางเคมีได้ กลุ่มของ RS (**ตารางที่ 1**)[38] การสะสมของ RS ในระดับสูงเกินสมดุลอาจนำไปสู่ภาวะที่เรียกว่า ความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative Stress) ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ เบาหวาน มะเร็ง และโรคทางระบบประสาท[39]

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของ RS โดยแบ่งประเภทตามโมเลกุลที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation และแบ่งย่อยโดย ลักษณะของการเป็น radical ของโมเลกุล

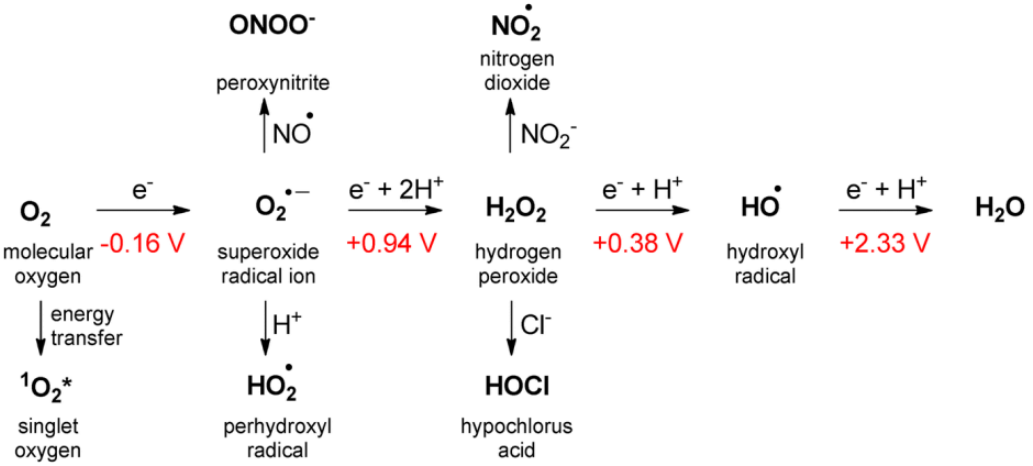
Reactive oxygen species			
Free radicals	**Formula**	**Non-radicals**	**Formula**
Oxygen radical	$O_2^{\bullet}$	Singlet oxygen	$^1O_2^*$
Superoxide radical	$O_2^{\bullet -}$	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Hydroxyl radical	$OH^{\bullet}$	Ozone	O_3
Hydroperoxyl radical	$OH_2^{\bullet}$	Organic peroxide	ROOH
Peroxyl radical	$RO_2^{\bullet}$		
Alkoxyl radical	$RO^{\bullet}$		
Carbonate radical	$CO_3^{\bullet -}$		
Reactive chlorine species			
Chlorine radical	$Cl^{\bullet}$	Hypochloric acid	HOCl
		Nitryl chloride	NO_2Cl
		Chlorine gas	Cl_2
Reactive nitrogen species			
Nitric oxide radical	$NO^{\bullet}$	Nitric oxide	HNO_2
Nitrogen dioxide radical	$NO_2^{\bullet}$	Peroxynitrite	$ONOO^-$
		Peroxynitrous acid	ONOOH
		Nitryl chloride	NOOCl

ออกซิเจนในสถานะพื้น (ground state oxygen) มีอิเล็กตรอนทั้งหมด 8 ตัว โดยจัดเรียงอยู่ใน 5 ออร์บิทัล ได้แก่ $1s^2$, $2s^2$, $2p^4$ ซึ่งในส่วนของออร์บิทัล 2p จะมีอิเล็กตรอน 4 ตัวกระจายอยู่ใน 3 ออร์บิทัลย่อย ได้แก่ $2p_x$, $2p_y$ และ $2p_z$ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในออร์บิทัล $2p_x$ และ $2p_y$ จะมีอิเล็กตรอนที่ยังไม่จับคู่ (unpaired electrons) อย่างละ 1 ตัว ทำให้โมเลกุลของออกซิเจนมีคุณสมบัติเป็น paramagnetic และไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในร่างกายได้ง่าย[40] (**ภาพที่ 5**) เมื่อโมเลกุลของออกซิเจนได้รับอิเล็กตรอนเพิ่มจากโมเลกุลภายนอก เช่น โลหะหนัก (เช่น Fe^{2+} หรือ Cu^+) หรือ อนุมูลอิสระของไขมัน (lipid radicals) จะเกิดการเปลี่ยนรูปเป็น superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความสามารถสูงกว่าออกซิเจนในรูปปกติ โดยสามารถแปรสภาพ

ต่อไปได้เป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) และสุดท้ายเป็น hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) ซึ่งจัดว่าเป็นอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์สูงที่สุด[41] นอกจากนี้ หากโมเลกุลของออกซิเจนได้รับพลังงานจากแสงอัลตราไวโอเลต (UV light) หรือปฏิกิริยาโฟโตเคมีอื่น ๆ จะสามารถเปลี่ยนเป็น singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งอยู่ในสถานะเร้า (excited state) และมีสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีพลังงานสูงยิ่งกว่า superoxide radical และ hydroxyl radical[42] แม้ว่าสาร ROS เหล่านี้จะมีศักยภาพในการทำลายโปรตีน ไขมัน และดีเอ็นเอในเซลล์ได้ แต่ในระบบชีววิทยามีการควบคุมอย่างมีประสิทธิภาพ โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาลูกโซ่ของ ROS ส่วนใหญ่มักเปลี่ยนกลับเป็น น้ำ (H_2O) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่ก่อพิษต่อเซลล์ (**ภาพที่ 6**) ถือเป็นกลไกการป้องกันตนเองตามธรรมชาติของเซลล์เพื่อจำกัดความเสียหายจากอนุมูลอิสระ[43]



ภาพที่ 5 แสดง molecular orbital ของ oxygen ในสเตทต่างๆ[38] ปรับปรุงโดย (ดร.อธิป สกุลเผือก. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ.คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของ ROS ไปเป็นโมเลกุลน้ำและการเกิด RS ต่างๆ[44] ปรับปรุงโดย (ดร. อธิป สกุลเผือก.อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ.คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (free radicals) หรือสารก่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน (reactive species: RS) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการเผาผลาญพลังงานและการทำงานของร่างกายในชีวิตประจำวัน เช่น การหายใจระดับเซลล์ การอักเสบ หรือแม้แต่การออกกำลังกายที่หักโหม[36] ร่างกายมนุษย์มีระบบป้องกันตามธรรมชาติโดยการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระภายใน (endogenous antioxidants) เช่น Coenzyme Q10, alpha-lipoic acid, glutathione, รวมถึงเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระสำคัญ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase และ glutathione peroxidase ซึ่งทำหน้าที่จับและทำลาย ROS ก่อนที่จะก่อความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามภาวะต่าง ๆ เช่น ความเครียดเรื้อรัง การพักผ่อนไม่เพียงพอ การได้รับยาบางชนิด หรือโรคเรื้อรัง สามารถเพิ่มการผลิตอนุมูลอิสระจนเกินขีดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย นำไปสู่ภาวะที่เรียกว่า Oxidative Stress ซึ่งเป็นปัจจัยกระตุ้นการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ มะเร็ง เบาหวาน พาร์กินสัน และโรคอักเสบเรื้อรัง[41] คุณสมบัติสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ ช่วยป้องกันการเกิด ROS ตั้งแต่ต้นทาง เช่น ป้องกันการเกิด superoxide จากไมโตคอนเดรีย จับและยับยั้ง ROS ที่เกิดขึ้นก่อนจะทำอันตรายต่อเซลล์ ไม่เปลี่ยน ROS ที่มีฤทธิ์อ่อนให้กลายเป็น ROS ที่มีฤทธิ์รุนแรงขึ้น เช่น ไม่ทำให้ $O_2^{\bullet -}$ กลายเป็น $^{\bullet}OH$ ส่งเสริมการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระอื่นภายในร่างกาย และกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และมีส่วนช่วยซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์[39] สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหารธรรมชาติ เช่นVitamin C, Vitamin E, Flavonoids, Carotenoids, Phenolic compounds สารเหล่านี้มักมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยพันธะคู่ (conjugated double bonds) ซึ่งช่วยให้สามารถรับหรือบริจาคอิเล็กตรอนได้อย่างเสถียร และสามารถกระจายประจุ (delocalization) ได้ดี ส่งผลให้ free radical ที่เกิดขึ้นมีความเสถียรมากขึ้น จึงช่วยลดการทำลายเนื้อเยื่อของอนุมูลอิสระ[45]

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยของ Michele et al. (2022)[46] ได้ศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิมและเทคนิคสมัยใหม่ โดยใช้ใบกระท่อมแห้งจากประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย มาทำการสกัดด้วย 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE), การสกัดด้วยไมโครเวฟ (Microwave-Assisted Extraction, MAE) และ การสกัดด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤติ (Supercritical CO_2 Extraction, SFE-CO_2) ร่วมกับตัวทำละลายหลายชนิด เช่น เมทานอล เอทานอล น้ำ และสารผสมแบบไบนารี (binary mixtures) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เทคนิคการสกัดส่งผลต่อทั้งปริมาณของสารสกัดดิบ และองค์ประกอบของอัลคาลอยด์ในใบกระท่อมอย่างชัดเจน โดยเทคนิค MAE ที่ใช้ตัวทำละลายเมทานอล/น้ำ อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 110°C ให้ปริมาณสารอัลคาลอยด์รวมสูงที่สุด ขณะที่ UAE ด้วยเมทานอลให้ปริมาณไมทราไจนีนบริสุทธิ์สูงที่สุด

งานวิจัยของ Isnaeni et al. (2022)[47] การศึกษาเบื้องต้นนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดไมทราไจนีนจากกระท่อม รวมถึงการตรวจสอบผลกระทบของเวลาในการสกัดและการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound) ทำให้เกิดการสั่นสะเทือนหรือการสลายตัวของวัสดุในของเหลว กระบวนการนี้มักใช้ในการเร่งการสกัด การผสม หรือการทำให้ของแข็งแตกตัว มีต่อผลผลิตและคุณภาพของสารสกัด (ปริมาณไมทราไจนีน) การสกัดดำเนินการตามลำดับที่อุณหภูมิห้องและการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound) ก่อนการสกัด ตามด้วยกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ การสกัดโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound) เพิ่มผลผลิตของไมทราไจนีนเป็น 16.88% เมื่อเทียบกับการสกัดโดยไม่มีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasound) สารสกัดที่ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์และการชะด้วยสารด้วยตัวทำละลายผสมของ *n*-hexane : ethyl acetate : 25% ammonia ในอัตราส่วน 30:15:1 โดยปริมาตร ทำให้ความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนสูงสุดถึง 86.46%

งานวิจัยของ Christine et al. (2015)[48] ได้ศึกษาวิธีการตรวจสอบปริมาณสารไมทราไจนีน (Mitragynine) ในผลิตภัณฑ์กระท่อมในรูปแบบชนิดผง ชนิดน้ำสกัด และกากใบกระท่อม ซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS, LC-MS/MS และ UPLC/PDA โดยใช้สารมาตรฐานไมทราไจนีนในการเปรียบเทียบ การหาปริมาณของสารไมทราไจนีนในผลิตภัณฑ์ที่ซื้อผ่านอินเตอร์เน็ต ผลการวิเคราะห์พบว่า เทคนิค UPLC/PDA มีปริมาณไมทราไจนีนเฉลี่ย 1.041% และเทคนิค LC-MS/MS มีปริมาณไมทราไจนีนเฉลี่ย 1.140%

งานวิจัยของ Niyomdecha et al. (2024)[5] ได้ทำการสกัดใบกระท่อมสายพันธุ์แดง (Red vein) ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol และกรดอะซิติก 50% และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยใช้วิธี disk diffusion และการหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) ผลการศึกษาพบว่า สารที่สกัดด้วยกรดอะซิติก 50% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6 mg/mL และ 9 mg/mL ตามลำดับ สารไมทราไจนีนบริสุทธิ์สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้เช่นกันที่ความเข้มข้น 6 mg/mL และยังอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลการตรวจสอบรองรับ

งานวิจัยของ Zakaria et al. (2020)[49] พัฒนาเทคนิคการสกัดสารจากใบกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasound-Assisted Extraction: UAE) โดยใช้หลักการออกแบบการทดลอง CCRD ภายใต้แนวคิด Response Surface Methodology (RSM) เพื่อหาสภาวะที่ให้ผลผลิตและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) สูงสุด ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิ (25–50 °C), เวลาอัลตราโซนิก (15–50 นาที) และอัตราส่วนตัวทำละลายต่อของแข็ง (10–30 mL/g) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ อุณหภูมิ 25 °C เวลา 15 นาที และอัตราส่วน 10 mL/g ให้ผลผลิต 22.69% และ TPC 143.51 mg GAE/g แบบจำลองเชิงพหุนามที่พัฒนามีความแม่นยำสูง ($R^2 > 0.95$, $p < 0.0001$, RSE < 5%) การวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS พบสารสำคัญหลายชนิด เช่น catechin, rutin, kaempferol, gallic acid, และ caffeic acid ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ งานวิจัยชี้ให้เห็นว่า ใบกระท่อมมีสารพฤกษเคมีที่หลากหลายและอาจส่งเสริมฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาร่วมกับอัลคาลอยด์หลักอย่างไมทราไจนีน (mitragynine) ได้

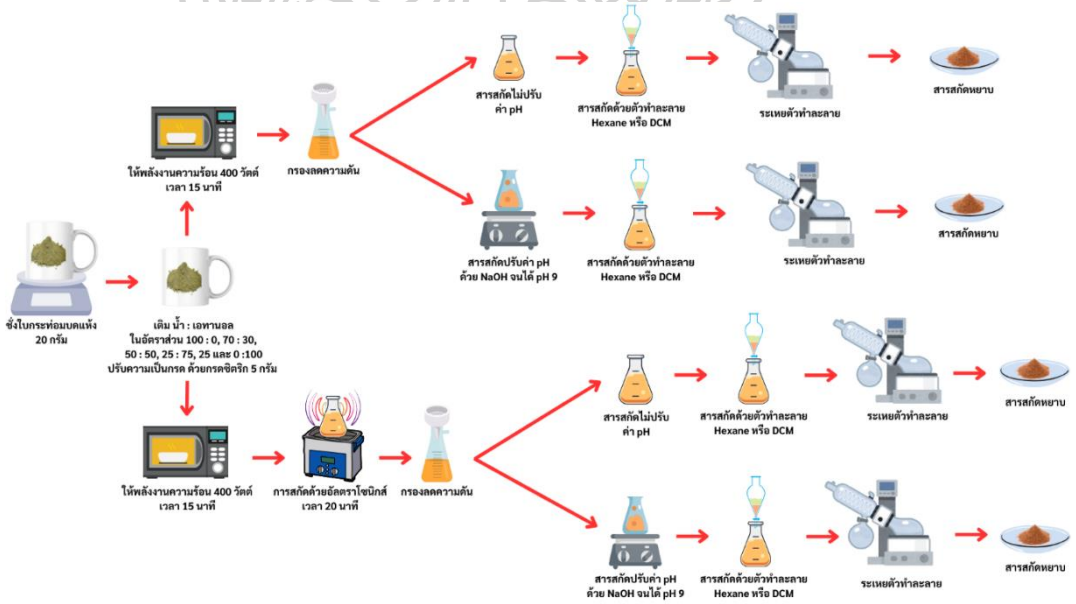
บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

ตอนที่ 1 วิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และ เอทานอล มีการใช้กรดซิตริกร่วมด้วยในการปรับค่า pH แล้วตามด้วยการสกัดต่อโดยใช้เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน และค่า pH ส่งผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบ และความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน

1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ศึกษาวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมก้านแดงตากแห้งบดละเอียดจากจังหวัดราชบุรี ประเทศไทยเดือนมิถุนายน 2567 สกัดโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) การสกัดเลือกใช้กรดซิตริกในสารละลายน้ำต่อเอทานอลในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ขั้นตอนการสกัดสารสำคัญจากใบกระท่อมแบ่งออกเป็น 2 เทคนิคและตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดแสดงดังแผนผัง (**ภาพที่** 7)



ภาพที่ 7 แผนผังแสดงวิธีการสกัดสารสำคัญในใบกระท่อมก้านแดงในรูปสารสกัดหยาบ

1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากใบพืชกระท่อม

เตรียมสารสกัดหยาบ วิธีที่ 1 ชั่งใบกระท่อมก้านแดงตากแห้งบดละเอียด 20 กรัม เติมตัวทำละลายผสมเอททานอลที่มีกรดซิตริก 15 กรัม ในสารละลาย น้ำ : เอทานอล ปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร ค่า pH จากการเติมกรดซิตริกของสารในระหว่างการสกัดจะมีค่า pH อยู่ราว 2.0–3.5 โดยขึ้นกับบัฟเฟอร์ธรรมชาติในพืช (สัดส่วนการใช้กรดซิตริกต่อปริมาตรของสารละลายคือ กรดซิตริก 5 กรัมต่อปริมาตรรวมของสารละลาย 100 มิลลิลิตร) นำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟกำลังไฟ 400 วัตต์เป็น เวลา 15 นาที จากนั้นนำมากรองและระเหยตัวทำละลายออกแล้วแบ่งสารสกัดเป็น 2 ส่วน เท่าๆ กัน ส่วนที่ 1 ไม่ปรับค่า pH ส่วนที่ 2 ปรับค่า pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีค่า pH ประมาณ 9 เพื่อให้สารสำคัญอยู่ในรูปอัลคาลอยด์อิสระ นำสารสกัดส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 ไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน และระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกจนแห้งจะได้สารสกัดหยาบ และทำนองเดียวกันสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน วิธีที่ 2 เตรียมเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 แต่เมื่อให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟกำลังไฟ 400 วัตต์ เวลา 15 นาที แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิกความถี่ 40 KHz เวลา 20 นาที และคำนวณหา %Yield ของสารสกัดใบกระท่อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ตอนที่ 2 การตรวจหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic)

1.1 การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของพืชกระท่อม

1.1.1 การตรวจสอบสารอัลคาลอยด์ (Alkaloids)[50]

เตรียมสารตรวจสอบ โดยชั่งผลึกไอโอดีน 1.27 กรัม และ โพแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์ส่วนสกัดจากใบกระท่อม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติมสารละลายลงในสารตัวอย่างจำนวน 5 หยด หากเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงแสดงว่ามีสารอัลคาลอยด์

1.1.2 การตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)[50]

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์ส่วนสกัดจากใบกระท่อม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติม 2%NaOH ลงในสารสกัดแล้วเขย่าถ้าสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเมื่อเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) สีเหลืองจะจางลง แสดงว่ามีสารฟลาโวนอยด์

1.1.3 การตรวจสอบสารแทนนิน (Tannins)[50]

ชั่งเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์ส่วนสกัดจากใบกระท่อม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติม 5% $FeCl_3$ ลงในสารสกัดแล้วเขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีเขียว แสดงว่ามีแทนนิน

1.1.4 การตรวจสอบสารฟีนอลิก (Phenolics)[50]

ชั่งเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิเปตต์ส่วนสกัดจากใบกระท่อม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติม 1%$FeCl_3$ ลงในสารสกัดแล้วเขย่าถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มหรือเขียวแสดงถึงการมีอยู่ของสารแสดงว่ามีฟีนอลิก

1.1.5 การตรวจสอบสารซาโปนิน (Saponins)[50]

ปิเปตต์ส่วนสกัดจากใบกระท่อม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในสารสกัดแล้วเขย่าแรงๆ หากเกิดฟอง และฟองที่เกิดขึ้นคงอยู่เป็นเวลานานกว่า 10 นาที แสดงว่ามีซาโปนิน

1.1.6 การตรวจสอบสารสเตียรอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ (Steroids / Triterpenoids)[51]

ปิเปตต์ส่วนสกัดจากใบกระท่อม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมอะซิติกแอนไฮไดรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ หยด กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ลงในสารละลายสังเกตการเปลี่ยนสี หากเกิดสีเขียวแสดงถึงการมีอยู่ของสเตียรอยด์ และหากเกิดสีม่วงหรือสีน้ำเงินแสดงถึงการมีอยู่ของไตรเทอร์พีนอยด์

1.1.7 การตรวจสอบสารสเตียรอยด์ไกลโคไซด์ (Steroid Glycosides)[52]

ปิเปตต์ส่วนสกัดจากใบกระท่อม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมกรดอะซิตริกและเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารสกัดแล้วเขย่า ค่อยๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไปพร้อมเขย่า ถ้าเกิดวงแหวนสีน้ำตาลแดงที่ชั้นล่างของหลอดทดลองบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของสเตียรอยด์ไกลโคไซด์

ตอนที่ 3 การตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และเทคนิค HPLC

1. พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

ตรวจสอบสารไมทราไจนีน โดยนำสารสกัดหยาบไปวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC โดยนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยไดคลอโรมีเทนแล้ว Spot ลงบนแผ่น TLC ในระบบที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 1:1 ethyl acetate : *n*-hexane นำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และคำนวณหาค่า R_f ของสารสารสกัดหยาบเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไมทราไจนี

2. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค HPLC

1 การเตรียมเตรียมสารมาตรฐานไมทราไจนีน Stock เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 1.00, 2.00, 3.00, 400 และ 5.00 ppm ด้วยเมทานอล HPLC-grade ในขวดปรับปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วย Nylon Syringe filter (Pore size = 0.45 µm) ใส่ขวดไวออลเตรียมนำไปวิเคราะห์

2. เตรียมสารสกัดหยาบ โดยชั่งสารสกัดหยาบจำนวน 0.00398 กรัม ใส่หลอดทดลองละลายด้วยเมทานอล HPLC-grade ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง vortex 1 นาที แล้วนำสารสกัดหยาบมากรองด้วย Nylon Syringe filter (Pore size = 25 µm) ใส่ขวดไวออลเตรียมนำไปวิเคราะห์

3. การวิเคราะห์สารมาตรฐานไมทราไจนีน สารสกัดหยาบจากใบกระท่อมรวมถึงความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนที่แยกได้ ด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น Nexear LC-40 Series และมีเฟสเคลื่อนที่เป็น Acetonitrile : Ammonium acetate buffer 50 mM ที่ pH = 50 ที่อัตราส่วน 1:1 v/v ใช้ flow rate ระบบ isocratic ที่ 1.50 mL/min และ คอลัมน์เป็น C-18 (Inertsil;ODS-3.5 µm, 4.6 × 250 mm(µPi)) ใช้อุณหภูมิในคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส Injection Volume 20 µL ที่ **λ** 226 nm ด้วย Detector เป็น Photodiode array detector

ตอนที่ 4 ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนสกัดหยาบเปรียบเทียบกับความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผ่านการทดสอบ DPPH assay

1.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

1.1.1 เตรียมสารละลาย DPPH 0.2 mM ในเอทานอล โดยชั่งสาร DPPH 7.9 มิลลิกรัม (0.0079 กรัม) โดยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เติม Absolute Ethanol 80 มิลลิลิตร คนจนสารลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol นำอลูมิเนียมฟอยด์หุ้มขวดเพื่อป้องกันแสงและเก็บแช่ไว้ที่มืดในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพจากแสง

1.1.2 เตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบกระท่อมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเตรียม Stock ที่ความเข้มข้น 10,240 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเจือจางเป็น 640, 320, 160, 80, 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้ Ethanol: H_2O อัตราส่วน 30:70 เป็นตัวทำละลาย

1.1.3 เติมสารสกัดหยาบจากใบกระท่อมที่เตรียมจาก Stock โดยนำไปเจือจางที่ความเข้มข้น 640, 320, 160, 80, 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในถาดหลุ่ม 96 well plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยทำซ้ำ 2 รอบ

1.1.4 เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมที่มีสารสกัดจากใบกระท่อมที่เจือจางความเข้มข้น 640, 320, 160, 80, 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยทำในที่มืดหรือมีแสงน้อยเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของ DPPH จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (\% Inhibition)} = \left(\frac{\mathbf{A_{control} - A_{sample}}}{\mathbf{A_{control}}}\right) \times \mathbf{100}$$

โดยที่

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลายควบคุม (ไม่มีสารสกัด)

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารสกัดทดสอบ

บทที่ 4

ผลดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 ผลการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และเอทานอล มีการใช้กรดซิตริกร่วมด้วยในการปรับค่า pH แล้วตามด้วยการสกัดต่อโดยใช้เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน

1. การสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) ได้ผลดัง (**ตารางที่ 2 และ 3**) และการสกัดด้วยไมโครเวฟ (Microwave) แล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) ได้ผลดัง (**ตารางที่ 4 และ 5**) ใช้ตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และ เอทานอล สารละลายที่ใช้จะมีปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร โดยใช้กรดซิตริกเป็นตัวช่วยในการสกัด มีการปรับและไม่ปรับค่า pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน

ขวดที่	อัตราส่วนระหว่าง H_2O : EtOH	%Yield เทคนิคไมโครเวฟ ปรับค่า pH	
		เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน
1	100 : 0	0.08	0.27
2	70 : 30	0.12	0.58
3	50 : 50	1.82	0.77
4	25 : 75	1.00	4.16
5	0 : 100	1.65	3.02

จากผลการทดลองพบว่า ร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบของอัตราส่วนน้ำ : เอทานอล เป็น 50 : 50 สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน มีร้อยละของผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 1.82 และสารสกัดหยาบของอัตราส่วน น้ำ:เอทานอล เป็น 25 : 75 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 4.16

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (ไม่ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน

ขวดที่	อัตราส่วนระหว่าง H_2O : EtOH	%Yield เทคนิคไมโครเวฟ ไม่ปรับค่า pH	
		เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน
1	100 : 0	0.43	0.77
2	70 : 30	0.40	1.47
3	50 : 50	0.38	1.09
4	25 : 75	0.84	14.10
5	0 : 100	2.07	68.34

จากผลการทดลองพบว่า ร้อยละของผลผลิต สารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ (ไม่ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบของเอทานอลที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน มีร้อยละของผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 2.07 และ สารสกัดหยาบของเอทานอลที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 68.34

ตารางที่ 4 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟและคลื่นอัลตราโซนิก (ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน

ขวดที่	อัตราส่วนระหว่าง H_2O : EtOH	%Yield เทคนิคไมโครเวฟและคลื่นอัลตราโซนิก ปรับค่า pH	
		เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน
1	100 : 0	0.08	0.35
2	70 : 30	0.30	0.24
3	50 : 50	0.23	0.68
4	25 : 75	0.48	2.03
5	0 : 100	0.35	3.63

จากผลการทดลองพบว่า ร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก (ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบของอัตราส่วน น้ำ : เอทานอล เป็น 25 : 75 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน มีร้อยละของผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 0.48 และ สารสกัดหยาบของเอทานอล ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 3.63

ตารางที่ 5 แสดงร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟและคลื่นอัลตราโซนิก (ไม่ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และ ไดคลอโรมีเทน

ขวดที่	อัตราส่วนระหว่าง H_2O : EtOH	%Yield เทคนิคไมโครเวฟและคลื่นอัลตราโซนิก ไม่ปรับค่า pH	
		เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน
1	100 : 0	0.14	0.53
2	70 : 30	0.06	0.78
3	50 : 50	0.18	2.26
4	25 : 75	0.11	11.77
5	0 : 100	0.49	46.25

จากผลการทดลองพบว่า ร้อยละของผลผลิตสารสกัดกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก (ไม่ปรับค่า pH) ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิดคือ เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบของเอทานอล ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน มีร้อยละของผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 0.49 และ สารสกัดหยาบของเอทานอล ที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 46.25

ตอนที่ 2 ผลการตรวจหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อม

การตรวจหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อม 2 วิธีคือใช้ไมโครเวฟและไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิกทดสอบ โดยใช้รีเอเจนต์ ตรวจหาการมีอยู่ของสารสำคัญในส่วนสกัดใบ กระท่อม เช่น สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloids) โดยวิธี Wagner’s reagent สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) โดยวิธี Alkaline reagent test สารกลุ่มแทนนิน โดยใช้ Ferric Chloride ($FeCl_3$) Solution สารกลุ่มฟีนอลิกส์ (Phenolics) โดยใช้ Ferric Chloride ($FeCl_3$) Solution สารกลุ่มซาโปนิน (Saponins) โดยวิธี Foam test สารกลุ่มเตียรอยด์ (Steroids) โดยวิธี Salkowski Reagent สารกลุ่มสเตียรอยด์ และไตรเทอร์พีนอยด์ (Steroids and Triterpenoid) โดยวิธี Liebermann-Burchard Reagent, สารกลุ่มสเตียรอยด์ไกลโคไซด์ (Steroid Glycosides) โดยวิธี Keller-Kiliani Test แสดงใน (**ตารางที่ 6**) และลักษณะผลการตรวจหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดใบกระท่อม

ตารางที่ 6 ผลการตรวจหาสารพฤกษเคมีในส่วนสกัดจากวิธีการสกัดใบกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ และไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก

สารพฤกษเคมี	ไมโครเวฟ อัตราส่วน น้ำ : เอทานอล					ไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก อัตราส่วน น้ำ : เอทานอล				
	100:0	70:30	50:50	25:75	0:100	100:0	70:30	50:50	25:75	0:100
1. อัลคาลอยด์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3. แทนนิน	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. ฟีนอลิก	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. ซาโปนิน	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
6. สเตียรอยด์และไตรเทอพีนอยด์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. สเตียรอยไกลโคไซด์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) หมายถึง การตรวจพบสารพฤกษเคมี (-) หมายถึง การตรวจไม่พบสารพฤกษเคมี

จากผลการทดลองพบว่า การใช้ไมโครเวฟ และไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัตราโซนิก ในทุกอัตราส่วนพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และฟีนอลิก แต่พบซาโปนินในบางอัตราส่วน และไม่พบสเตียรอยด์และไตรเทอพีนอยด์กับสเตียรอยไกลโคไซด์ ในทุกอัตราส่วน

ตอนที่ 3 ผลการตรวจหาความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

เมื่อนำสารสกัดหยาบไปวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC ในระบบที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร สกัดใบกระท่อมโดยไมโครเวฟ และไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิกด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และเอทานอล ในอัตราส่วน (100:0, 70:30, 50:50, 25:75 และ 0:100) ค่า R_f ของสารไมทราไจนีนมาตรฐานเท่ากับ 0.72 โดยสารแต่ละชนิดมีค่า R_f (**ตารางที่ 7**)

ตารางที่ 7 ตารางวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค TLC

วิธีการสกัด	ปรับค่า pH	ตัวทำละลายอินทรีย์	สารตัวอย่าง	ค่า R_f สารตัวอย่าง	แปรผล
ไมโครเวฟ	ปรับ pH	เฮกเซน	M-AH-1	0.72	ตรง
			M-AH-2	0.69	ใกล้เคียง
			M-AH-3	0.71	ใกล้เคียง
			M-AH-4	0.71	ใกล้เคียง
			M-AH-5	0.71	ใกล้เคียง
ไมโครเวฟ	ไม่ปรับ pH	เฮกเซน	M-UH-1	0.68	ใกล้เคียง
			M-UH-2	0.60	ไม่ตรง
			M-UH-3	0.72	ตรง
			M-UH-4	0.89	ไม่ตรง
			M-UH-5	0.87	ไม่ตรง
ไมโครเวฟ	ปรับ pH	ไดคลอโรมีเทน	M-ADCM-1	0.72	ตรง
			M-ADCM-2	0.72	ตรง
			M-ADCM-3	0.72	ตรง
			M-ADCM-4	0.53	ไม่ตรง
			M-ADCM-5	0.53	ไม่ตรง
ไมโครเวฟ	ไม่ปรับ pH	ไดคลอโรมีเทน	M-UDCM-1	0.72	ตรง
			M-UDCM-2	0.72	ตรง
			M-UDCM-3	0.72	ตรง
			M-UDCM-4	0.72	ตรง
			M-UDCM-5	0.85	ไม่ตรง

วิธีการสกัด	ปรับค่า pH	ตัวทำละลายอินทรีย์	สารตัวอย่าง	ค่า R_f สารตัวอย่าง	แปรผล
ไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก	ปรับ pH	เฮกเซน	MU-AH-1	0.72	ตรง
			MU-AH-2	0.72	ตรง
			MU-AH-3	0.72	ตรง
			MU-AH-4	0.72	ตรง
			MU-AH-5	0.72	ตรง
ไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก	ไม่ปรับ pH	เฮกเซน	MU-UH-1	-	ไม่พบ
			MU-UH-2	0.72	ตรง
			MU-UH-3	0.72	ตรง
			MU-UH-4	-	ไม่พบ
			MU-UH-5	-	ไม่พบ
ไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก	ปรับ pH	ไดคลอโรมีเทน	MU-ADCM-1	0.72	ตรง
			MU-ADCM-2	0.72	ตรง
			MU-ADCM-3	0.72	ตรง
			MU-ADCM-4	0.72	ตรง
			MU-ADCM-5	0.72	ตรง
ไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก	ไม่ปรับ pH	ไดคลอโรมีเทน	MU-UDCM-1	0.72	ตรง
			MU-UDCM-2	0.63	ไม่ตรง
			MU-UDCM-3	0.63	ไม่ตรง
			MU-UDCM-4	-	ไม่พบ
			MU-UDCM-5	-	ไม่พบ

M = ไมโครเวฟ , U = อัลตราโซนิก , A = Adjusted pH (ปรับค่า pH) , U = Unadjusted pH (ไม่ปรับค่า pH) H = เฮกเซน , DCM = ไดคลอโรมีเทน , ตัวเลข 1-5 แทนอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อเอทานอล (1) คือ 100:0 ,(2) คือ 70:30 ,(3) คือ 50:50 ,(4) คือ 25:75 และ (5) คือ 0:100

ตอนที่ 4 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค HPLC

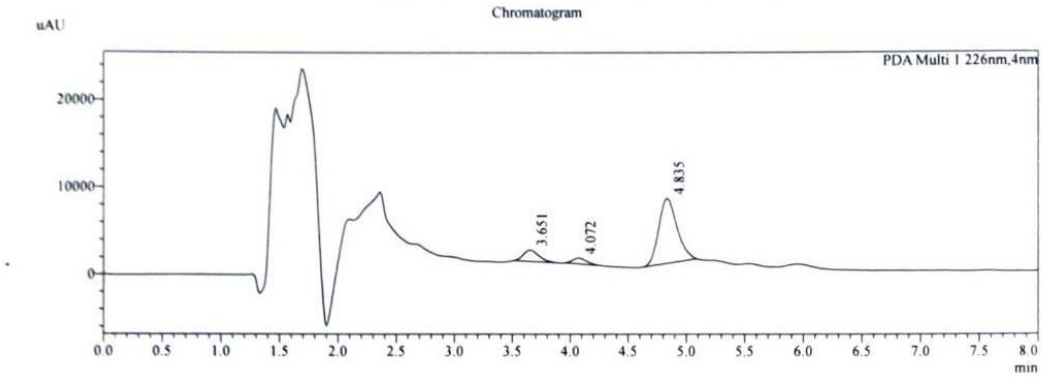
ผู้วิจัยได้เลือกสารสกัดจากใบกระท่อมจำนวน 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากการสกัดด้วยไมโคเวฟ 2 ตัวอย่าง และ ไมโครเวฟแล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก 2 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนเทคนิค HPLC แสดงผลการวิเคราะห์ (**ตารางที่ 8**) และผลโครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง (**ภาพที่ 8-11**)

ตารางที่ 8 ความบริสุทธิ์ของสารของสารไมทราไจนีนในสารสกัดหยาบ

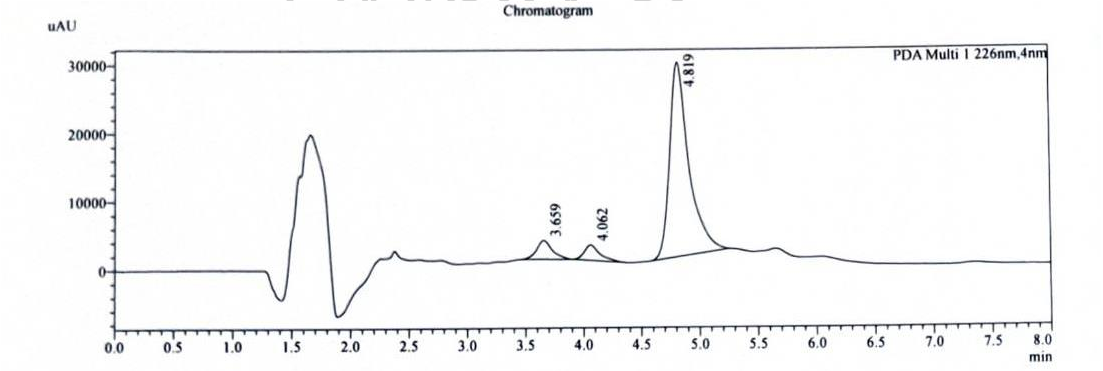
วิธีการสกัด	ปรับค่า pH	ตัวทำละลายอินทรีย์	สารตัวอย่าง	Retention Time	% Purity by HPLC
ไมโครเวฟ	ปรับ pH	ไดคลอโรมีเทน	M-ADCM-4 (H_2O : EtOH 25 : 75)	4.835	82.266
	ไม่ปรับ pH	ไดคลอโรมีเทน	M-UDCM-4 H_2O : EtOH (25 : 75)	4.819	87.447
ไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก	ปรับ pH	ไดคลอโรมีเทน	MU-ADCM-5 H_2O : EtOH (0 : 100)	4.819	87.954
	ไม่ปรับ pH	ไดคลอโรมีเทน	MU-UDCM-1 H_2O : EtOH (100 : 0)	4.828	78.272

จากตารางที่ 8 พบว่า วิธีการสกัดและปัจจัยที่ใช้ในการสกัด เช่น การปรับค่า pH และอัตราส่วนของตัวทำละลาย มีผลโดยตรงต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีน การสกัดด้วยไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิกโดย ปรับค่า pH ใช้ตัวทำละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียว และสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน พบว่าให้ค่าความบริสุทธิ์ของไมทราไจนีนสูงที่สุดที่ 87.954% สารไมทราไจนีนที่ได้มีค่า Retention Time อยู่ที่ 4.819 นาที แสดงให้เห็นถึงความเสถียรและความเหมาะสมของสภาวะการสกัดในวิธีนี้ ในทางกลับกันการใช้เทคนิคไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก ไม่ปรับค่า pH โดยใช้ตัวทำละลายน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวกลับให้ค่าความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนต่ำที่สุดเพียง

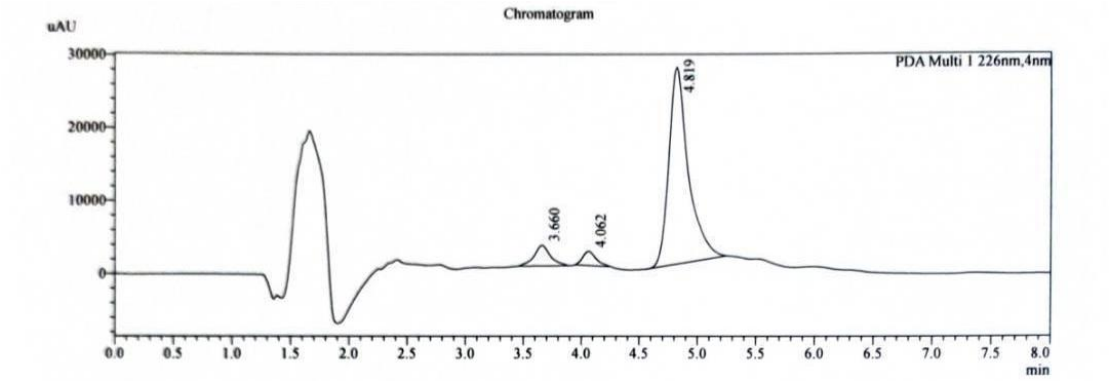
78.272% อาจเนื่องมาจากความแรงของพลังงานที่ใช้ร่วมกัน ทำให้โครงสร้างของสารไมทราไจนีนเสื่อมสลายลงหรืออาจเกิดจากการรบกวนของคลื่นที่มีผลต่อโครงสร้างทางเคมีของสารไมทราไจนีน



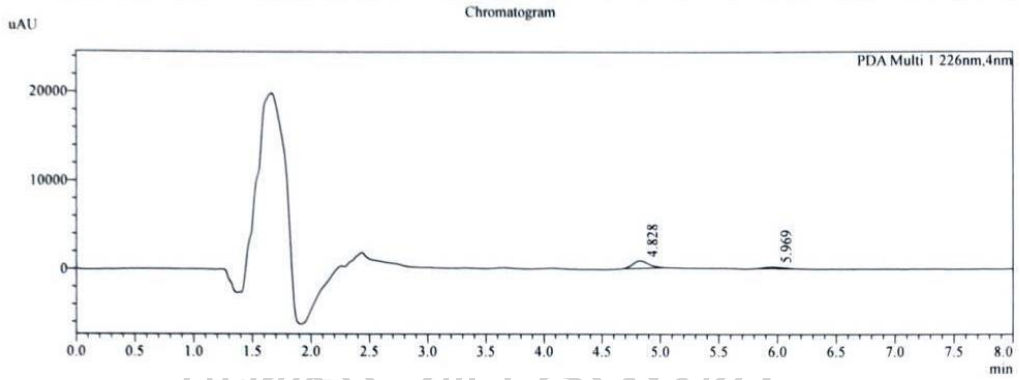
ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบโดยวิธีไมโครเวฟ ปรับค่า pH และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน H_2O : EtOH เป็น (25 : 75)



ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบโดยวิธีไมโครเวฟ ไม่ปรับค่า pH และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน H_2O : EtOH เป็น (25 : 75)



ภาพที่ 10 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบโดยวิธีไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก ปรับค่า pH และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน H_2O : EtOH เป็น (0 : 100)



ภาพที่ 11 โครมาโตแกรมสารสกัดหยาบโดยวิธีไมโครเวฟกับคลื่นอัลตราโซนิก ไม่ปรับค่า pH และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน H_2O : EtOH เป็น (100 : 0)

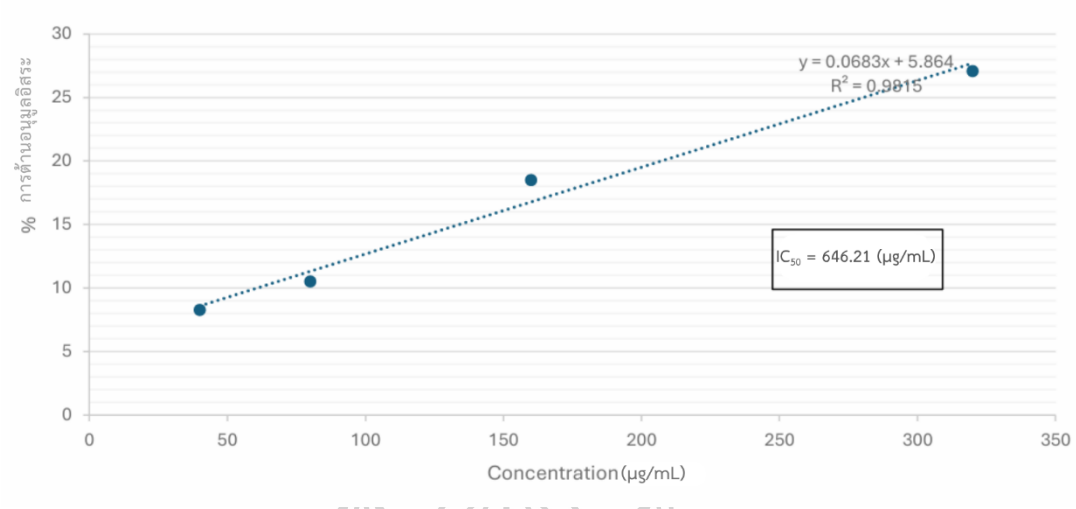
ตอนที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชกระท่อม โดยใช้วิธี DPPH assay แสดงผลการวิเคราะห์ (**ตารางที่ 9**) และผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากพืชกระท่อม (**ภาพที่ 12-15**)

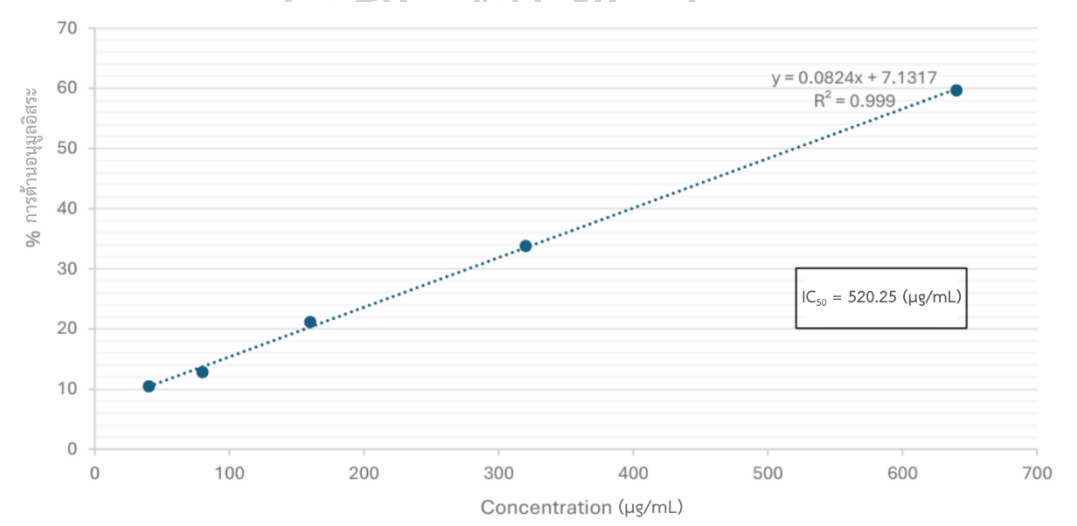
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชกระท่อม

ตัวอย่าง	**R^2**	**IC_{50} (µg/mL)**	**ประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ**
M-ADCM-4 H_2O: EtOH (25: 75)	0.9815	646.21	ปานกลาง
M-UDCM-4 H_2O: EtOH (25: 75)	0.999	721.47	สูงที่สุด (IC_{50} ต่ำสุด)
MU-ADCM-5 H_2O: EtOH (0: 100)	0.996	520.25	ต่ำที่สุด (IC_{50} สูงสุด)
MU-UDCM-1 H_2O: EtOH (100: 0)	0.976	674.76	ต่ำ

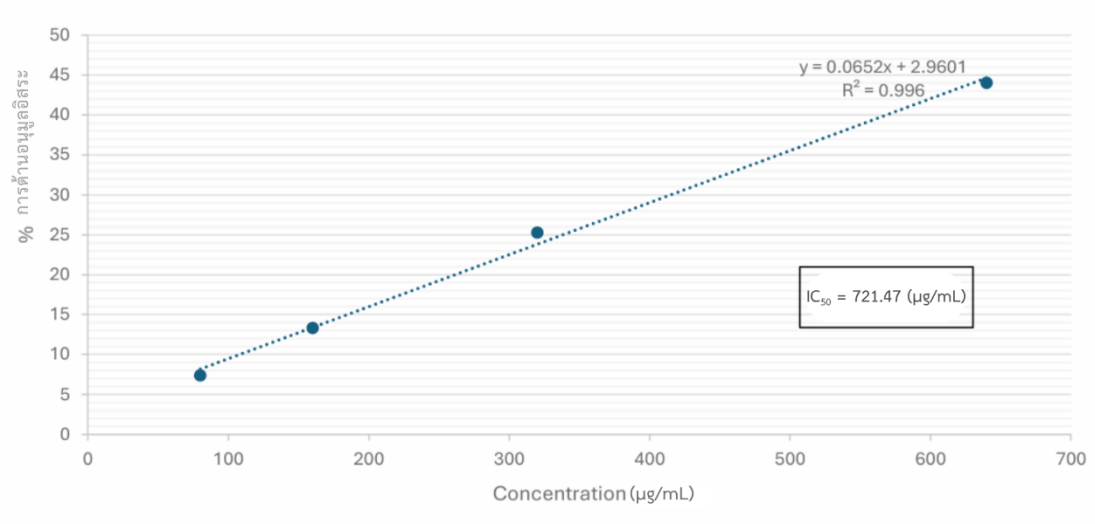
จากตารางที่ 9 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบกระท่อม (*Mitragyna speciosa*) ด้วยวิธี DPPH assay พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก โดยปรับค่า pH และใช้ตัวทำละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียว และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง DPPH ได้ 50% (IC_{50}) ต่ำที่สุด คือ 520.25 µg/mL แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.996 ซึ่งบ่งชี้ว่าค่าที่ได้มีความแม่นยำและสม่ำเสมอ ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยไมโครเวฟโดยมีการปรับค่า pH ก่อนการสกัด ภายใต้สภาวะของตัวทำละลายชนิดเดียวกัน (H_2O:EtOH = 25:75) ให้ค่า IC_{50} สูงขึ้นเป็น 646.21 µg/mL สะท้อนให้เห็นว่าการปรับค่า pH ก่อนการสกัดอาจมีผลลดทอนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารในสารสกัด ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเทคนิคการสกัด และองค์ประกอบของตัวทำละลาย มีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบกระท่อม โดยการสกัดด้วยไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก โดยปรับค่า pH ใช้เอทานอลเพียงอย่างเดียว และสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเป็นเงื่อนไขที่ให้ผลดีที่สุดสำหรับการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบกระท่อม



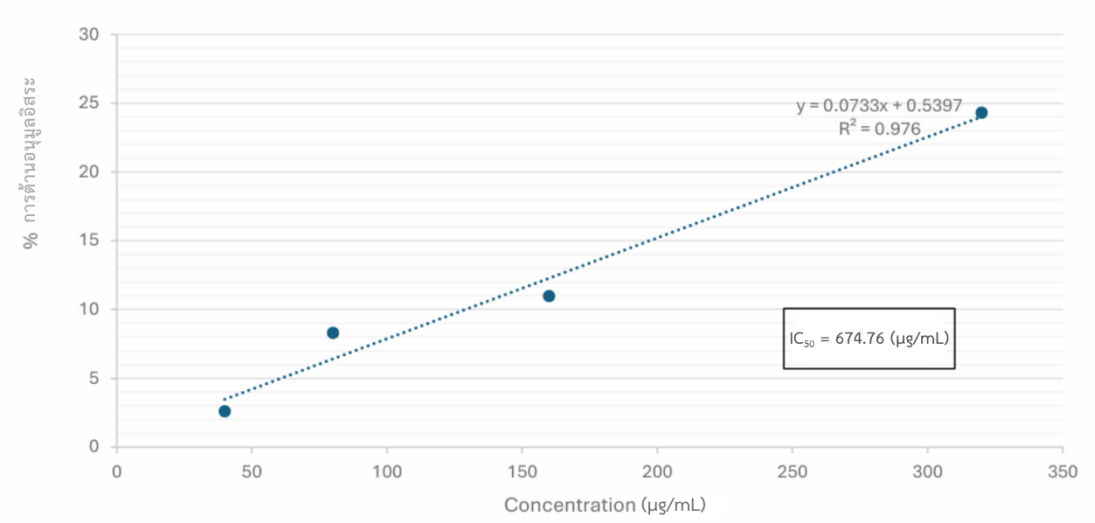
ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสาร M-ADCM-4 ในอัตราส่วน H_2O:EtOH (25 : 75)



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสาร M-UDCM-4 ในอัตราส่วน H_2O:EtOH (25 : 75)



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสาร MU-ADCM-5 ในอัตราส่วน H_2O:EtOH (0 : 100)



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสาร MU-UDCM-1 ในอัตราส่วนH_2O : EtOH (100 : 0)

บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผล

สรุปผล

จากการศึกษาวิธีการสกัดสารสารสำคัญไมทราไจนีนจากใบกระท่อมสายพันธุ์ก้านแดง โดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) และไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic) ร่วมกับตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ น้ำกลั่น น้ำกลั่นผสมเอทานอล และเอทานอล ใช้กรดซิตริกเป็นตัวช่วยในการสกัด และการสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนหรือไดคลอโรมีเทน พร้อมทั้งมีการปรับและไม่ปรับค่า pH พบว่าการสกัดสารสำคัญจากพืชกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟ ในตัวทำละลายน้ำกลั่นผสมเอทานอลอัตราส่วน 25:75 ปรับค่า pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 4.16% ส่วนการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟ ในตัวทำละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียว แบบไม่ปรับค่า pH และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 68.34% สำหรับการสกัดสารสำคัญจากพืชกระท่อมโดยใช้ไมโครเวฟแล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ในตัวทำละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียวแบบปรับค่า pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 3.63% ส่วนการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟแล้วตามด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ในตัวทำละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียว แบบไม่ปรับค่า pH สกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 46.25% วิธีการสกัดที่ให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุดคือ การใช้ไมโครเวฟในตัวทำละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียว แบบไม่ปรับค่า pH และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน ให้ร้อยละผลผลิต (%yield) สูงถึง 68.34% การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในส่วนสกัดพบว่า การใช้ไมโครเวฟและไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัตราโซนิก ในทุกอัตราส่วนพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบสำคัญของสารสกัดนอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และฟีนอลิก แต่พบซาโปนินในบางอัตราส่วน และไม่พบสเตียรอยด์และไตรเทอพีนอยด์กับสเตียรอยไกลโคไซด์ ในทุกอัตราส่วน การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนเบื้องต้นด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (Tin Layer Chromatography, TLC) ใช้ระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ Ethyl acetate : *n*-Hexane ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไมทราไจนีน พบว่า ค่า R_f ของสารมาตรฐานอยู่ที่ 0.72 และตัวอย่างสารสกัดที่มีค่า R_f ตรงกับสารมาตรฐานไมทราไจนีนคือ ตัวอย่าง M-AH-1, M-UH-3, M-ADCM-1-4, MU-AH-1-5, MU-UH-2-3, MU-ADCM-1-5 และ MU-UDCM-1 ในส่วนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค HPLC ได้เลือกสารสกัดหยาบ 4 ตัวอย่าง วิธีสกัดโดยใช้ไมโครเวฟคือ

ตัวอย่าง M-ADCM-4 (H_2O : EtOH เป็น 25 : 75) และ M-UDCM-4 (H_2O : EtOH เป็น 25 : 75) ส่วนวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก คือตัวอย่าง MU-ADCM-5 (H_2O : EtOH เป็น 0 : 100) และ MU-UDCM-1 (H_2O : EtOH เป็น 100 : 0) พบว่าสารสกัดตัวอย่าง MU-ADCM-5 (H_2O : EtOH เป็น 0 : 100) ที่สกัดใช้ไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัตราโซนิก แบบปรับค่า pH ใช้เอทานอลเพียงอย่างเดียว และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทนให้ความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนสูงถึง 87.954% ซึ่งเป็นผลลัพธ์ที่สอดคล้องกับผลของ TLC ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบจากใบกระท่อม ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดตัวอย่าง MU-ADCM-5 (H_2O : EtOH เป็น 0 : 100) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 520.20 mg/L ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด

อภิปรายผล

จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า วิธีการสกัดสารสำคัญไมทราไจนีนจากใบกระท่อมสายพันธุ์ก้านแดงโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ พบว่า ปัจจัยที่ส่งผลต่อทั้งปริมาณและความบริสุทธิ์ของสารสกัด ได้แก่ ชนิดของตัวทำละลาย สัดส่วนของตัวทำละลาย การใช้พลังงาน (ไมโครเวฟและคลื่นอัลตราโซนิก) การปรับค่า pH และการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อย่างเฮกเซนหรือไดคลอโรมีเทน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า วิธีที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือการสกัดด้วย ไมโครเวฟในเอทานอลเพียงอย่างเดียวโดยไม่ปรับค่า pH และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน ซึ่งให้ร้อยละผลผลิตสูงถึง 68.34% แสดงให้เห็นว่าเอทานอล บริสุทธิ์มีศักยภาพในการสกัดสารไมทราไจนีนได้ดีโดยไม่จำเป็นต้องปรับค่า pH ซึ่งอาจช่วยรักษาโครงสร้างของสารไมทราไจนีนในรูปแบบที่ละลายดีในตัวทำละลายอินทรีย์ และไมโครเวฟสามารถช่วยเร่งการสกัดผ่านกลไกการทำลายเซลล์พืชด้วยพลังงานความร้อนอย่างรวดเร็ว ในขณะที่วิธีที่ให้ความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนสูงที่สุด คือการสกัดด้วย ไมโครเวฟร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิกในตัวทำละลายเอทานอลเพียงอย่างเดียว แบบปรับค่า pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน ในตัวอย่าง MU-ADCM-5 ซึ่งให้ความบริสุทธิ์ของสารไมทราไจนีนสูงถึง 87.954% โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการแยกสารด้วย TLC ที่มีค่า R_f ตรงกับสารมาตรฐาน (R_f = 0.72) ทั้งนี้อาจเนื่องจากพลังงานจากคลื่นอัลตราโซนิกสามารถช่วยเสริมให้เซลล์พืชแตกละเอียดมากขึ้นร่วมกับค่า pH ที่เหมาะสมทำให้ไมทราไจนีนอยู่ในรูปที่สามารถถูกแยกออกได้มีประสิทธิภาพสูง แม้ว่าผลผลิตโดยรวมของวิธีนี้จะไม่สูงที่สุดแต่ความบริสุทธิ์ที่ได้ถือว่าสูงมาก และเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในงานที่ต้องการสารมาตรฐานหรือสารบริสุทธิ์ เช่น การวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา หรือการพัฒนายา การตรวจหาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในทุกส่วนสกัดพบสารกลุ่ม อัลคาลอยด์ เป็นองค์ประกอบสำคัญ

ซึ่งเป็นกลุ่มสารเป้าหมายของงานวิจัย และยังตรวจพบสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และฟีนอลิก ส่วน ซาโปนิน พบเพียงบางอัตราส่วน ขณะที่สเตียรอยด์ไตรเทอร์พีนอยด์ และสเตียรอยด์ไกลโคไซด์ ไม่พบในทุกส่วนสกัด ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า ตัวอย่างสารสกัด MU-ADCM-5 ให้ความบริสุทธิ์ของไมทราไจนีนสูงสุด ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 520.20 mg/L ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยสรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเลือกเทคนิคการสกัดที่เหมาะสมส่งผลต่อทั้ง ปริมาณ และคุณภาพของสารสำคัญที่ได้จากใบกระท่อม ทั้งในด้านปริมาณ ความบริสุทธิ์ และศักยภาพทางชีวภาพ ข้อมูลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ต่อยอดในระดับอุตสาหกรรม การสกัดสมุนไพรคุณภาพสูงอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย ทั้งนี้ควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างเชิงลึกของสารออกฤทธิ์ และประเมินความปลอดภัยในการใช้งานเชิงคลินิกต่อไป

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

1. Sengnon, N.; Vonghirundecha, P.; Chaichan, W.; Juengwatanatrakul, T.; Onthong, J.; Kitprasong, P.; Sriwiriyajan, S.; Chittrakarn, S.; Limsuwanchote, S.; Wungsintaweekul, J. Seasonal and Geographic Variation in Alkaloid Content of Kratom (Mitragyna speciosa (Korth.) Havil.) from Thailand *Plants* [Online], 2023.

2. Jessica, E. A.; Edward, W. B.; Christopher, R. M., Mitragyna speciosa, A Psychoactive Tree from Southeast Asia with Opioid Activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2011**,** 11 (9), 1165-1175.

3. Moklas, M.A.M.; Nurul Raudzah, A.R.; Taufik, H.M.; Sharida, F.; Farah, I.N.; Zulkhairi, A.; Shamima, A.R.A preliminary toxicity study of mitragynine, an alkaloid from Mitragyna speciosa Korth and its effects on locomotor activity in rats. Adv. Med. Dent Sci 2008, 2, 56-60.

4. Sakamoto, J.; Kitajima, M.; Ishikawa, H., Asymmetric Total Syntheses of Mitragynine, Speciogynine, and 7-Hydroxymitragynine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2022**,** 70 (9), 662-668.

5. Niyomdecha, M.; Muandao, K.; Sanongkiet, S.; Jaramornburapong, C., Antibacterial activity of Mitragyna speciosa Korth. leaves. *Science, Engineering and Health Studies* 2024, 24030002-24030002.

6. Parthasarathy, S.; Bin Azizi, J.; Ramanathan, S.; Ismail, S.; Sasidharan, S.; Said, M. I. M.; Mansor, S. M. Dhawan, V. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species: general considerations. In Studies on respiratory disorders (pp. 27-47). New York, NY: Springer New York. *Molecules* [Online], 2009, p. 3964-3974.

7. Takayama, H., Chemistry and Pharmacology of Analgesic Indole Alkaloids from the Rubiaceous Plant, Mitragyna speciosa. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2004**,** 52 (8), 916-928.

8. Ponglux, D.; Wongseripipatana, S.; Takayama, H.; Kikuchi, M.; Kurihara, M.; Kitajima, M.; Aimi, N.; Sakai, S.-i., A new indole alkaloid, 7 **α**-hydroxy-7H-mitragynine, from Mitragyna speciosa in Thailand. *Planta medica* 1994**,** 60 (06), 580-581.

9. Said, I. M.; Chun, N. C.; Houghton, P. J., Ursolic acid from Mitragyna speciosa. *Planta*

medica 1991**,** 57 (04), 398-398.

10. Hinou, J.; Harvala, C., Polyphenolic compounds from the leaves of Mitragyna speciosa. 1988.

11. Zarembo, J. E.; Douglas, B.; Valenta, J.; Weisbach, J. A., Metabolites of mitragynine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1974**,** 63 (9), 1407-1415.

12. Takayama, H., Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the rubiaceous plant, Mitragyna speciosa. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2004**,** 52 (8), 916-928.

13. Reanmongkol, W.; Keawpradub, N.; Sawangjaroen, K., Effects of the extracts from Mitragyna speciosa Korth. leaves on analgesic and behavioral activities in experimental animals. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 2007**,** 29 (Suppl 1), 39-48.

14. Chee, J.-W.; Amirul, A. A.; Majid, M. I. A.; Mansor, S. M., Factors influencing the release of Mitragyna speciosa crude extracts from biodegradable P(3HB-co-4HB). *International Journal of Pharmaceutics* 2008**,** 361 (1), 1-6.

15. Kikura-Hanajiri, R.; Kawamura, M.; Maruyama, T.; Kitajima, M.; Takayama, H.; Goda, Y., Simultaneous analysis of mitragynine, 7-hydroxymitragynine, and other alkaloids in the psychotropic plant "kratom" (Mitragyna speciosa) by LC-ESI-MS. *Forensic Toxicology* 2009**,** 27 (2), 67-74.

16. Sabetghadam, A.; Ramanathan, S.; Sasidharan, S.; Mansor, S. M., Subchronic exposure to mitragynine, the principal alkaloid of Mitragyna speciosa, in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2013**,** 146 (3), 815-823.

17. Warner, M. L.; Kaufman, N. C.; Grundmann, O., The pharmacology and toxicology of kratom: from traditional herb to drug of abuse. *International Journal of Legal Medicine* 2016**,** 130 (1), 127-138.

18. Parthasarathy, S.; Ramanathan, S.; Murugaiyah, V.; Hamdan, M. R.; Mohd Said, M. I.; Lai, C.-S.; Mansor, S. M., A simple HPLC–DAD method for the detection and quantification of psychotropic mitragynine in Mitragyna speciosa (ketum) and its products for the application in forensic investigation. *Forensic Science International* 2013**,** 226 (1), 183-187.

19. Hassan, Z.; Muzaimi, M.; Navaratnam, V.; Yusoff, N. H. M.; Suhaimi, F. W.; Vadivelu, R.; Vicknasingam, B. K.; Amato, D.; von Hörsten, S.; Ismail, N. I. W.; Jayabalan, N.;

Hazim, A. I.; Mansor, S. M.; Müller, C. P., From Kratom to mitragynine and its derivatives: Physiological and behavioural effects related to use, abuse, and addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2013**,** 37 (2), 138-151.

20. Shamima, A. R.; Fakurazi, S.; Hidayat, M. T.; Hairuszah, I.; Moklas, M. A. M.; Arulselvan, P. Antinociceptive Action of Isolated Mitragynine from Mitragyna Speciosa through Activation of Opioid Receptor System *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 2012, p. 11427-11442.

21. Carpenter, J. M.; Criddle, C. A.; Craig, H. K.; Ali, Z.; Zhang, Z.; Khan, I. A.; Sufka, K. J., Comparative effects of Mitragyna speciosa extract, mitragynine, and opioid agonists on thermal nociception in rats. *Fitoterapia* 2016**,** 109, 87-90.

22. Kumar, S., The importance of antioxidant and their role in pharmaceutical science-a review. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences* 2014**,** 1 (1), 27-44.

23. Jebur, A.; Mokhamer, M.; El-Demerdash, F., A review on oxidative stress and role of antioxidants in diabetes mellitus. *Austin Endocrinol Diabetes Case Rep* 2016**,** 1 (1), 1006.

24. Raffa, R. B., *Kratom and other mitragynines: the chemistry and pharmacology of opioids from a non-opium source*. CRC Press: 2014.

25. ผศ.ดร.นิวัติ แก้วประดับ, ใบกระท่อม สรรพคุณทางยา ประโยชน์และโทษ. ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

26. Ge, S.; Duo, L.; Wang, J.; GegenZhula; Yang, J.; Li, Z.; Tu, Y., A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, Punica granatum L. and its current research status. *Journal of Ethnopharmacology* 2021**,** 271, 113877.

27. Kruegel, A. C.; Grundmann, O., The medicinal chemistry and neuropharmacology of kratom: A preliminary discussion of a promising medicinal plant and analysis of its potential for abuse. *Neuropharmacology* 2018**,** 134, 108-120.

28. Hassan, Z.; Muzaimi, M.; Navaratnam, V.; Mohammad Yusoff, N.; Suhaimi, F.; Vadivelu, R.; Vicknasingam, B.; Amato, D.; von Hörsten, S.; Ismail, N. I.; Jayabalan, N.; Hazim, A.; Mansor, S.; Müller, C., From Kratom to mitragynine and its derivatives: Physiological and behavioural effects related to use, abuse, and addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2013**,** 37, 138–151.

29. Dewick, P. M., *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley &

Sons: 2002.

30. Aniszewski, T., *Alkaloids-secrets of life:: Aklaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*. Elsevier: 2007.

31. Lu, J.-J.; Bao, J.-L.; Chen, X.-P.; Huang, M.; Wang, Y.-T., Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012**,** 2012 (1), 485042.

32. Matsumoto, K.; Horie, S.; Ishikawa, H.; Takayama, H.; Aimi, N.; Ponglux, D.; Watanabe, K., Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb Mitragyna speciosa. *Life sciences* 2004**,** 74 (17), 2143-2155.

33. Matsumoto, K.; Takayama, H.; Narita, M.; Nakamura, A.; Suzuki, M.; Suzuki, T.; Murayama, T.; Wongseripipatana, S.; Misawa, K.; Kitajima, M., MGM-9 [(E)-methyl 2-(3-ethyl-7a, 12a-(epoxyethanoxy)-9-fluoro-1, 2, 3, 4, 6, 7, 12, 12b-octahydro-8-methoxyindolo [2, 3-a] quinolizin-2-yl)-3-methoxyacrylate], a derivative of the indole alkaloid mitragynine: A novel dual-acting **μ**-and **K**-opioid agonist with potent antinociceptive and weak rewarding effects in mice. *Neuropharmacology* 2008**,** 55 (2), 154-165.

34. Kruegel, A. C.; Gassaway, M. M.; Kapoor, A.; Váradi, A.; Majumdar, S.; Filizola, M.; Javitch, J. A.; Sames, D., Synthetic and receptor signaling explorations of the mitragyna alkaloids: mitragynine as an atypical molecular framework for opioid receptor modulators. *Journal of the American Chemical Society* 2016**,** 138 (21), 6754-6764.

35. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M., *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press: 2015.

36. Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N., Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews* 2010**,** 4 (8), 118.

37. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007**,** 39 (1), 44-84.

38. Lockwood, B., *Nutraceuticals: a guide for healthcare professionals*. Pharmaceutical press: 2007.

39. Phaniendra, A.; Jestadi, D. B.; Periyasamy, L., Free radicals: properties, sources,

targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry* 2015**,** 30, 11-26.

40. Fridovich, I., Superoxide radical and superoxide dismutases. *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach* 1981, 250-272.

41. Valko, M.; Rhodes, C.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 2006**,** 160 (1), 1-40.

42. Banerjee, M.; Vats, P., Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biology* 2014**,** 2, 170-177.

43. Sies, H., Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox biology* 2017**,** 11, 613-619.

44. Nimse, S. B.; Pal, D., Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances* 2015**,** 5 (35), 27986-28006.

45. Krinsky, N. I., Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1992**,** 200 (2), 248-254.

46. Orio, L.; Alexandru, L.; Cravotto, G.; Mantegna, S.; Barge, A., UAE, MAE, SFE-CO2 and classical methods for the extraction of Mitragyna speciosa leaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 2012**,** 19 (3), 591-595.

47. Isnaeni, N.; Saefumillah, A.; Cahyana, A. H. In *Preliminary study of isolation and purification mitragynine from kratom leaves*, Materials Science Forum, Trans Tech Publ: 2022; pp 173-179.

48. Casey, C. R.; Conley, T.; Heise, A.; Thomas, T.; Ayres, P. R., Quantitative and qualitative analysis of mitragynine in Kratom (Mitragyna speciosa) by GC-MS, LC-MS/MS and UPLC-PDA. *Journal of Regulatory Science* 2015**,** 3 (2), 1-14.

49. Zakaria, F.; Tan, J.-K.; Mohd Faudzi, S. M.; Abdul Rahman, M. B.; Ashari, S. E., Ultrasound-assisted extraction conditions optimisation using response surface methodology from Mitragyna speciosa (Korth.) Havil leaves. *Ultrasonics Sonochemistry* 2021**,** 81, 105851.

50. Madhiri, R.; Jadav, S.; Musunuri, V. A.; Harini, C.; Sree, Y. V., Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of leaf extract of Allamanda Cathartica Linn. *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences* 2023**,** 13 (3).

51. Dethe, U.; Joshi, S.; Desai, S.; Aparadh, V., Screening of bioactive compounds of Sesbania grandiflora and Pistia stratiotes. *Indian J Adv Plant Res* 2014**,** 1, 27-30.

52. Basumatary, A. R., Preliminary phytochemical screening of some compounds from plant stem bark extracts of Tabernaemontana divaricata Linn. used by Bodo Community at Kokrajhar District, Assam, India. *Archives of Applied Science Research* 2016**,** 8 (8), 47-52.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สมโภช บุญเลิศ
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี ครุศาสตรบัณฑิต (ค.บ.) สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปัจจุบัน ศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม) สาขาเคมีศึกษา มหาวิทยาลัยศิลปากร
ผลงานตีพิมพ์	นายสมโภช บุญเลิศ, นายสันติสุข สินธุนาคร และ ดร.มูฮำหมัด นิยมเดชา. (2568). วิธีการสกัด การตรวจหาสารพฤกษเคมี และการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดหยาบจากใบกระท่อมเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม, การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ ครั้งที่ 15 (หน้า S95-S108). มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร