การแยกและการหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี

โดย
นายโอภาส กุรีวรรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การแยกและการหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี

โดย
นายโอภาส กุรีวรรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

PURIFICATION AND DETERMINATION OF MITRAGYNINE FROM MITRAGYNA SPECIOSA KORTH LEAVES PATHUMTHANI PROVINCE

By

MR. Opas KURIWAN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (FORENSIC SCIENCE)

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2017

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การแยกและการหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี
โดย	โอภาส กุรีวรรณ์
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

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

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

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

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

56312338 : นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : ใบกระท่อม, สารไมทราไจนีน, สารอัลคาลอยด์

นาย โอภาส กุรีวรรณ์: การแยกและการหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อาจารย์ ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา

ไมทราไจนีน (Mitragynine) เป็นสารจำพวกอัลคาลอยด์ที่พบในพืชกระท่อมซึ่งออกฤทธิ์ต่อจิตและระบบประสาทส่วนกลาง งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการแยกและหาปริมาณสารไมทราไจนีน จากใบกระท่อมของจังหวัดปทุมธานี ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีผ่านการสกัด และผ่านควิกคอลัมน์ แล้วตรวจสอบหาไมทราไจนีนด้วยเทคนิค TLC และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของไมทราไจนีนที่ได้ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, และ FT-IR พบว่าปริมาณไมทราไจนีน ในใบกระท่อมที่ใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีผ่านการสกัด ให้ปริมาณที่สูงกว่าผ่านควิกคอลัมน์ ด้วยปริมาณ 0.948% และ 0.269% ตามลำดับ และนำสารไมทราไจนีน มาทำเป็นสารมาตรฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

56312338 : Major (FORENSIC SCIENCE)
Keyword : Katom, Mitragynine, Alcaloid

MR. OPAS KURIWAN : PURIFICATION AND DETERMINATION OF MITRAGYNINE FROM MITRAGYNA SPECIOSA KORTH LEAVES PATHUMTHANI PROVINCE THESIS ADVISOR : MUHAMMAD NIYOMDECHA

Mitragynine is an alkaloid found in Mitragyna Speciosa Korth (MSK) leaves. It was reported that the compound produced an effect on mine and central nervous. In this research, mitragynine was purified and determined by column chromatography via extraction and quick column method. The mitragynine was detected with TLC and characterized by ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR and FTIR technique. The extract yield was more than quick column yield with 0.948% and 0.269%, respectively. The result from this study applied mitragynine for forensic science application.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.มูฮำหมัด นิยมเดชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้โอกาส ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆใน การทำโครงงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อีกทั้งยังคอยให้กำลังใจและคอยเป็นที่ปรึกษาที่ดีเสมอมา ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี ประธานกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญเดช เบิกฟ้า กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความเรียบร้อย และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ นางสาวอาภาพร จารุเสนีย์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและคอยช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ในระหว่างการทำวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้ความรู้ทางด้านวิชาการ จนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ได้สำเร็จ และบุคลากรที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน คอยดูแล และช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมถึงทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดระยะเวลา ที่ได้ทำการศึกษาที่ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร หากปราศจากบุคคลเหล่านี้ วิทยานิพนธ์คงไม่ประสบผลสำเร็จ ขอกราบขอบพระคุณทุกท่านอย่างสุดหัวใจ

โอภาส กุรีวรรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1. ที่มาและความสำคัญ 1

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

3. สมมุติฐานการวิจัย 2

4. ขอบเขตของการวิจัย 2

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2

6. ขั้นตอนการวิจัย 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

1. พืชกระท่อม 3

2. อัลคาลอยด์ (Alkaloids) 8

3. อัลคาลอยด์ในพืชกระท่อม 9

4. ไมทราไจนีน (Mitragynine) 10

5. เทคนิค Column Chromatography 13

6. เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) 14
7. เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Infrared Spectroscopy, IR) 16
8. เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) 18
9. วรรณกรรมและงานวิจัยของพืชกระท่อม 19
บทที่ 3 22
วิธีดำเนินการวิจัย 22
การสกัดและการหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี 22
1. อุปกรณ์และสารเคมี 22
2. วิธีการทดลอง 22
บทที่ 4 30
ผลการวิจัย 30
บทที่ 5 48
สรุปและอภิปรายผล 48
รายการอ้างอิง 50
ประวัติผู้เขียน 53

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 กฎหมายยาเสพติดและบทลงโทษ 7

ตารางที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดไมทราไจนีน 22

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดไมทราไจนีน 22

ตารางที่ 4 การชะด้วยตัวทำละลาย ด้วยวิธี quick column chromatography 28

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักของสารที่ได้จากการลงคอลัมน์ 32

ตารางที่ 6 ผลการ Interpret ^{1}H-NMR spectrum ของ fractions 48-70 33

ตารางที่ 7 ผลการ Interpret ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 48-70 34

ตารางที่ 8 ผลการ Interpret ^{1}H-NMR spectrum ของ fractions 79-102 37

ตารางที่ 9 ผลการ Interpret ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 79-102 39

ตารางที่ 10 แสดงน้ำหนักของ fractions ที่ได้จากการลงคอลัมน์ 41

ตารางที่ 11 แสดงน้ำหนักของ fractions ที่ได้จากการลงคอลัมน์ 42

ตารางที่ 12 ผลการ Interpret ^{1}H-NMR spectrum ของ fractions 27-35 44

ตารางที่ 13 ผลการ Interpret ^{13}C-NMR ของ fractions 27-35 46

ตารางที่ 14 สรุปปริมาณ mitragynine ที่แยกได้จากตัวอย่างใบกระท่อมด้วย 2 วิธีที่ต่างกัน 48

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกของพืชกระท่อม 4

ภาพที่ 2 ลักษณะของใบกระท่อมชนิดก้านเขียว 4

ภาพที่ 3 ลักษณะของใบกระท่อมชนิดก้านแดง 5

ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างอัลคาลอยด์ที่พบในพืชกระท่อม 10

ภาพที่ 5 โครงสร้างของไมทราไจนีน 11

ภาพที่ 6 ชีวสังเคราะห์ของไมทราไจนีนในพืชกระท่อม 13

ภาพที่ 7 การสั่นของโมเลกุลในรูปแบบต่างๆ 15

ภาพที่ 8 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง NMR spectrometer 16

ภาพที่ 9 การสั่นของโมเลกุลในรูปแบบต่างๆ 17

ภาพที่ 10 หลักการทำงานของ Fourier-Transform Infrared spectroscopy (FTIR) 19

ภาพที่ 11 ใบกระท่อมปั่นละเอียด (ผงใบกระท่อม) 23

ภาพที่ 12 สีของสารละลายเมื่อนำไปต้มจนเดือด 23

ภาพที่ 13 สีของสารละลายที่ถูกปรับสภาพให้เป็นเบส 24

ภาพที่ 14 การเกิด emulsion เมื่อเติมเบสมากเกินไป 24

ภาพที่ 15 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร 25

ภาพที่ 16 การแยกสารด้วยวิธี column chromatography 25

ภาพที่ 17 การบรรจุ silica gel plate และใบกระท่อมลงใน buchner funnel 27

ภาพที่ 18 สารละลายที่เก็บได้แต่ละ fractions 29

ภาพที่ 19 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร 30

ภาพที่ 20 การแยกของ mitragynine บนแผ่น TLC 31

ภาพที่ 21 การแยกของสาร fractions 48-70, 79-102, และ 108-143 บนแผ่น TLC 31

ภาพที่ 22 H^1-NMR spectrum ของ fractions 48-70 (300MHz, $CDC1_3$) 32

ภาพที่ 23 ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 48-70 32

ภาพที่ 24FTIR spectrum ของ mitragynine (fractions 48-70) 35

ภาพที่ 25 ^{1}H-NMR spectrum ของ fraction 79-102 (300 MHz, $CDC1_3$) 36

ภาพที่ 26 ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 79-102 38

ภาพที่ 27 FTIR spectrum ของ fractions 79-102 40

ภาพที่ 28 การแยกของสารแต่ละ fractions บนแผ่น TLC 41

ภาพที่ 29การแยกของสาร fractions 27-35, 43-45, และ 72-85 บนแผ่น TLC 42

ภาพที่ 30 ^{1}H-NMR spectral ของ fractions 27-35 (300 MHz, $CDCl_3$) 43

ภาพที่ 31 ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 27-35 45

ภาพที่ 32 FTIR spectrum ของไมทราไจนีน (fractions 27-35) 47

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญ

อัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่โมเลกุลประกอบด้วยธาตุไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อะตอม ในรูปของเอมีน (amine) เอมีนออกไซด์ (amine oxide) เอไมด์ (amide) และอีไมด์ (imide) มีคุณสมบัติเป็นเบส มีรสขม และไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) โดยทั่วไปอัลคาลอยด์เป็นสารธรรมชาติที่พบมากในพืชสมุนไพร เช่น กระท่อม ฝิ่น หมาก ลำโพง ยาสูบ เป็นต้น ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาสารอัลคาลอยด์ในกลุ่มไมทราไจนีน ซึ่งเป็นสารเสพติดที่สามารถพบได้ในใบกระท่อม

พืชกระท่อมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Mitragyna Speciosa Korth อยู่ในวงศ์ Rubiaceae และมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้น แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ใบเป็น ใบเดี่ยวสีเขียวคล้ายใบกระดังงา มีชนิดก้านใบสีแดง และก้านใบสีเขียว ดอกมีสีขาวอมเหลือง ขนาดเท่าผลพุทรา ปัจจุบันสามารถพบพืชกระท่อมได้ในบางจังหวัดของภาคกลาง ได้แก่ ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา ลพบุรีกาญจนบุรี ภาคเหนือ เช่น สุโขทัย อุตรดิตถ์ พิษณุโลก แต่จะพบมาก ในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้ ของประเทศไทย เช่น นครศรีธรรมราช ตรัง สตูล พัทลุง สงขลา ยะลา ปัตตานี นราธิวาส และตอนบนของประเทศมาเลเซีย [1, 2]

แพทย์แผนโบราณในประเทศไทย นิยมใช้ใบกระท่อมมาปรุงเป็นยาเพื่อใช้รักษาโรคบิด แก้ปวดมวนท้อง ปวดเบ่ง ท้องเฟ้อ ท้องเสีย ท้องร่วง ปวดเมื่อยร่างกาย และทำให้นอนหลับ ในมุมมองของแพทย์แผนไทย ส่วนใหญ่จะนำกระท่อมมาใช้เป็นยาแก้ท้องร่วง โดยการนำมาต้มหรือผสมกับสารตัวอื่น ในปริมาณที่เท่ากัน ผู้ใช้กระท่อมส่วนใหญ่มักเป็นชาวนา ชาวสวน และผู้ใช้แรงงานที่ต้องการมีแรงทำงาน และสามารถทนตากแดดได้เป็นเวลานานโดยไม่รู้สึกเหนื่อย ต่อมาจึงกลายเป็นการเสพติดในชีวิตประจำวัน ถึงแม้ไม่ได้ทำงานก็ตาม แต่จะมีวัตถุประสงค์ในการเสพพืชกระท่อมเพื่อความมึนเมาเท่านั้น

ปัจจุบันพืชกระท่อมจึงเป็นปัญหาการแพร่ระบาดในกลุ่มวัยรุ่นเป็นจำนวนมาก เนื่องจากสามารถหาซื้อได้ง่ายกว่าสารเสพติดชนิดอื่น มีราคาถูกและสามารถทำให้เกิดอาการเคลิบเคลิ้มได้เช่นเดียวกับสารเสพติดชนิดอื่นๆ เพราะฉะนั้น ถึงแม้ว่าพืชกระท่อมจะให้ผลการออกฤทธิ์ที่อาจมีประโยชน์ทางยาได้ แต่เมื่อใช้ในปริมาณมาก จะทำให้เสพติดและมีผลเสียต่อสุขภาพ หากใช้ติดต่อกันในระยะยาว [3] งานวิจัยนี้ จึงเป็นการหาปริมาณไมทราไจนีนที่เหมาะสม เพื่อนำไปเป็นข้อมูลที่ใช้สำหรับการพัฒนาการตรวจพิสูจน์พืชกระท่อม ในงานนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

2.1 เพื่อศึกษาแนวทางการแยกไมทราไจนีน ออกจากจากใบกระท่อมด้วยวิธี Column chromatography ผ่านการสกัดและผ่าน Quick column chromatography เพื่อเปรียบเทียบปริมาณที่ได้

2.2 ศึกษาแนวทางในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของไมทราไจนีนด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ FTIR

3. สมมุติฐานการวิจัย

3.1 ปริมาณไมทราไจนีนที่ได้จากการแยกด้วยวิธีผ่าน Quick column chromatography มีปริมาณน้อยกว่า วิธี Column chromatography ผ่านการสกัด

3.2 การสกัดแยกไมทราไจนีนออกจากใบกระท่อมด้วยวิธี Column chromatography ที่ผ่านการสกัดก่อน ดีกว่าวิธี Quick column chromatography โดยไม่ผ่านการสกัด

4. ขอบเขตของการวิจัย

4.1 งานวิจัยนี้ศึกษาเฉพาะพืชกระท่อมที่มีก้านใบสีเขียวและมีแหล่งที่มา มาจากจังหวัดปทุมธานีเท่านั้น

4.2 งานวิจัยนี้ศึกษาการแยกไมทราไจนีน ออกจากใบกระท่อมโดยใช้วิธีการแยก 2 วิธี คือ Column chromatography ผ่านการสกัดและผ่าน Quick column chromatography ไม่ผ่านการสกัด

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

5.1 ได้ทราบปริมาณของไมทราไจนีนและแนวทางในการแยกโดยใช้ 2 วิธีที่แตกต่างกัน

5.2 สามารถนำไมทราไจนีนที่ได้ ไปใช้เป็นสารมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์ยืนยันว่าเป็นสารไมทราไจนีนที่ได้จากพืชกระท่อม ซึ่งเป็นการตรวจพิสูจน์ด้านนิติวิทยาศาสตร์

6. ขั้นตอนการวิจัย

6.1 ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องและรวบรวมเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

6.2 เตรียมวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

6.3 เก็บตัวอย่าง เตรียมตัวอย่าง และทำการวิจัย

6.4 เก็บรวบรวมข้อมูล ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผลการวิจัย

6.5 สรุปผลการวิจัย พร้อมข้อเสนอแนะ และการนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์

6.6 นำเสนอผลการวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พืชกระท่อม

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชกระท่อม (Kratom) เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae ซึ่งจัดอยู่ในตระกูลเดียวกับต้นเข็ม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. โดยทั่วไป พืชกระท่อมเป็นไม้ยืนต้น ขนาดกลาง ความสูงประมาณ 15-30 เมตร เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลักษณะของใบเป็นรูปไข่แกมขอบขนาน เรียงตัวเป็นคู่ตรงข้ามกัน แผ่นใบมีขนาดกว้างประมาณ 5-10 เซนติเมตร ยาวประมาณ 8-14 เซนติเมตร พืชกระท่อมที่พบทั่วไปมีชนิดก้านแดงและก้านเขียว หูใบเป็นรูปหอก อยู่ระหว่างก้านใบ (interpetiolar stipule) ลักษณะของดอก มีสีขาวอมเหลือง เป็นช่อตุ้มกลม ขนาด 3-5 เซนติเมตร แต่ละช่อมีดอกย่อยประมาณ 70-80 ดอก ชนิดของดอกเป็นแบบสมบูรณ์เพศ ออกที่ปลายกิ่ง ผลมีลักษณะเป็นแคปซูล ภายในมีเมล็ดอัดแน่น ซึ่งลักษณะของเมล็ดมีลักษณะแบน (flat seed) พืชกระท่อมมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย มาลายู จนถึงเกาะนิวกินี ซึ่งชื่อที่ใช้เรียกพืชกระท่อมนั้น จะขึ้นอยู่กับแต่ละพื้นที่ เช่น ทางภาคใต้เรียกพืชกระท่อมว่า “ท่อม” ภาคกลางเรียกว่า “อีถ่าง” ประเทศมาเลเซียเรียกว่า “เบี๊ยะ” หรือ “เคอตุ่ม” เป็นต้น

1.2 สรรพคุณทางยา

แพทย์แผนโบราณในประเทศไทย ใช้ใบกระท่อมปรุงเป็นยาเพื่อใช้ระงับอาการปวดท้อง แก้บิด แก้ท้องเสีย ระงับอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย และระงับประสาท หมอพื้นบ้านนำเปลือกและใบมาปรุงเป็นยาหรือนำใบกระท่อมที่แกะก้านใบออกมาเคี้ยว และคายส่วนที่เป็นกากทิ้ง หลังจากนั้นดื่มน้ำตาม เพื่อใช้เป็นยารักษาอาการท้องร่วง ปวดท้อง ลดอาการปวดบิด รักษาโรคกระเพาะ รักษาโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้พืชกระท่อมยังเป็นองค์ประกอบสำคัญในตำรายาคัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ ได้แก่ ยาประสะกระท่อม เนื่องจากใบกระท่อมนั้นมีพิษ อยู่ด้วย ซึ่งคนโบราณจะมีความเชื่อว่า ถ้าหากยาชนิดไหนที่มีความเป็นพิษจะต้องนำไปทำให้พิษอ่อนลง หรือเรียกว่า “ประสะ” โดยการทำให้พิษอ่อนลงนั้นสามารถทำได้หลายรูปแบบ เช่น ต้ม คั่ว หรือนำไปผสมกับสารตัวอื่น ในปริมาณที่เท่ากัน จากการศึกษาถึงภูมิปัญญาและความนิยมใช้พืชกระท่อมของหมอพื้นบ้าน พบว่า หมอพื้นบ้านนิยมใช้พืชกระท่อมมารักษาอาการท้องร่วง 67% โรคเบาหวาน 63.3% แก้ปวดเมื่อย 32.7% แก้ไอ 26.5% ขับพยาธิ 14.3% [2]

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกของพืชกระท่อม

ที่มาของภาพ : เมื่อกระท่อมมีสรรพคุณเป็นยา [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก http://www.kaset1009.com/th/articles/99586-%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD

ภาพที่ 2 ลักษณะของใบกระท่อมชนิดก้านเขียว

ที่มาของภาพ : อย. เสนอแก้กฎหมายยาเสพติดนำกระท่อมใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก http://www.thaitribune.org/contents/detail/307?content_id=23628&rand=1477651811

ภาพที่ 3 ลักษณะของใบกระท่อมชนิดก้านแดง

ที่มาของภาพ : ผู้บริโภคเฮ!! หลังมีมติผ่อนปรน ปลูก-เคี้ยวพืชกระท่อมได้ ชี้วิถีคนนครกินเป็นสมุนไพร ไม่ใช่เป็นสารเสพติด [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 1 ตุลาคม 2560 เข้าถึงได้จาก https://www.matichon.co.th /region/news_633012

1.3 ผลจากการเสพและหยุดเสพ

พบว่าหลังเคี้ยวใบกระท่อมไปประมาณ 5-10 นาที จะมีอาการเป็นสุข กระปรี้กระเปร่า ไม่รู้สึกหิว หรือไม่อยากอาหาร กดความรู้สึกเมื่อยล้าขณะทำงาน ทำให้สามารถทำงานได้นาน และทนแดดมากขึ้น แต่จะเกิดอาการกลัวหรือหนาวสั่นเมื่อฝนตก ผู้เสพใบกระท่อมจะมีผิวหนังแดง เนื่องจาก เลือดไปเลี้ยงผิวหนังมากขึ้น และมีอาการข้างเคียง ได้แก่ ปากแห้ง ปัสสาวะบ่อย เบื่ออาหาร ท้องผูก อุจจาระแข็งเป็นก้อนเล็กๆ นอนไม่หลับ และถ้าเสพใบกระท่อมในปริมาณมากๆจะทำให้มึนงง และคลื่นไส้อาเจียน แต่ในบางราย เสพเพียง 3 ใบ ก็สามารถทำให้เมาได้ ในรายที่เสพใบกระท่อมมากๆ หรือ เป็นระยะเวลานาน มักจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีขึ้นที่บริเวณผิวหนัง ทำให้ผู้เสพมีผิวคล้ำ และเข้มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าเสพกระท่อมโดยไม่ได้รูดเอาก้านใบออกจากตัวใบก่อน จะทำให้เกิด อาการที่เรียกว่า “ถุงท่อม” ในลำไส้ เนื่องจากก้านใบและใบของกระท่อมไม่สามารถย่อยได้ จึงตกตะกอนติดค้างอยู่ภายในลำไส้ ทำให้ขับถ่ายออกมาไม่ได้ ทำให้เกิดพังผืดขึ้นมาหุ้มรอบก้อนกากกระท่อม ส่งผลให้เกิดเป็นก้อนถุงขึ้นมาในลำไส้ บางรายจะมีอาการโรคจิตหวาดระแวง เห็นภาพหลอน คิดว่าคนจะมาทำร้าย และพูดไม่ค่อยรู้เรื่อง

เมื่อเสพใบกระท่อมไปนานๆ จนทำให้เกิดการเสพติด และถ้าไม่ได้เสพหรืออาการขาดยา (withdrawal symptom) จะทำให้ผู้เสพมีอาการก้าวร้าว ไม่มีแรง ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อและกระดูก แขนขากระตุก อ่อนเพลีย ไม่สามารถทำงานได้ อารมณ์ซึมเศร้า น้ำตาไหล น้ำมูกไหล นอนไม่หลับ ร่างกายมีอุณหภูมิสูงผิดปกติ ถ่ายอุจจาระเหลวมาก ปกติอยากอาหารยาก อาเจียนคลื่นไส้

มีอาการไอมากขึ้น และมีอาการกระวนกระวายมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ความรุนแรงของอาการขาดยาที่เกิดขึ้น จะมีอาการน้อยกว่าอาการถอนยาที่เกิดจากการใช้ยางฝิ่น [2]

1.4 พฤติกรรมการเสพและกลุ่มผู้ใช้พืชกระท่อม

สมัยโบราณนิยมใช้พืชกระท่อมเป็นจำนวนมาก ในหมู่ชนชั้นแรงงาน ชาวนาและเกษตรกร เนื่องจากมีความเชื่อว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน ทำงานได้นาน ทนแดดมากขึ้น และไม่เหนื่อย ต่อมาจึงกลายเป็นการเสพติดในชีวิตประจำวัน แม้ไม่ได้ทำงานก็ตาม ในปัจจุบันการเสพพืชกระท่อมใน 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ ได้เปลี่ยนแปลงวิธีการบริโภคหรือเสพให้ต่างไปจากในอดีต โดยการนำใบกระท่อมจำนวน 40-50 ใบ ไปต้มเพื่อให้ได้น้ำต้มใบกระท่อม หลังจากนั้นนำไปผสมกับยาแก้ไอ น้ำอัดลม ยากันยุง เป็นต้น การเสพพืชกระท่อมมีวัตถุประสงค์ คือ ต้องการมึนเมา โดยสาเหตุที่ 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้มีการเสพพืชกระท่อมเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีผู้นับถือศาสนาอิสลามเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งการดื่มสุราจะทำให้ผิดหลักศาสนา ทำให้เด็กและเยาวชนส่วนใหญ่หันมาเสพพืชกระท่อมเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ไม่ใช่เพียง 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้เท่านั้น ที่มีการแพร่ระบาดของน้ำต้มใบกระท่อม กลุ่มเยาวชนพื้นที่ภาคใต้ตอนบน โดยเฉพาะ 8 อำเภอของจังหวัดสุราษฎร์ธานี คือ อำเภอเมือง กาญจนดิษฐ์ พุนพิน บ้านนาสาร เกาะสมุย พระแสง ท่าชนะ และเวียงสระ พบว่ามีปัญหา การแพร่ระบาดของยาเสพติดชนิดนี้เข้าขั้นรุนแรงเช่นกัน

1.5 กฎหมายควบคุมพืชกระท่อม

ปี พ.ศ. 2486 ประเทศไทยเป็นประเทศแรกที่ประกาศให้พืชกระท่อมเป็นยาเสพติดต้องห้ามตามกฎหมายครั้งแรก ในรัชสมัยสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวอานันทมหิดล (รัชกาลที่ 8) โดยมีการระบุว่า ห้ามปลูกและครอบครอง รวมทั้งห้ามจำหน่ายและเสพใบกระท่อม ซึ่งเหตุผลที่แท้จริงของการออก พ.ร.บ.พืชกระท่อมนั้น เป็นผลมาจากฝิ่นสุกและฝิ่นดิบมีราคาแพง เนื่องจากรัฐบาลเป็นผู้ผูกขาดในการผลิต ประชาชนส่วนใหญ่จึงหันมาเสพพืชกระท่อมแทน

พระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 และพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2545 ระบุว่าทุกส่วนของพืชกระท่อม จัดเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภทที่ 5 เช่นเดียวกัน รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กฎหมายยาเสพติดและบทลงโทษ

ความผิด	บทกำหนดโทษ
ผลิต หรือนำเข้า โดยมิได้รับอนุญาตอันเป็นการฝ่าฝืน มาตราที่ 20	จำคุกตั้งแต่ 1–3 ปี และปรับตั้งแต่ 100,000 – 300,000 บาท
จำหน่าย ครอบครองเพื่อจำหน่าย หรือส่งออก โดยมิได้รับอนุญาต โดยมีจำนวนยาเสพติดให้ โทษ ไม่เกินที่กำหนดตาม มาตรา 20 วรรค 4	จำคุกไม่เกิน 1 ปี หรือปรับไม่เกิน 20,000 บาท หรือทั้งจำ ทั้งปรับ
จำหน่าย ครอบครองเพื่อจำหน่าย หรือส่งออก โดยมิได้รับอนุญาต โดยมีจำนวนยาเสพติดให้ โทษ เกินจำนวนตามมาตรา 20 วรรค 4	จำคุกไม่เกิน 2 ปี และปรับไม่เกิน 200,000 บาท
นำเข้า หรือส่งออก อันเป็นการฝ่าฝืนมาตรา 22 (ผู้รับอนุญาต จะต้องได้รับใบอนุญาตทุกครั้ง ที่มี การนำเข้า หรือส่งออก)	จำคุกไม่เกิน 1 ปี และปรับไม่เกิน 100,000 บาท
ผลิต นำเข้า หรือส่งออก ซึ่งยาปลอม อันเป็น การฝ่าฝืนมาตรา 39(1)	จำคุกตั้งแต่ 3 ปี – 20 ปี และปรับตั้งแต่ 300,000 – 2,000,000 บาท
จำหน่ายซึ่งยาปลอม อันเป็นการฝ่าฝืนมาตรา 39(1)	จำคุกไม่เกิน 5 ปี และปรับไม่เกิน 500,000 บาท
ผลิต นำเข้า หรือส่งออก ซึ่งยาผิดมาตรฐาน หรือเสื่อมคุณภาพ อันเป็นการฝ่าฝืนมาตรา 39(2) หรือ (3)	จำคุกไม่เกิน 3 ปี หรือปรับไม่เกิน 60,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ
จำหน่ายซึ่งยาผิดมาตรฐาน หรือเสื่อมคุณภาพ อันเป็นการฝ่าฝืนมาตรา 39(2) หรือ (3)	จำคุกไม่เกิน 1 ปี หรือปรับไม่เกิน 20,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ
ผลิต นำเข้า หรือส่งออก ซึ่งยาที่ไม่ได้ขึ้น ทะเบียนตำรับยา หรือเพิกถอนทะเบียนตำรับยา อันเป็นการฝ่าฝืนมาตรา 39(4) หรือ (5)	จำคุกไม่เกิน 5 ปี และปรับไม่เกิน 500,000 บาท
จำหน่ายยาที่มิได้ขึ้นทะเบียนตำรับยา หรือเพิก ถอนทะเบียนตำรับยา อันเป็นการฝ่าฝืนมาตรา 39(4) หรือ (5)	จำคุกไม่เกิน 3 ปี และปรับไม่เกิน 300,000 บาท

อย่างไรก็ตาม ในหลายประเทศมีการซื้อขายกระท่อมได้อย่างถูกกฎหมาย เช่น ในประเทศอินโดนีเซียมีการปลูกกระท่อมอย่างถูกกฎหมาย และมีการส่งออกไปประเทศต่างๆ ในทวีป เอเชีย ยุโรป และอเมริกาเหนือ ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และเยอรมัน ไม่ได้มีกฎหมายควบคุมการใช้กระท่อม มีเพียงแค่การเฝ้าระวัง ส่วนในประเทศอังกฤษมีการขายกระท่อมในหลายรูปแบบ เช่น ใบสด ใบแห้ง ผง และสารสกัดเรซิน เป็นต้น โดยผู้บริโภคสามารถซื้อได้ตามร้านกาแฟต่างๆ หรือทางอินเทอร์เน็ตโดยไม่ต้องมีใบสั่งแพทย์ [4]

2. อัลคาลอยด์ **(Alkaloids)**

อัลคาลอยด์เป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ มีฤทธิ์เป็นด่าง ในโมเลกุลประกอบด้วยธาตุไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อะตอม พบมากในพืชแต่อาจพบได้บ้างในแบคทีเรีย รา และสัตว์ เป็นสารที่มักจะมีพิษและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา สารอัลคาลอยด์จึงถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะและลำไส้ ยา ลดความดัน และยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น

2.1 การแบ่งประเภทอัลคาลอยด์

การจำแนกชนิดของสารอัลคาลอยด์ ทำได้หลายวิธี เช่น การแบ่งตามกลุ่มของพืชที่มีอัลคาลอยด์นั้นๆ แบ่งตามคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา แบ่งตามชนิดของสารตั้งต้น และแบ่งตามสูตรโครงสร้างทางเคมี แต่วิธีที่นิยมใช้คือ แบ่งตามชนิดของสารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ และแบ่งชนิดของอัลคาลอยด์ตามโครงสร้างทางเคมี ดังนี้

2.1.1 แบ่งตามชนิดของสารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ ดังนี้

2.1.1.1 อัลคาลอยด์แท้จริง (True alkaloids) สูตรโครงสร้างมีอะตอมไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อะตอมที่มาจากกรดอะมิโนและอะตอมไนโตรเจนเป็นส่วนหนึ่งของวงเฮทเทอโรไซคลิก (Heterocyclic ring) กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยด์กลุ่มนี้ได้แก่ แอล-ออร์นิธีน (L-ornithine) แอล-ไลซีน (L-lysine) แอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan) และแอล-ฮีสทิดีน (L-histidine) ตัวอย่างสารอัลคาลอยด์ที่แท้จริง เช่น โคเคน (cocaine) นิโคติน (nicotine) พิเพอริดีน (piperidine) พิเพอรีน (piperine) มอร์ฟีน (morphine) และอะโทรปีน (atropine) เป็นต้น

2.1.1.2 โพรโทอัลคาลอยด์ (Protoalkaloids) เช่น เมสคาลีน (mescaline) ฮอร์ดินีน (hordenine) และโยฮิมบีน (yohimbine) เป็นกลุ่มของสารอัลคาลอยด์ที่อะตอมไนโตรเจนในโครงสร้างมาจากกรดอะมิโนเช่นเดียวกันกับอัลคาลอยด์แท้จริง แต่โครงสร้างมีอะตอมไนโตรเจนอยู่นอกวงเฮทเทอโรไซคลิก (heterocyclic ring) กรดอะมิโนที่เป็นสารตั้ง

ต้นในชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) และ แอล-ทริปโตเฟน (L-tryptophan)

2.1.1.3 ซูโดอัลคาลอยด์หรืออัลคาลอยด์เทียม (Pseudoalkaloids) เป็นอัลคาลอยด์ที่มีโครง คาร์บอน (carbon skeleton) ไม่ได้มาจากกรดอะมิโน สูตรโครงสร้างประกอบด้วย อะตอมไนโตรเจน ในวงเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic ring) สารตั้งต้นในชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ แอซิเตต (acetate) กรดไพรูวิก (pyruvic acid) กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) เจอรานิออล (geraniol) ซาโปนิน (saponins) และอะดีนีน (adenine) กวานีน (guanine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) หรือ สารที่เกิดจากกระบวนการเปลี่ยนของสารตั้งต้น (postcursor) ของกรดอะมิโน ตัวอย่างสารอัลคาลอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น คาเฟอีน (caffeine) แคปไซซิน (capsaicin) ทีโอโบรมีน (theobromine) และธีโอฟิลลีน (theophylline) เป็นต้น

2.1.2 แบ่งตามโครงสร้างทางเคมี ดังนี้

2.1.2.1 อัลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนอยู่นอกวง (non-heterocyclic alkaloids)

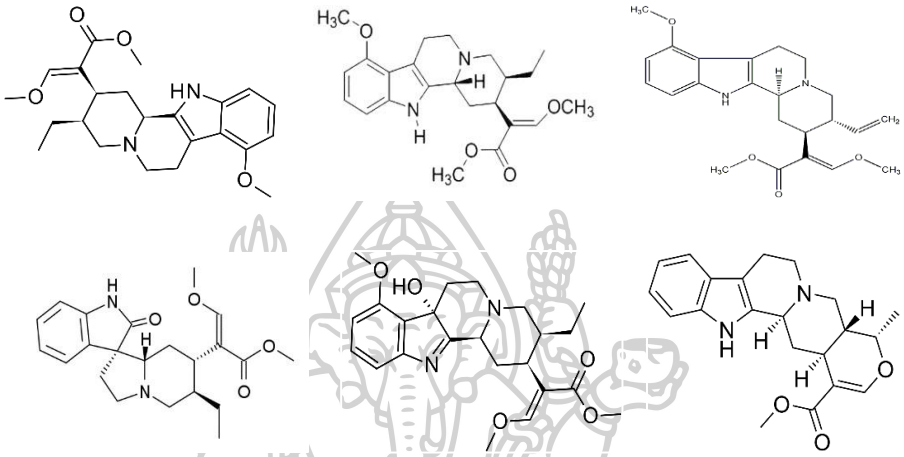
2.1.2.2 อัลคาลอยด์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนของวง (heterocyclic alkaloids) ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ได้เป็นกลุ่มไพโรล (pyrrole) ไพโรลิดีน (pyrrolidine) ไพริดีน (pyridine) พิเพอริดีน (piperidine) ไพโรโลซิดีน (pyrrolozidine) โทรเพน (tropane) ควิโนลีน (quinoline) ไอโซควิโนลีน (isoquinoline) อะพรอฟีน (aporphine) นอร์ลูพิเนน (nor-lupinane) อินโดล (indole) อิมิดาโซล (imidazole) พิวรีน (purine) และสเตอรอยด์ (steroid)

หน้าที่ของอัลคาลอยด์ในพืช ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีการสันนิษฐานว่าอัลคาลอยด์มีหน้าที่ในพืช เช่น เป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนเพื่อสร้างโปรตีน ช่วยควบคุมการเจริญเติบโต หรือการงอกของเมล็ดพืชบางชนิด ช่วยป้องกันพืชจากแมลงต่างๆ เนื่องจากอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่มักมีรสขมและมีพิษ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพืชจำนวนมากกว่า 80% ไม่มีการสร้างและไม่มีการสะสมสารอัลคาลอยด์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารอัลคาลอยด์อาจจะเป็นสารที่ไม่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืชโดยทั่วไป [1]

3. อัลคาลอยด์ในพืชกระท่อม

อินโดลอัลคาลอยด์ (indole alkaloids) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชกระท่อม และมีสารสำคัญหลักคือ mitragynine ซึ่งปริมาณ ไมทราไจนีน ที่พบในใบกระท่อมของประเทศไทยมีปริมาณสูงถึง 66% โดยน้ำหนัก เมื่อเทียบกับปริมาณสารสกัดอัลคาลอยด์ทั้งหมด ซึ่งขั้นตอนการสกัดสารกลุ่มอัลคาลอยด์ มักใช้หลักการสกัด กรด-ด่าง (acid-base extraction) ล่าสุดมีรายงานว่า Ori และคณะ (2012) [5] ได้พัฒนาวิธีการสกัดไมทราไจนีนออกจากใบกระท่อมของประเทศอินโดนีเซีย โดยใช้คลื่นเสียงไมโคเวฟและ solid-phase extraction พบว่าได้ปริมาณไมทราไจนีนสูงกว่าวิธี

ดั้งเดิม นอกจากนี้ ยังพบสารอัลคาลอยด์ตัวอื่นๆ อีก เช่น speciogynine, paynantheine, rhynchophylline, 7-hydroxy-mitragynine และ ajmalicine เป็นต้นตัวอย่างโครงสร้างของสารอัลคาลอยด์ที่พบในพืชกระท่อม(ดังแสดงในภาพที่ 4) รูปแบบการสร้างและการสะสมสารอัลคาลอยด์และสารอื่นๆในพืชกระท่อมมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งเพาะปลูกและเวลาที่เก็บเกี่ยว[6]



ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างอัลคาลอยด์ที่พบในพืชกระท่อม

ที่มาของภาพ : พืชกระท่อม (Kratom) ผู้เขียน รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล [ออนไลน์],เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก http://ccpe.pharmacycouncil.org /showfile.php?file=251

4. ไมทราไจนีน (Mitragynine)

4.1 คุณสมบัติและลักษณะทั่วไป

ไมทราไจนีน (Mitragynine) หรืออาจเรียกตามลักษณะโครงสร้างว่า 9-methoxy-Corynantheidine ไมทราไจนีนจัดเป็นอัลคาลอยด์ชนิด corynanthe มีสูตรทางเคมีเป็น $C_{23}H_{30}O_4N_2$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 398.503 กรัมต่อโมล ลักษณะโครงสร้างของไมทราไจนีนจัดอยู่ในประเภทเดียวกันกับสารอัลคาลอยด์ที่พบในสกุล Yohimbe และสกุล Uncaria ไมทราไจนีนมีลักษณะเป็นผงสีขาว (white amorphous powder) มีคุณสมบัติละลายในตัวทำละลายชนิดแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และกรดอะซิติก มีจุดเดือด (boiling point) และจุดหลอมเหลว (melting point) อยู่ที่ประมาณ 230-240 °C และ 110-115.6 °C ตามลำดับ สามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 250 นาโนเมตร (nm)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างกับฤทธิ์ลดการเจ็บปวด (analgesic) มีรายงานตำแหน่งที่สำคัญต่อการออกฤทธิ์ที่แสดงบนโครงสร้างของไมทราไจนีน ดังนี้

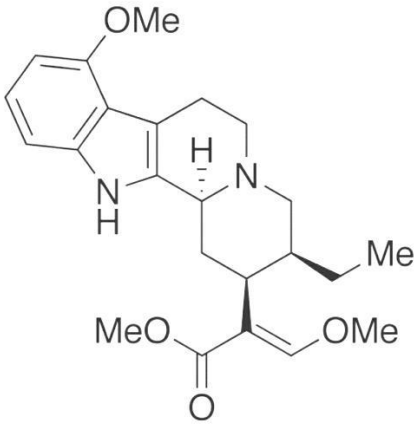
4.1.1 การกำจัดหมู่เมทิล (-CH_3) หรือทำให้เป็นหมู่อะเซทิล (CH_3CO^-) จะทำให้ความสามารถในการจับกับ opioid receptor ลดลง ซึ่งหมู่ methoxy (R-OCH_3) ที่ตำแหน่งที่ 9 จัดเป็นหมู่ที่สำคัญต่อการจับกับ opioid receptor

4.1.2 การเปลี่ยนหมู่เมทิล (-CH_3) ไปเป็น alkyl side chain ทำให้ไมทราไจนีนไม่สามารถจับกับ opioid receptor ได้

4.1.3 การเปลี่ยนแปลง stereochemistry ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 และหมู่ methoxy (R-OCH_3) ตำแหน่งที่ 17 ทำให้ไมทราไจนีนไม่สามารถจับกับ opioid receptor ได้

4.1.4 การทำ ester hydrolysis ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 23 ทำให้การจับกับ opioid receptor ลดลง แต่ในทางตรงกันข้ามหากเติมหมู่ α-hydroxyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 จะได้สารที่มีชื่อว่า 7-hydroxy-mitragynine ซึ่งจะทำให้การจับกับ opioid receptor

ในการสังเคราะห์สารไมทราไจนีน ด้วยวิธีทางเคมี (organic synthesis) นั้นสามารถสังเคราะห์ไมทราไจนีนได้สำเร็จ แต่ปริมาณที่สังเคราะห์ได้มีปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับการสกัดจากธรรมชาติ ในปี 2012 ทีมวิจัยจากมหาวิทยาลัยชิบะ ประเทศญี่ปุ่น ได้จดสิทธิบัตร (US8247428 B2) เรื่องการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ indole alkaloid ที่อาศัยโครงสร้างของไมทราไจนีน และ 7-hydroxy mitragynine เป็นสารต้นแบบ (Lead compound) ทำให้ได้อนุพันธ์หลากหลายของ indole alkaloid ที่มีคุณสมบัติในการจับกับ opioid receptor ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาต่อให้เป็นยาในกลุ่ม opioid analgesic ต่อไปได้ [6] โครงสร้างของไมทราไจนีน ดังตัวอย่างภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างของไมทราไจนีน

ที่มาของภาพ : Mitragynine [ออนไลน์],เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก https://www.trc-canada.com/product-detail/?CatNum=M373550

ชื่อทางเคมี = 9–methoxy-corynantheidine

สูตรทางเคมี = $C_{23}H_{30}N_2O_4$

M.W. = 398.22 g/mol

M.P. = 110 – 115.6 °C

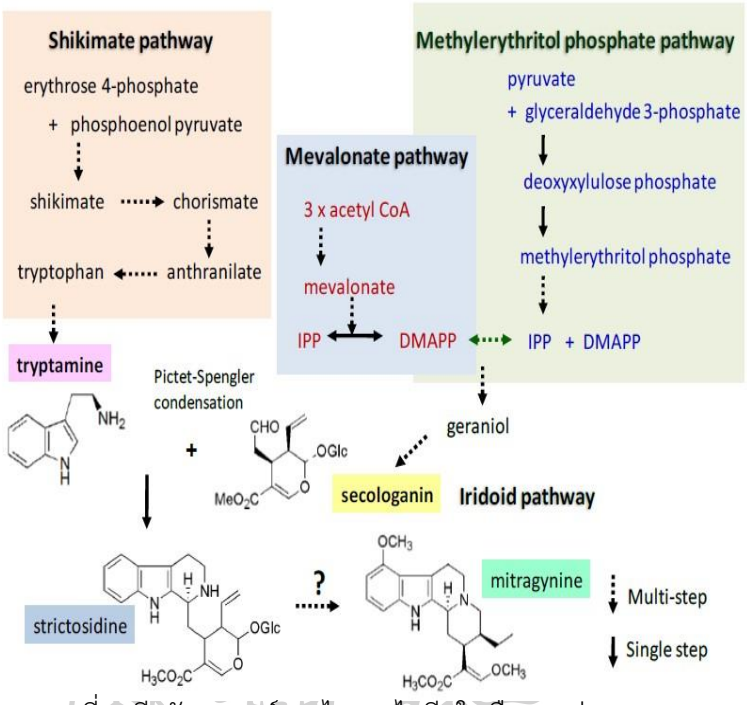
B.P. = 230 – 240 °C

UV max : 225 nm

เป็น Base มีลักษณะเป็นผง amorphous สีขาวละลายใน alcohol chloroform และ acetic acid

4.2 ชีวสังเคราะห์ของไมทราไจนีน (Biosynthesis of mitragynine)

ชีวสังเคราะห์ของไมทราไจนีน มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการมากกว่า 20 ขั้นตอน เช่นเดียวกันกับชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่ม terpenoid indole alkaloid อื่นๆ การศึกษาชีวสังเคราะห์ของไมทราไจนีน เริ่มโดย Rueffer และคณะ(2521) ที่ทำการป้อนสารติดฉลากลงใน strictosidine ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สำคัญในชีวสังเคราะห์ของ terpenoid indole alkaloid ผลจากการศึกษาพบว่าสารติดฉลากได้ถูกนำไปใช้และมีฉลากติดบนสารไมทราไจนีน จากการศึกษาดังกล่าว จึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า ไมทราไจนีนเกิดจากสารตัวกลาง (intermediate) ด้วยสมมุติฐานนี้ จึงสรุปได้ว่า ไมทราไจนีนถูกสร้างขึ้นจากองค์ประกอบ 2 ส่วนคือ ส่วน indole ที่ได้จาก tryptamine ใน shikimate pathway และส่วนของ iridoid ที่ได้จาก secologanin ใน terpenoid pathway ซึ่งทั้งสองส่วนจะเกิดการรวมตัวกันโดยอาศัยเอนไซม์ strictosidine synthase [6] ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ชีวสังเคราะห์ของไมทราไจนีนในพืชกระท่อม

ที่มาของภาพ : พืชกระท่อม (Kratom) ผู้เขียน รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล [ออนไลน์],เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก http://ccpe.pharmacycouncil.org /showfile.php?file=251

5. เทคนิค **Column Chromatography**

โครมาโทกราฟี เป็นวิธีแยกของผสมให้ออกจากกัน หรือแยกสารละลายผสมให้บริสุทธิ์ ซึ่งเทคนิคโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารละลายให้ออกมาเป็นสี และยังสามารถแยกสารที่ไม่มีสีให้ออกจากกันได้ด้วย เทคนิคโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคการกระจายของสาร ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่เรียกว่า Stationary phase และเฟสเคลื่อนที่ เรียกว่า Mobile phase

สามารถแบ่งโครมาโทกราฟี ได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของเฟสที่เกี่ยวข้องคือ

5.1 Adsorption chromatography ในกลุ่มนี้ใช้ของแข็งเป็นเฟสที่อยู่กับที่ เช่น อะลูมินา ซิลิกาเจล และจะใช้แก๊สหรือของเหลว เป็นเฟสเคลื่อนที่ เช่น Column chromatography, Thin layer chromatography, Gas-solid chromatography

5.2 Partition chromatography ในกลุ่มนี้ใช้ของเหลวเป็นเฟสที่อยู่กับที่ ส่วนมากจะเป็นน้ำ ซึ่งถูกพยุงอยู่ด้วยของแข็งที่พรุน เช่น ดินเบา (Kieselguhr) หรือ เซลลูโลส (Cellulose) ส่วนเฟสเคลื่อนที่จะใช้แก๊สหรือของเหลวก็ได้ เช่น Paper chromatography, Gas-liquid chromatography

เทคนิค column chromatography นี้จะใช้คอลัมน์แก้วบรรจุตัวดูดซับ (Absorbent) ซึ่งชุ่มอยู่ด้วยตัวทำละลาย (Solvent) ชนิดใดชนิดหนึ่ง แล้วนำสารผสมที่ต้องการแยก (Solute) ซึ่ง

ละลายอยู่ในตัวทำละลายอันเดียวกันข้างต้น มาหยดลงบนตัวดูดซับ แล้วเติมตัวทำละลายตามลงมา ตัวทำละลายจะค่อย ๆ นำพาหรือชะสารที่ต้องการแยก ให้เคลื่อนที่ลงไป (elute) ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน จนในที่สุดจะได้แถบสีของแต่ละสารแยกออกจากกัน ถ้าสารเหล่านั้นมีสีในตัวเอง แต่ถ้าสารเหล่านั้นไม่มีสี จำเป็นต้องใช้วิธีอื่น เพื่อหาว่าแต่ละแถบของสารอยู่ส่วนไหนของคอลัมน์ เช่น อาจตรวจด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรือสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์บางชนิดไปบนตัวดูดซับสำหรับตรวจหาสาร หรือเคลือบตัวดูดซับด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อสารอยู่ที่ตำแหน่งใด ตรงนั้นจะมืด เพราะสารไปบังการเรืองแสง หรืออาจตรวจด้วย เครื่อง Detector ก็ได้ การแยกสารในสารผสมให้ออกจากกันได้เนื่องจากแต่ละสารถูกดูดซับไว้โดยตัวดูดซับ ในอัตราที่ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดซับไว้มากกว่า ย่อมเคลื่อนลงมาช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อยกว่า จากหลักการนี้ ทำให้สามารถแยกสารหลายๆ ชนิดออกจากกันได้หรือ แยกสารที่มีขั้วต่างกันออกจากกันได้ สารที่มีขั้วมากจะถูกดูดไว้แน่นและถูกชะได้ยากกว่าสารที่มีขั้วน้อยกว่า การแยกสารผสมออกจากกันได้อย่างชัดเจน และห่างกันในเวลาไม่มาก แสดงถึงประสิทธิภาพของ Column

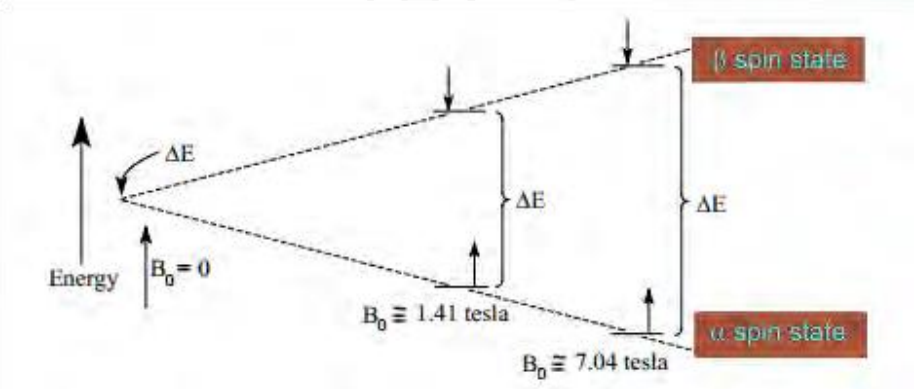
ตัวอย่างสารที่จะแยกออกจากกันได้โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบดูดซับนี้ คือพวกสีย้อม (dye), Chlorophyll, Alkaloid ฯลฯ ส่วนมากตัวดูดซับที่ใช้คือ Alumina (Al_2O_3) หรือ Silica gel (SiO_2), ซึ่ง silica gel ใช้ได้ดีกับสารที่เป็นเบสและใช้ได้ดีกับสารเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะสารที่เป็นกรดหรือกลาง หรือเบสที่อ่อนมาก [7] ส่วนเทคนิค quick column chromatography เป็นเทคนิคที่คล้ายกับ เทคนิค column chromatography เพียงแต่ใช้ตัวดูดซับขนาดเล็กกว่า และขณะชะคอลัมน์นิยมใช้ปั๊มช่วย

6. เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี **(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)**

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี หรือที่เรียกกันว่า เอ็นเอ็มอาร์ (NMR) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความถี่คลื่นวิทยุ ซึ่งมีพลังงานอยู่ในช่วงที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสปิน ซึ่งเป็นสมบัติเฉพาะของนิวเคลียสแต่ละชนิด เมื่ออยู่ภายใต้สนามแม่เหล็ก ไม่ใช่นิวเคลียสทุกชนิดที่จะสามารถดูดกลืนคลื่นวิทยุได้ แต่จะต้องเป็นนิวเคลียสที่มีค่าสปินไม่เป็นศูนย์เท่านั้น ตัวอย่างเช่น ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{19}F เป็นต้น ^{1}H เป็นนิวเคลียสที่มีความสำคัญมากเนื่องจากเป็นธาตุที่พบมากในสารประกอบอินทรีย์ทั่วไป แต่คาร์บอนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารอินทรีย์นั้นมีเพียง ^{13}C เท่านั้นที่ให้สัญญาณ NMR ซึ่งพบในปริมาณน้อยมากในธรรมชาติ ในขณะที่ ^{12}C ไม่ให้สัญญาณเนื่องจากมีค่าสปินเป็นศูนย์

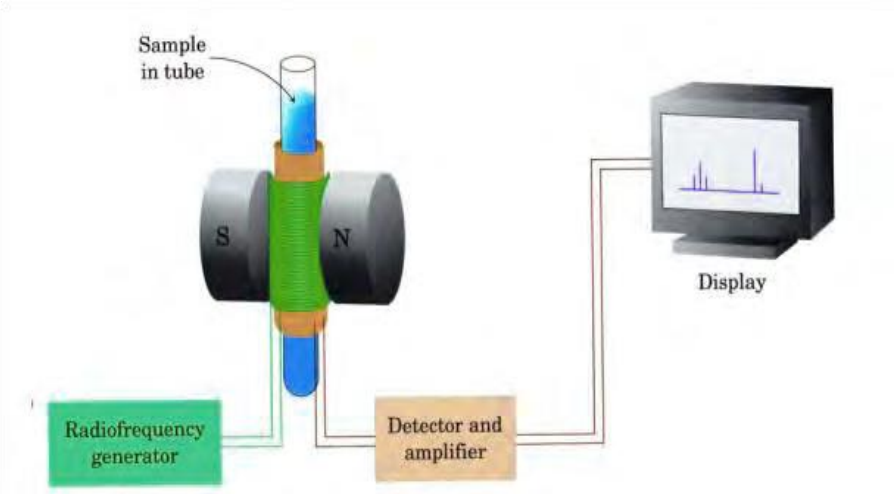
หลักการของ NMR ค่อนข้างซับซ้อนแต่พอจะอธิบายให้เห็นภาพได้ดังนี้ นิวเคลียสเป็นอนุภาคที่มีประจุในนิวเคลียสของธาตุบางอย่างประจุนจะหมุน(spin)เป็นวงรอบแกนนิวเคลียส

(nuclear axis) เช่นเดียวกับที่อิเล็กตรอนซึ่งเป็นอนุภาคมีประจุหมุนรอบนิวเคลียสการ สปินของนิวเคลียสนี้จะก่อให้เกิดโมเมนต์แม่เหล็ก(magnetic moment)บริเวณแกนของการหมุน ^{1}H มีเลขสปินควอนตั้มเป็น ½ และมีค่าที่เป็นไปได้เพียง 2 ค่าคือ +½ และ -½ เมื่อให้สนามแม่เหล็กภายนอก(external หรือ applied magnetic field, B_0) แก่นิวเคลียสสปินซึ่งเคยวางตัวในแบบสุ่มได้ทุกทิศทางจะจัดตัวใหม่และจะมีนิวเคลียร์แมกเนติกโมเมนต์ที่เป็นไปก็จะมีเพียงสองแบบ (ภาพที่ 7) คือนิวเคลียสที่มีสปิน +½ จะวางตัวในแนวขนานกับแนวของ B_0 มีทิศทางเดียวกับ B_0 และเป็นสถานะที่มีพลังงานต่ำ (เรียกว่า α) ส่วนนิวเคลียสที่มีสปิน -½ ก็จะวางตัวในแนวขนานกับแนวของ B_0แต่มีทิศทางตรงข้ามกับ B_0และจะมีพลังงานสูงกว่า (เรียกว่า β) [8]



ภาพที่ 7 การสั่นของโมเลกุลในรูปแบบต่างๆ

ที่มาของภาพ : อินฟราเรดสเปกโตรสโคป [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302265_04_TV/ir-265.pdf

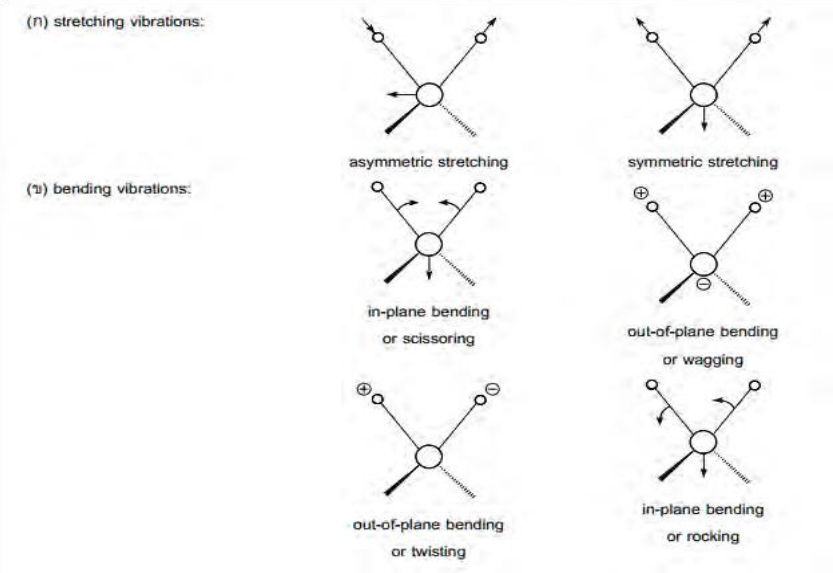


ภาพที่ 8 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง NMR spectrometer

ที่มาของภาพ : นิวเคลียร์แมเนติกซ์เรโซแนนซ์สเปกโตรสโคป [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302265_04_TV/nmr-265.pdf

7. เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี **(Infrared Spectroscopy, IR)**

รังสีอินฟราเรด (Infrared radiation, IR) [8] เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าซึ่งมีความถี่อยู่ระหว่างช่วงของรังสีไมโครเวฟและแสงที่ตามองเห็นได้ การอ้างอิงถึงความถี่ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงนี้ จะใช้ค่าที่เรียกว่า เวฟนัมเบอร์ (wave number) ซึ่งมีหน่วย เป็น cm^{-1} ซึ่งหมายถึง จำนวนคลื่นต่อหน่วยเซนติเมตร ตัวอย่างเช่น รังสีอินฟราเรดที่มีความถี่ 3000 cm^{-1} หมายถึง ในระยะทาง 1 เซนติเมตรที่คลื่นเดินทางไป จะมีจำนวนลูกคลื่นทั้งหมด 3000 ลูกคลื่น ดังนั้น ตัวเลขยิ่งมากย่อมหมายถึงพลังงานของรังสีก็ยิ่งมากด้วย ช่วงของรังสีอินฟราเรดที่เป็นประโยชน์ต่อนักเคมีจะอยู่ในช่วง 4000-400 cm^{-1} พลังงานของรังสีอินฟราเรดจะอยู่ในช่วงที่สอดคล้องกับการสั่น (vibration) ของพันธะภายในโมเลกุล หากการสั่นของพันธะใดเกิดที่ความถี่ที่ตรงกับความถี่ ของรังสีอินฟราเรด ก็จะเกิดการดูดกลืนขึ้น ตัวอย่างของรูปแบบของการสั่นเหล่านี้แสดงดัง ภาพที่ 9



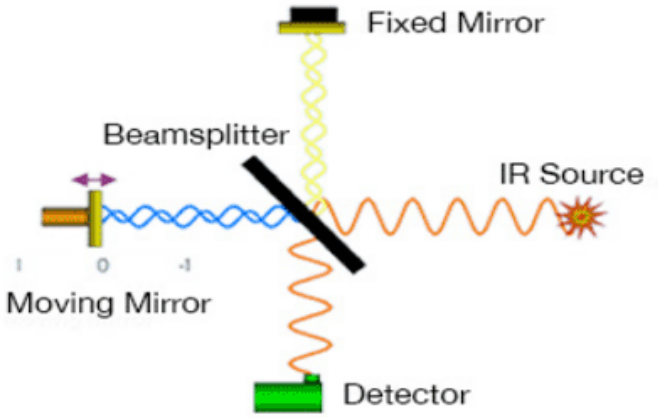
ภาพที่ 9 การสั่นของโมเลกุลในรูปแบบต่างๆ

ที่มาของภาพ : อินฟราเรดสเปกโตรสโคป [ออนไลน์], เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302265_04_TV/ir-265.pdf

การสั่นในลักษณะต่างๆ เหล่านี้ จะมีการดูดกลืนพลังงานที่เป็นค่าเฉพาะของมันซึ่งมักอยู่ในช่วงคลื่นอินฟราเรด แต่เนื่องจากในโมเลกุลหนึ่งๆ มีพันธะได้หลายแบบ และพันธะแต่ละพันธะ ก็มีรูปแบบการสั่นได้อีกหลายแบบ ทำให้โมเลกุลหนึ่งๆ จะแสดงการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดได้หลายช่วงคลื่นพร้อมๆกัน ลักษณะการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดจะเป็นแถบ (band) หรือพีค (peak) หลายๆ แถบหรือพีค ที่แสดงถึงค่าปริมาณรังสีอินฟราเรดที่ถูกดูดกลืนในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ทรานสมิตแตนซ์ (% transmittance) ซึ่งหมายถึงปริมาณรังสีที่สามารถทะลุผ่านตัวอย่างออกไปได้เทียบกับเวฟนัมเบอร์ซึ่งมักอยู่ในช่วง 4000-400 cm^{-1} กราฟที่ได้จะเรียกว่า อินฟราเรดสเปกตรัม ซึ่งแต่ละแถบการดูดกลืน สามารถบ่งบอกลักษณะเฉพาะลงไปได้อีก โมเลกุลต่างชนิดกันจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ช่วงคลื่นแตกต่างกันและให้สเปกตรัมต่างกัน แม้แต่สารที่มีโครงสร้างง่ายๆ ก็อาจให้สเปกตรัมที่ดูซับซ้อนได้ อินฟราเรดสเปกตรัมของสารแต่ละชนิดจะเป็นลักษณะเฉพาะ และโดยทั่วไปจะไม่พบสารคู่ใดที่มีสเปกตรัมเหมือนกันทุกประการ (ยกเว้นกรณีของค่าอิแนนชิโอเมอร์) อย่างไรก็ตาม สารที่มีหมู่ฟังก์ชั่นประเภทเดียวกัน มักให้พีคลักษณะคล้ายคลึงกันในช่วงความถี่ใกล้เคียงกันแม้ว่าจะมีความแตกต่าง

8. เทคนิค **Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)**

เทคนิค FTIR เป็นเทคนิคสาหรับการวิเคราะห์เพื่อการจำแนกประเภทสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์และพันธะเคมีในโมเลกุล และสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารตัวอย่างได้อีกด้วย โดยใช้การตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่ความถี่ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะ การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิศูนย์องศาสมบูรณ์ อะตอมในโมเลกุลจะมีการสั่นอยู่ตลอดเวลา เมื่อความถี่ของการสั่นเท่ากับความถี่ของรังสีอินฟราเรดที่ฉายมายังโมเลกุล โมเลกุลก็จะดูดกลืนรังสี จำนวนแถบการดูดกลืนทั้งหมดที่สังเกตได้ จะมีค่าไม่เท่ากับการสั่นมูลฐานของโมเลกุลทั้งหมด โดยจะมีค่าลดลงเพราะจะมีบางแถบพลังงานที่ไม่มีการตอบสนองต่อพลังงานในช่วงรังสีอินฟราเรด เครื่องวิเคราะห์ด้วยอินฟราเรด ในระบบ FTIR มีส่วนประกอบหลัก คือ แหล่งกำ เนิดรังสี Interferometer และเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดสำหรับ FTIR คือ Deuterated Triglycine Sulfate (DTGS) และ Mercury Cadmium Telluride (MCT) หลักการทำงานของ FTIR รังสีอินฟราเรดจากแหล่งกำเนิดจะถูกฉายไปยัง Interferometer ซึ่งตัวที่นิยมใช้ คือ Michelson Interferometer ประกอบด้วยกระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และมีกระจกที่ติดอยู่กับที่ โดยกระจกทั้งสองจะตั้งฉากกันและมีตัวแยกแสงซึ่งเป็นอุปกรณ์กึ่งสะท้อนแสง โดยส่วนมากทำมาจากการนำฟิล์มบางของเจอร์มาเนียม วางลงบน KBr ที่ เป็นตัวแยกแสง รังสีครึ่งหนึ่งจะทะลุผ่านไปที่กระจกที่ติดอยู่กับที่และรังสีอีกครึ่งหนึ่งจะสะท้อน ไปที่กระจกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ หลังจากนั้นรังสีก็จะสะท้อนจากกระจกกลับมารวมกันที่ตัวแยก แสงเกิดการแทรกสอดขึ้นหลังจากนั้นรังสีก็จะผ่านไปยังตัวอย่างและในที่สุดก็จะตกลงบน เครื่องตรวจวัด อย่างไรก็ตามเทคนิค FTIR นี้มีความไวและใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิค IR ชนิดอื่น [9]



ภาพที่ 10 หลักการทำงานของ Fourier-Transform Infrared spectroscopy (FTIR)
ที่มาของภาพ : Fourier-Transform Infrared Spectroscopy [ออนไลน์] เข้าถึงเมื่อ 1 เมษายน 2560 เข้าถึงได้จาก http://crf.iitd.ac.in/Facility-FTIR.html

9. วรรณกรรมและงานวิจัยของพืชกระท่อม

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์หาปริมาณไมทราไจนีน ในใบกระท่อม ได้มีการนำเสนอออกมาเป็นจำนวนมาก โดยมีการศึกษาดังต่อไปนี้

ในปี พ.ศ. 2464 Field, E. ทำการสกัดแยกสารอัลคาลอยด์ 2 ชนิดออกจากใบกระท่อม คือ mitragynine และ mitraversine [10]

ในปี พ.ศ. 2475 Grewel ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของไมทราไจนีน ต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง พบว่าไมทราไจนีนมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางหรือมีฤทธิ์ในการลดการตึงตัว (tone) และความแรง (amplitude) ของการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบทำให้เกิดอาการชาเฉพาะที่ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ที่สามารถฆ่าโพรโทซัว (protozoa) ทั่วไปได้ แต่ไม่สามารถฆ่า protozoa ที่ก่อให้เกิดโรคได้ ต่อมาได้มีการทดลองกับอาสาสมัครชาย 5 คน พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับสัตว์ทดลอง ในการศึกษาเดียวกันนี้ ได้รายงานว่ารูปแบบการให้สารไมทราไจนีน กับสัตว์ทดลอง โดยการกินมีฤทธิ์ดีกว่าการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง [11]

ในปี พ.ศ. 2506 Joshi, Raymond-Hamet และ Taylor ได้ศึกษาและรายงานสูตรโครงสร้างของ ไมทราไจนีน ว่ามีโครงสร้างเป็นวงแหวนแบบเปิด คาร์บอนตำแหน่งที่ 19 มีกลุ่ม methoxy จับอยู่ และ ไมทราไจนีน เป็นสารอัลคาลอยด์ในกลุ่ม indole alkaloid [12]

ในปี พ.ศ. 2533 นิวัติ แก้วประดับ ทำการสกัดแยกอัลคาลอยด์ออกจากใบกระท่อมสดได้ทั้งหมด 9 ชนิดได้แก่ Mitragynine, Paynantheine, Speciogynine, Mitraciliatine, Ajmalicine, Isotoropodine, MitraphylineและTetrahydroalitonine ซึ่งTetrahydroalitonine ไม่มีรายงานว่าเคยสกัดพบมาก่อน เนื่องจากความคงตัวไม่ดี จึงพบเฉพาะในใบกระท่อมสดเท่านั้น [13]

ในปี พ.ศ. 2538 Hiromitsu Takayama และคณะ ได้ทำการสังเคราะห์ไมทราไจนีน โดยเริ่มต้นจากแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยใช้เอนไซม์หรือใช้ปฏิกิริยา enantioselective reduction ของอนุพันธ์ ketone จากผลการทดลองพบว่าสามารถสังเคราะห์ไมทราไจนีนได้สำเร็จ ซึ่งสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของไมทราไจนีนได้ด้วย ^{1}H- NMR และ ^{13}C-NMR [14]

ในปี พ.ศ. 2541 Somsmon Chittrakarn และคณะ ทำการหาปริมาณ Mitragynine, Codeine, Caffeine, Chlorpheniramine และ Phenylephrine โดยใช้เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) ในตัวอย่างเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ผสมพืชกระท่อม (Kratom cocktail) โดยใช้คอลัมน์ Eclipse XDB-C8 พบว่ากราฟมาตรฐานมี correlation coefficient อยู่ระหว่าง 0.9957-0.9993 และมีปริมาณไมทราไจนีน, Codeine, Caffeine, Chlorpheniramine และ Phenylephrine เท่ากับ 90.021, 234.174, 73.986, 7.053, และ 1.486 mg/L ตามลำดับ [15]

ในปี พ.ศ. 2548 Chan, Pakiam และ Rahim ได้ทำการสกัดไมทราไจนีน จากน้ำต้มใบกระท่อมและทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) และ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ไมทราไจนีนมาตรฐานด้วย GC-FID และ GC-MS ปรากฏพีคของไมทราไจนีนที่เวลา (Retention time: RT) 16.5 นาที จึงใช้เป็นพีคอ้างอิงของไมทราไจนีนโดยมี mass spectrum คือ 186,199,214,383และ 397และเมื่อใช้วิเคราะห์สารสกัดจากใบกระท่อมและน้ำต้มใบกระท่อมพบว่าให้พีคที่เวลาเดียวกันและมีค่ามวลต่อประจุในลักษณะเหมือนกับของไมทราไจนีนมาตรฐาน [16]

ในปี พ.ศ. 2549 Kitajima และคณะ ได้ทำการทดลองในการแยกเนื้อเยื่อ ileum ของหนู guinea pig โดยเปรียบเทียบผลการทดลองกับ morphine พบว่า ไมทราไจนีน ให้ผล เช่นเดียวกับ morphine แต่น้อยกว่าประมาณ 4 เท่า แต่สาร 7-hydroxy mitragynine กลับมีความแรงมากกว่า morphine 10 เท่า โดยที่ ไมทราไจนีนจะมีผลต่อระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) และระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) โดยเฉพาะส่วน medulla นอกจากนี้ ไมทราไจนีน ยังมีฤทธิ์แก้ปวด(antinociceptive effect) โดยผ่าน opioid receptor ในสมอง [17]

ในปี พ.ศ. 2554 นราพงศ์ บุรมรา ได้ทำการหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากแหล่งต่างๆที่มีการปลูกในประเทศไทย โดยทำการสกัดไมทราไจนีนออกจากพืชกระท่อมด้วยคลอโรฟอร์ม ตรวจสอบสารที่สกัดได้ด้วย TLC นำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ^{13}C- NMR และ FTIR และนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในเทคนิค HPLC พบว่าปริมาณไมทราไจนีนที่สกัดได้อยู่ในช่วง 1.391 mg/g – 7.810 mg/g ของใบกระท่อมแห้ง [18]

ในปี พ.ศ. 2559 Kruegel ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของ ไมทราไจนีน โดยการทำ molecular docking เพื่อดูการจับกับ opioid receptor ที่แยกได้จากมนุษย์ ผลการทดลองพบว่า mitragynin และ 7-hydroxy mitragynine เป็น partial μ opioid agonist และเป็น competitive antagonist ต่อ δ และ κ opioid receptor ดังนั้น mitragynin และ 7-hydroxy mitragynin มีผลต่อระบบประสาทและมีฤทธิ์แก้ปวด ผ่านการจับกับ μ opioid receptor [19]

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดและการหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการสกัดไมทราไจนีนในใบกระท่อม ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดไมทราไจนีน

อุปกรณ์	แหล่งที่มา
Hot plate	SCILOGEX MS7-H550-S LED Digital 7x7
Vertical Nylon Filter 0.45 μm	Vertical Chromatography
Filter paper No.1	Whatman
Column : Supelco C18, 5 qm	water
NMR	Bruker 300 MHz
FTIR	Perkin Elmer รุ่น Spectrum 100
Centrifuge	Hettich รุ่น Universal 16

1.2 สารเคมี สำหรับใช้ในการสกัดไมทราไจนีนในใบกระท่อม ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดไมทราไจนีน

สารเคมี	**แหล่งที่มา**
Dist. Dichloromethane	Merck
Methanol	BDH
Hexane	Fluka
Acetone	Fluka
Ammonia	Merck
Sodium Hydroxide	Merck
Ammonium Hydroxide	Merck

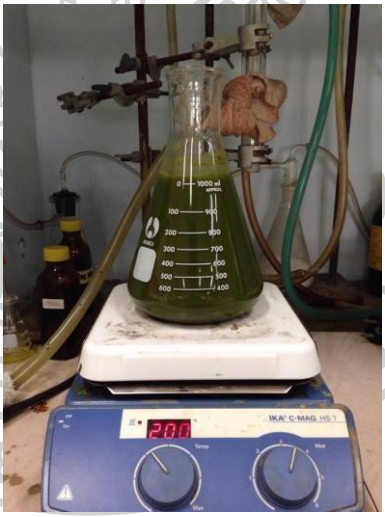
2. วิธีการทดลอง

2.1 การแยกไมทราไจนีน จากใบกระท่อมผ่านการสกัดด้วยเทคนิค column chromatography มีวิธีการสกัดดังนี้

2.1.1 นำใบกระท่อมที่ตากแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบดสมุนไพรและชั่งมา 10 กรัมใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 ml จนเป็นผงละเอียด ดังภาพที่ 11

ภาพที่ 11 ใบกระท่อมปั่นละเอียด (ผงใบกระท่อม)

2.1.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 ml แล้วนำไปต้มบน Hot plate ต้มจนสารละลายเดือดและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น จะได้สีของสารละลายตัวอย่างดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 สีของสารละลายเมื่อนำไปต้มจนเดือด

2.1.3 นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกกากใบกระท่อมออก

2.1.4 เติม Sodium hydroxide (NaOH) หรือ Ammonium hydroxide (NH_4OH) ครั้งละน้อยๆ เพื่อปรับสารละลายให้เป็นเบส จะได้สีของสารละลายคล้ายภาพที่ 13 (ทดสอบความเป็นเบส ด้วยกระดาษลิสมัต)

ภาพที่ 13 สีของสารละลายที่ถูกปรับสภาพให้เป็นเบส

2.1.5 นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) จำนวน 3 ครั้ง ด้วยอัตราส่วน ของสารละลายต่อ dichloromethane เท่ากับ 1:1

2.1.6 แยกชั้น dichloromethane ออกจากชั้นน้ำและเก็บชั้น dichloromethane ลงใน Erlenmeyer flask ที่แห้งและสะอาดในขั้นตอนการสกัดอาจจะต้องมีการเติมสารละลายเกลืออิ่มตัว (saturated salt solution) เพื่อกำจัด emulsion ดังตัวอย่างภาพที่ 14

ภาพที่ 14 การเกิด emulsion เมื่อเติมเบสมากเกินไป

2.1.7 นำชั้น dichloromethane มาเติม anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำ

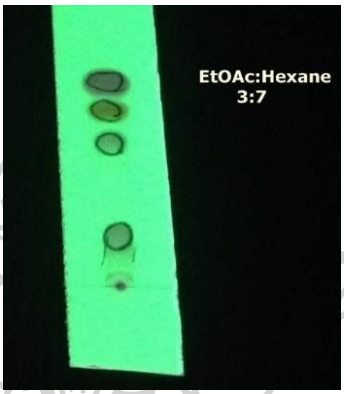
2.1.8 กรองสารละลายที่ได้ ใส่ใน round bottom flasks ที่แห้งและทราบน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไประเหย dichloromethane ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator

2.1.9 ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งและชั่งน้ำหนัก crude ที่ได้

2.2 การแยกไมทราไจนีนออกจากสารตัวอื่นด้วยเทคนิค Column chromatography

2.2.1 นำของผสมที่ต้องการแยกมาละลายด้วย dichloromethane ประมาณ 5-6 หยด

2.2.2 ทำ Thin layer chromatography (TLC) เพื่อหาตำแหน่งของ mitragynine และจำนวนสารอื่นๆ ทั้งหมดที่มีอยู่ในใบกระท่อมโดยใช้ mobile phase เป็น ethyl acetate : hexane ในอัตราส่วน 3:7 นำแผ่น TLC ไปส่องดูภายใต้แสง UV ในที่มืด จะเห็นตำแหน่งที่มีสารอยู่เป็นวงทึบแสง ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร

2.2.3 นำของผสมที่ได้ มาแยกด้วย column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น phase ที่อยู่กับที่ หรือเรียกว่า ตัวดูดซับ (absorbent) และ ethyl acetate: hexane ในอัตราส่วน 2:8 เป็น phase ที่เคลื่อนที่ หรือที่เรียกว่า ตัวทำละลาย eluting (eluting solvent) ดังภาพที่ 16

ภาพที่ 16 การแยกสารด้วยวิธี column chromatography

2.2.4 เก็บ fractions แต่ละส่วน พร้อมกับตรวจสอบแต่ละ fractions ด้วยเทคนิค TLC โดยสารที่มีขั้วต่ำจะเคลื่อนที่ลงมาก่อน ตามด้วยสารที่มีขั้วสูงขึ้น

2.2.5 หลังจากนั้นค่อยๆเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย eluting เป็น Ethyl acetate : hexane ในอัตราส่วน 3:7 และเก็บ fractions ต่อไปเรื่อยๆ จนกว่าสารจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์หมดทุกตัว

2.2.6. รวม fractions สารที่เป็นตัวเดียวกัน ใส่ใน round bottom flasks ที่แห้งและทราบน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลาย eluting ออก ด้วยเครื่อง rotary evaporator

2.2.7 ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งและชั่งน้ำหนักสารที่ได้

2.2.8 นำสารที่แยกออกมาได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) โดยใช้ $CDCl_3$ เป็น solvent และนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

2.3 การแยกไมทราไจนีนจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคผ่าน quick column chromatography ไม่ผ่านการสกัด

2.3.1 นำกระดาษกรองวางบน buchner funnel แล้วใช้ hexane ฉีดลงบนกระดาษกรองเพื่อให้ กระดาษแนบสนิทกับ buchner funnel หลังจากนั้นต่อท่อลดความดัน เพื่อลดความดันใน suction flask

2.3.2 เท silica gel plate ลงใน buchner funnel กดให้แน่นจนเกินครึ่งของ buchner funnel หรือประมาณ 3/4 ของ buchner funnel และเกลี่ยให้บริเวณผิวหน้าของ silica gel plate เรียบเท่ากัน

2.3.3 นำใบกระท่อมที่บดละเอียดแล้วประมาณ 20 กรัม เทลงบนผิวหน้าของ silica gel plate และเกลี่ยให้บริเวณผิวหน้าสม่ำเสมอกัน ตัวอย่างดังภาพที่ 17

ภาพที่ 17 การบรรจุ silica gel plate และใบกระท่อมลงใน buchner funnel

2.3.4 นำกระดาษกรองจำนวน 2 แผ่น วางลงบนผิวหน้าของผงกระท่อม เพื่อเป็นการป้องกันการทำลายผิวหน้า เมื่อมีการเทตัวทำละลายลงไป

2.3.5 ใส่ตัวทำละลายครั้งละ 100 ml โดยให้ vacuum pump ดูดตัวทำละลายออกจนหมด ซึ่งสารที่แยกได้จาก quick column chromatography จะถูกแบ่งเป็น fractions หลังจากนั้นจึงค่อยๆ เพิ่มขั้วของตัวทำลายไปเรื่อยๆ ตารางที่ 4

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 4 การชะด้วยตัวทำละลาย ด้วยวิธี quick column chromatography

Fractions	Solvent (ml)			
	Hexane	DCM	EtOAc	MeOH
1	100			
2	90	10		
3	80	20		
4	70	30		
5	60	40		
6	50	50		
7	40	60		
8	30	70		
9	20	80		
10	10	90		
11		100		
12		90	10	
13		80	20	
14		70	30	
15		60	40	
16		50	50	
17		40	60	
18		30	70	
19		20	80	
20		10	90	
21			100	
22			90	10
23			80	20
24			70	30
25			60	40
26			50	50
27			40	60

2.3.6 ทำการตรวจสอบสารที่แยกได้แต่ละ fractions ที่ได้ดังตัวอย่างภาพที่ 18 ด้วยเทคนิค TLC เพื่อรวม fractions ลงใน round bottom flasks ที่แห้งและทราบน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไประเหย solvent ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator

ภาพที่ 18 สารละลายที่เก็บได้แต่ละ fractions

2.3.7 ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง และชั่งน้ำหนักสารที่ได้

2.3.8 นำสารที่แยกได้จาก quick column chromatography มาเช็คด้วยเทคนิค TLC เพื่อหาตำแหน่ง ไมทราไจนีนโดยใช้ mobile phase เป็น ethyl acetate: hexane 3:7 แล้วนำแผ่น TLC ไปส่องดูภายใต้แสง UV

2.4 การทดสอบด้วย Ehrlich's reagent

2.4.1 ชั่ง p-Dimethyaminobenzald 1.0 กรัม เติม MeOH 10mL ค่อยๆ เติม p-Orthophosphoric acid ปริมาตร 10 mL ลงไป

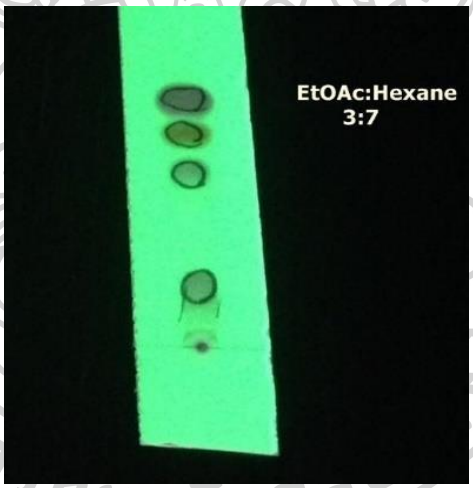
2.4.2 นำมาหยดใส่แผ่น TLC ในแต่ละ band ซึ่งหาก band เปลี่ยนจากสีเหลือง เป็นสีม่วงน้ำเงิน แสดงว่ามีสาร mitragynine

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการทดลองสกัดแยก mitragynine จากใบกระท่อมด้วย 2 วิธี คือ column chromatography ผ่านการสกัด และผ่าน quick column chromatography โดยไม่ผ่านการสกัด สามารถนำมาตรวจสอบ mitragynine ด้วยเทคนิค TLC จากนั้นทำการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของ mitragynine ที่สกัดได้ ด้วย Ehrlich reagent และแยกด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR และ FTIR

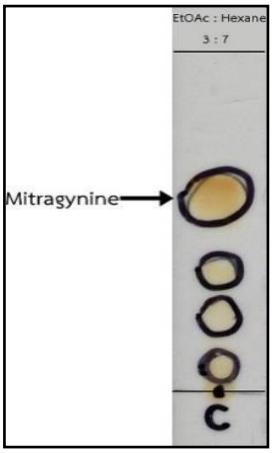
1. การสกัดและการแยก mitragynine จากใบกระท่อมด้วยเทคนิคผ่านการสกัด แล้วลง column chromatography

จากผลการทดลองพบว่า น้ำหนักของสารที่ได้จากการสกัด (crude) มีค่าเท่ากับ 0.2459 กรัม/10 กรัมของใบกระท่อมแห้ง (งานวิจัยของ นราพงศ์ บุรมรา,2554 สามารถสกัดไมทราไจนีนได้ในปริมาณ 2.553 – 3.380 กรัม/10กรัมของใบกระท่อมแห้ง) และเมื่อนำไปเช็ค TLC แล้วส่องดูด้วย UV ได้ผลดังภาพที่ 19



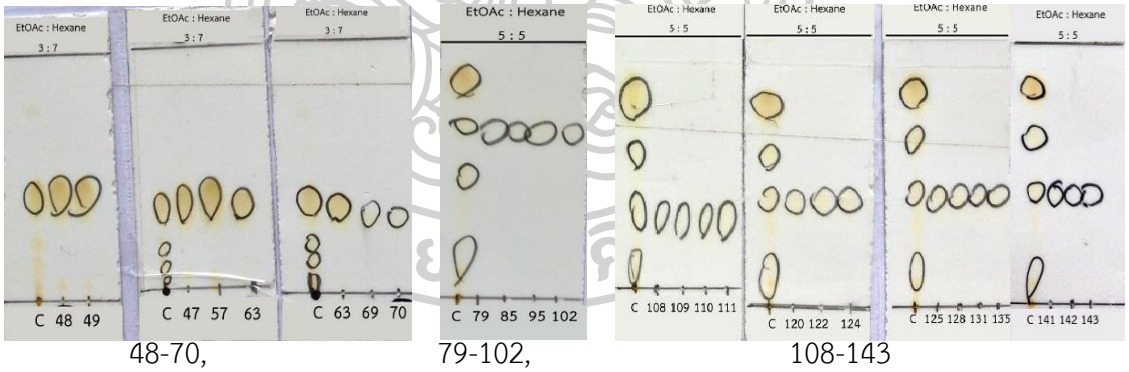
ภาพที่ 19 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร

จากภาพที่ 19 พบว่า สามารถทำการทดสอบด้วย Ehrlich’s reagent ซึ่งเป็น reagent ที่ใช้ทดสอบ Indole alkaliod ในที่นี้คือ ไมทราไจนีน ได้ผลดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 การแยกของ mitragynine บนแผ่น TLC

จากภาพที่ 20 พบว่า จุดที่มีการเปลี่ยนสี จากสีเหลืองเป็นสีม่วงอมน้ำเงิน เมื่อทำการสเปรย์เอนริช รีเอเจ้น คือ ไมทราไจนีน หลังจากนั้นนำ crude ที่ได้จากการสกัด มีน้ำหนักเท่ากับ 0.2459 กรัม นำไปเช็ค TLC เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการลงคอลัมน์ หลังจากนั้นนำ crude ที่ได้มาทำ column chromatography เพื่อแยกไมทราไจนีนและองค์ประกอบต่างๆ ออกจากกัน ซึ่งผลจากการทดลอง สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 fractions คือ 48-70, 79-102, 108-143 ดังแสดงในภาพที่ 21 และเมื่อนำแต่ละ fractions ไประเหย solvent ออก จะสามารถชั่งน้ำหนักได้ ดังแสดง ในตารางที่ 5



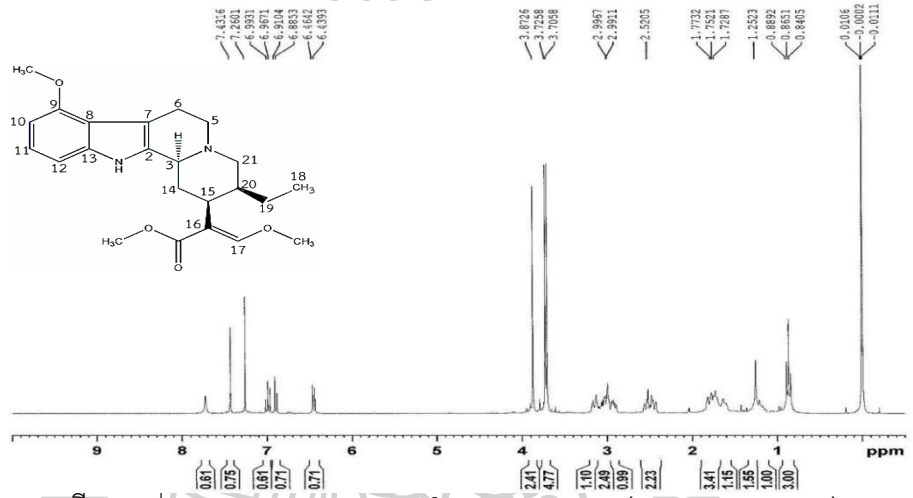
48-70, 79-102, 108-143

ภาพที่ 21 การแยกของสาร fractions 48-70, 79-102, และ 108-143 บนแผ่น TLC

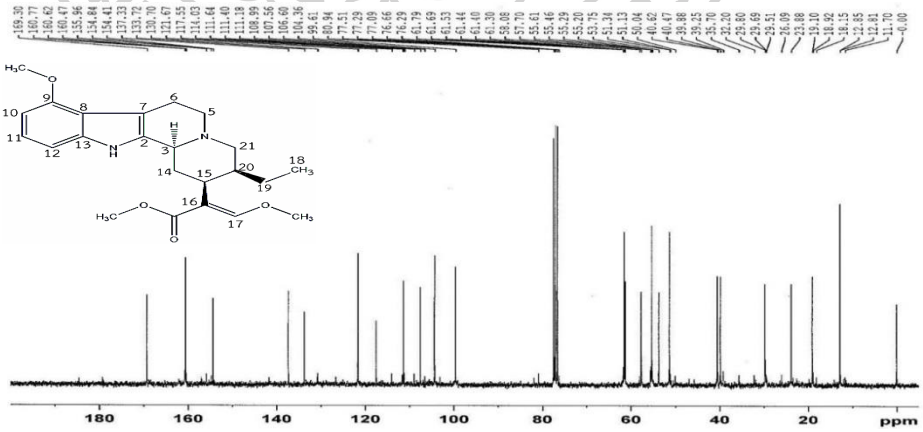
ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักของสารที่ได้จากการลงคอลัมน์

Fractions	น้ำหนัก (g)
48-70	0.0948
79-102	0.0030
108-143	0.0178

เมื่อนำสารที่คาดว่าน่าจะเป็น mitraginine (fractions 48-70) มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค H^1-NMR และ C^{13}-NMR ได้ผลดังนี้



ภาพที่ 22 H^1-NMR spectrum ของ fractions 48-70 (300MHz, $CDC1_3$)



ภาพที่ 23 ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 48-70

ตารางที่ 6 ผลการ Interpret ^{1}H-NMR spectrum ของ fractions 48-70

Reference	Experiment	Possible position
7.65 s	7.73 s (H1)	NH-
7.41 s	7.43 s (H1)	17
6.97 dd	6.98 t (H1)	11
6.88 d	6.87 d (H1)	12
6.43 d	6.44 d (H1)	10
3.86 s (3H)	3.89 s (3H)	OCH_3-9
3.71 s (3H)	3.73 s (3H)	OCH_3-17
3.69 (3H)	3.70 s (3H)	$COOCH_3$
3.69 s (3H)	3.70 s (3H)	$COOCH_3$
3.14 d	3.15 d (1H)	3
3.10 m	3.10 m (2H)	6
3.02 ddd	3.01 d (1H)	15
2.99 dd	2.99 m (2H)	21
2.51 m	2.50 m (2H)	5
1.78 m	1.78 m (2H)	14
1.66 m	1.65 m (1H)	20
1.18 m	1.25 m (2H)	19
0.85 t (3H)	0.89 t (3H)	18

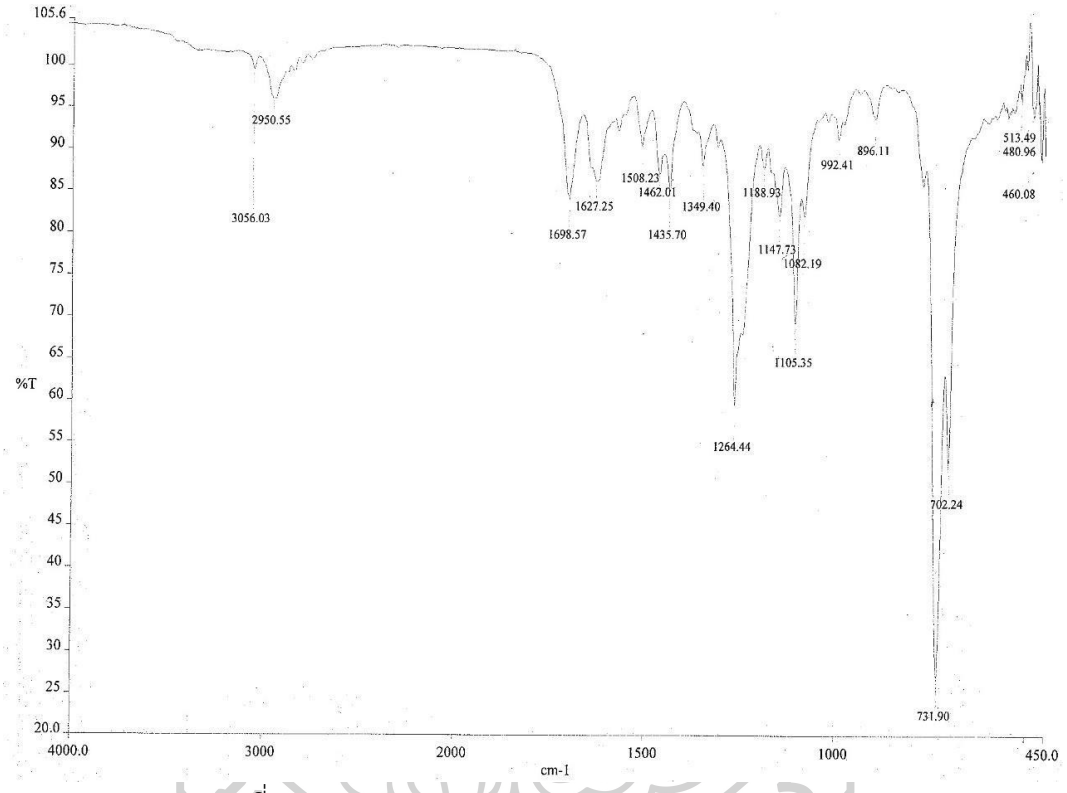
ตารางที่ 7 ผลการ Interpret ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 48-70

Reference	Experiment	Possible position
169.6	169.0	22
160.5	160.5	17
154.5	154.2	9
137.2	137.5	13
133.7	134.0	2
121.8	121.8	11
117.7	117.3	8
111.5	111.5	16
107.9	107.6	7
104.1	104.5	12
99.8	99.6	10
61.5	61.4	OCH_3-17
61.2	61.0	3
57.8	57.9	21
55.3	55.3	OCH_3-9
53.8	53.8	5
51.3	51.3	$COOCH_3$
40.7	40.7	20
39.9	39.9	15
30.0	29.9	14
23.9	23.9	6
19.1	19.1	19
12.9	12.9	18

จากค่า chemical shift พบว่ามีโปรตอน (^{1}H) และคาร์บอน (^{13}C) ที่ตำแหน่งต่างๆ ตรงกับโครงสร้างของไมทราไจนีน ซึ่งมีจำนวนและตำแหน่งของ ^{1}H และ ^{13}C สอดคล้องกับงาน วิจัยก่อนหน้านี้(ดูได้ที่ภาคผนวก) ดังนั้นผลของ ^{1}H-NMR และ^{13}C-NMR spectrum ที่แสดงข้างต้น สามารถ

ยืนยันได้ว่า fractions 48-70 ที่ได้จากการสกัดและการแยกด้วยเทคนิค column chromatography เป็น mitragynine

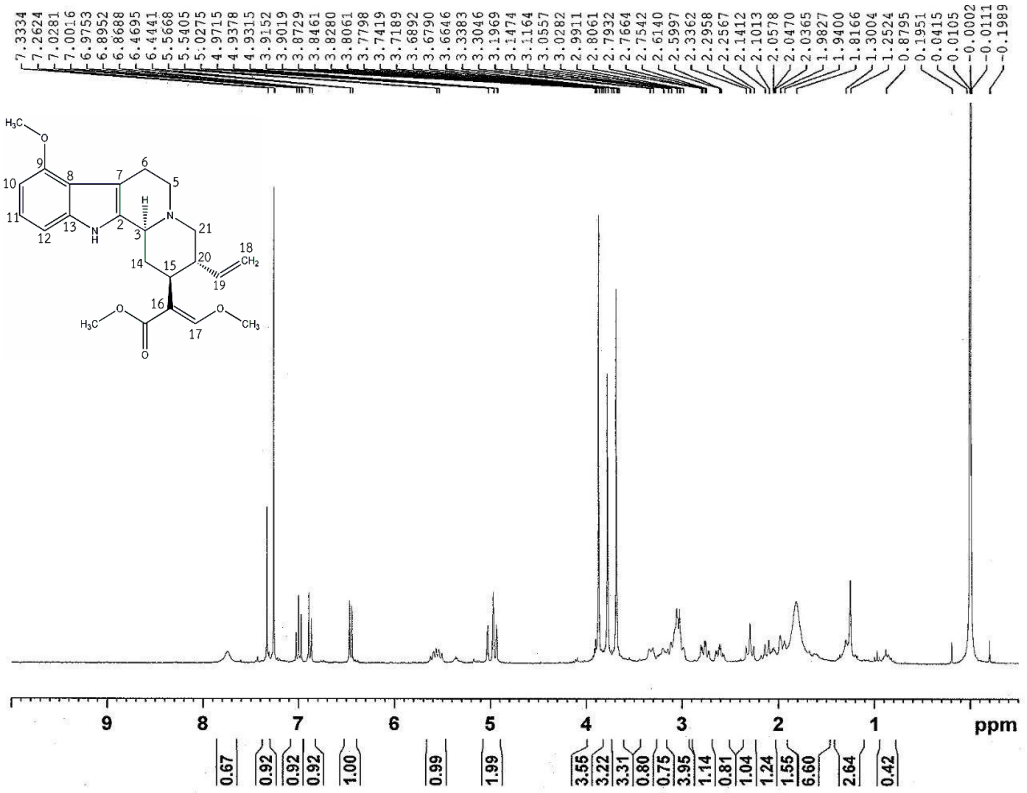
การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ mitragynine (fractions 48-70) ที่แยกได้จากใบกระท่อมด้วยเทคนิค Fourier Transform spectroscopy (FTIR)



ภาพที่ 24 FTIR spectrum ของ mitragynine (fractions 48-70)

จากภาพที่ 24 เป็น FTIR spectrum ของ mitragynine (fractions 48-70) พบว่าปรากฏพีค stretching และ bending ของพันธะ C-H ที่ประมาณ 2950 cm^{-1} พีคของพันธะ C=C ของวง aromatic ปรากฏพีคที่ประมาณ 1435-1508 cm^{-1} ปรากฏพีค stretching ของ carbonyl group ที่ 1698 cm^{-1} พีคของ C-O จากพันธะของ ester ปรากฏพีคที่ 1264 cm^{-1} และพีคของ N-H ปรากฏพีคที่มากกว่า 3000 cm^{-1} ซึ่งจากค่าของ frequency ที่แสดงข้างต้นนี้ ตรงกับหมู่ฟังก์ชันของ mitragynine จึงสามารถยืนยันได้ว่า fractions 48-70 ที่แยกได้จากใบกระท่อมโดยการสกัดและการแยกด้วยด้วยเทคนิค column chromatography คือ mitragynine

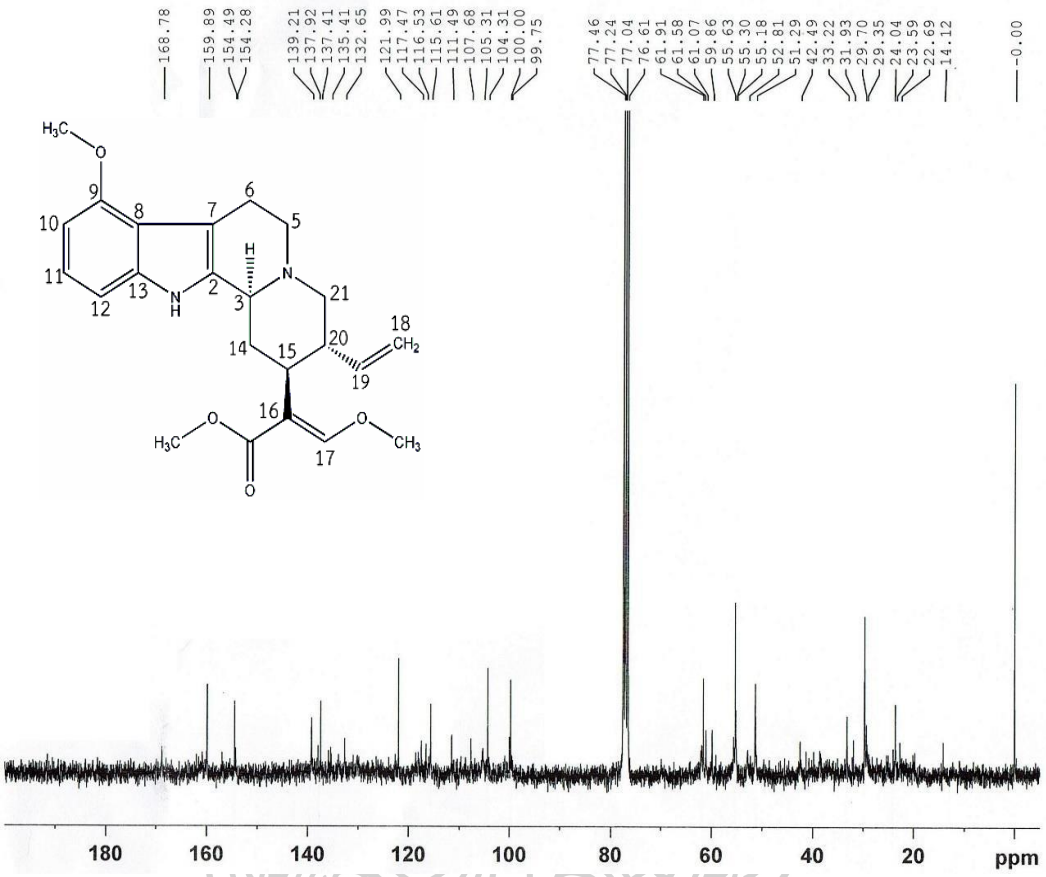
และเมื่อนำ fractions 79-102 จากเทคนิค column chromatography ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ได้ผลดังนี้



ภาพที่ 25 ^{1}H-NMR spectrum ของ fraction 79-102 (300 MHz, $CDC1_3$)

ตารางที่ 8 ผลการ Interpret ^{1}H-NMR spectrum ของ fractions 79-102

^{1}H-NMR Reference	^{1}H-NMR Experiment	Possible position
7.66 s	7.72 s (1H)	NH-
7.31 s	7.30 s (1H)	17
6.98 d	7.00 t (1H)	11
6.86 d	d 6.89(1H)	12
6.44 d	6.46 d (1H)	10
5.56 m	5.57 m (1H)	19
4.98 dd	4.98 m (2H)	18
3.85 s (3H)	3.88 s (3H)	OCH_3-9
3.76 s (3H)	3.79 s (3H)	OCH_3-17
3.67 s (3H)	3.69 s (3H)	$COOCH_3$
3.27 d	3.30 d (1H)	3
3.17 m	3.18 m (2H)	6
3.06 m 2.55 m	3.02 m (1H) 2.61 m (1H)	5
3.03 m	3.03 m (1H)	20
3.01 m	3.01 m (1H)	21
3.01 m	3.01 m (2H)	15
2.74 ddd	2.57 m (1H)	14
2.10 m 1.94 m	2.08 m (1H) 1.95 m (1H)	



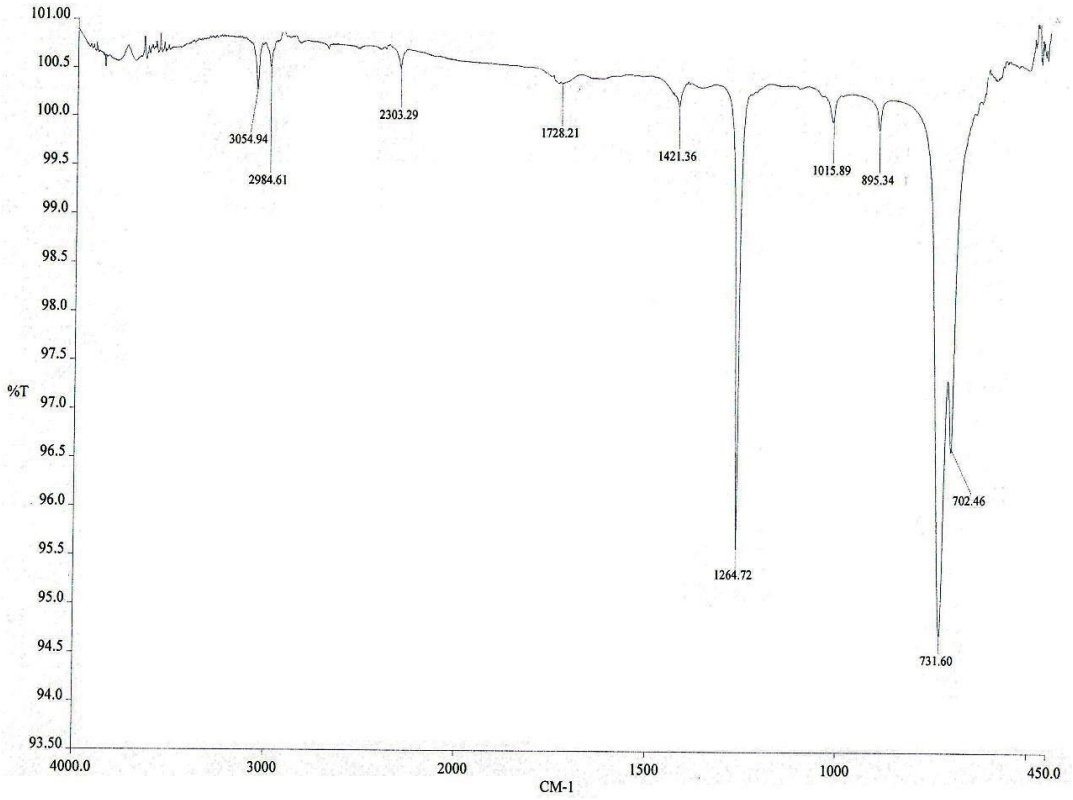
ภาพที่ 26 ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 79-102

ตารางที่ 9 ผลการ Interpret ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 79-102

Reference	Experiment	Possible Position
172.2	169.0	22
159.8	160.0	17
154.5	154.5	9
139.1	139.1	19
137.3	137.3	13
133.7	133.0	2
121.9	122.0	11
117.5	117.0	8
115.5	115.0	18
111.5	111.5	16
107.9	107.9	7
104.2	104.2	12
99.8	99.8	10
61.6	61.6	OCH_3-17
61.3	61.3	21
60.0	59.9	3
55.3	55.0	OCH_3-9
53.2	53.2	5
51.3	51.0	$COOCH_3$
42.9	42.9	20
38.5	38.5	15
33.4	33.4	14
23.7	24.0	6

จากค่า chemical shift พบว่ามีจำนวนและตำแหน่งของ H^1 และ C^{13} ที่ตำแหน่งต่างๆ ตรงกับโครงสร้าง paynantheine ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ดูได้ที่ภาคผนวก) ดังนั้น ผลของ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR spectrum ที่แสดงข้างต้นนี้ สามารถยืนยันได้ว่า fractions 79-102 ที่ได้จากการสกัดและการแยกด้วยเทคนิค column chromatography เป็น paynantheine

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ paynantheine (fractions 79-102) ที่แยกได้จากใบกระท่อม ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)



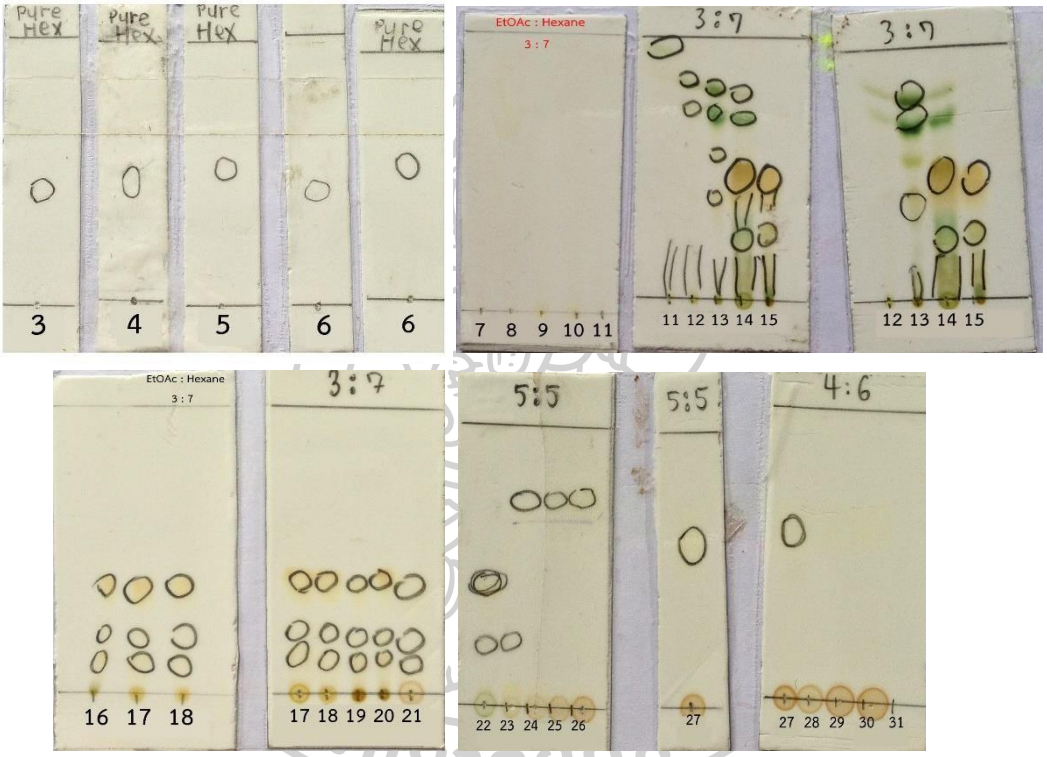
ภาพที่ 27 FTIR spectrum ของ fractions 79-102

จากภาพที่ 27 เป็น FTIR spectrum ของ paynantheine (fractions 79-102) พบว่า ปรากฏพีค stretching และ bending ของพันธะ C-H ที่ประมาณ 2984 cm^{-1} พีคของพันธะ C=C ของวง aromatic ปรากฏพีคที่ ประมาณ 1475-1600 cm^{-1} และปรากฏพีค stretching ของ carbonyl group ที่ 1728 cm^{-1} พีคของ C-O จากพันธะของ ester ปรากฏพีคที่ 1264 cm^{-1} และพีคของ N-H ปรากฏพีคที่มากกว่า 3000 cm^{-1} ซึ่งจากค่า frequency ที่แสดงข้างต้นนี้ตรงกับหมู่ฟังก์ชันของ paynantheine จึงสามารถยืนยันได้ว่า fractions 79-102 ที่ได้จากการสกัดและการแยกด้วยเทคนิค column chromatography คือ paynantheine

ส่วน fractions 108-143 ยังไม่ค่อยบริสุทธิ์ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ต่อ

4.2 การแยก mitragynine จากใบกระท่อมด้วย เทคนิค quick column chromatography ไม่ผ่านการสกัด

ผลการทำ quick column chromatography สามารถเก็บ fractions ได้ทั้งหมด 31 fractions (ดังแสดงในตารางที่ 10) หลังจากนั้นนำ fractions ทั้งหมดมาเช็ค TLC เพื่อหาตำแหน่งของไมทราไจนีนและจำนวนสารอื่นๆ ทั้งหมดที่เป็นตัวเดียวกัน ซึ่งผลจากการเช็ค TLC (ดังแสดงในภาพที่ 28) สามารถรวมสารได้ทั้งหมด 4 fractions คือ 3-6, 13-15, 16-21 และ 24-26 หลังจากนั้นนำไประเหย solvent ออกและนำสารที่ได้ ไปชั่งน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 10

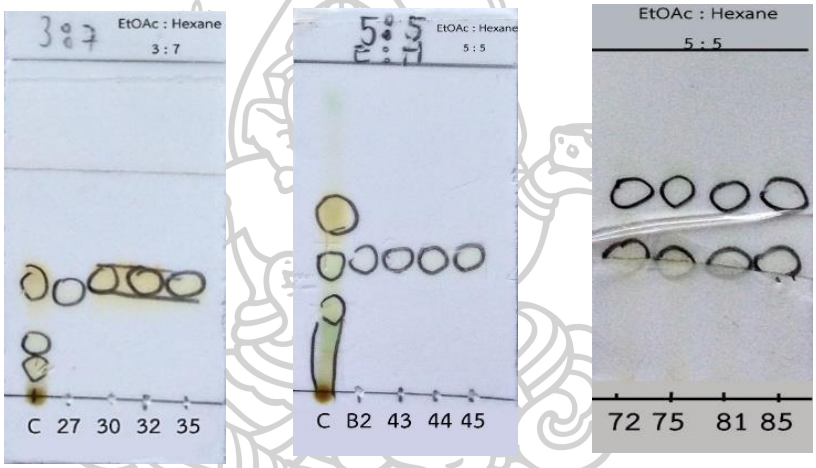


ภาพที่ 28 การแยกของสารแต่ละ fractions บนแผ่น TLC

ตารางที่ 10 แสดงน้ำหนักของ fractions ที่ได้จากการลงคอลัมน์

Fractions	น้ำหนัก (g)
3 - 6	0.1025
13 -15	0.5047
16 - 21	0.2676
24 - 26	0.2165

หลังจากนั้น นำ fractions ที่แยกได้จาก quick column chromatography มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค column chromatography ซึ่งในที่นี้เลือก fractions ที่ 16-21 มาลงคอลัมน์ (crude) เนื่องจากคาดว่าน่าจะมีไมทราไจนีนอยู่ โดยน้ำหนักของ crude ที่ใช้ในการลงคอลัมน์เท่ากับ 0.0956 กรัม และ condition ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย คือ EtOAc : Hexane อัตราส่วน 3 : 7 เก็บ fractions ไปเรื่อยๆ จนกว่าสารจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ทั้งหมด ซึ่งผลจากการเช็ค TLC เทียบกับ crude พบว่าสามารถรวมสารได้ตาม fractions คือ 27-35, 43-45, 72-85 และ 86-105 ดังแสดงในภาพที่ 29 และเมื่อนำแต่ละ fractions ไประเหย solvent ออก จะสามารถชั่งน้ำหนักได้ดังแสดงในตารางที่ 11



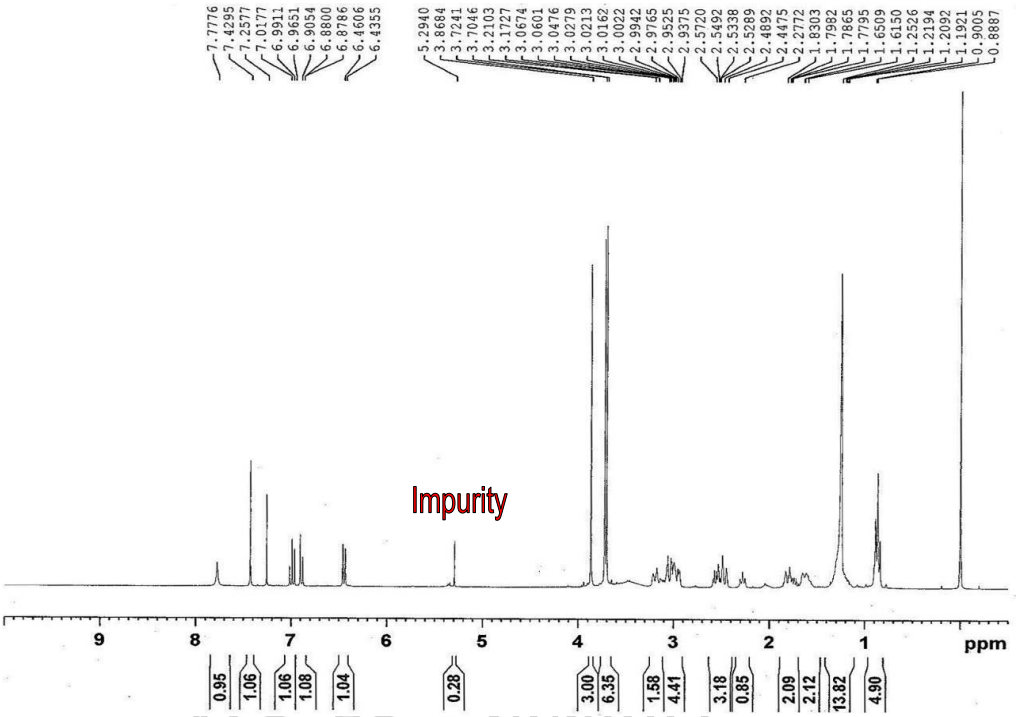
ภาพที่ 29 การแยกของสาร fractions 27-35, 43-45, และ 72-85 บนแผ่น TLC

ตารางที่ 11 แสดงน้ำหนักของ fractions ที่ได้จากการลงคอลัมน์

Fractions	น้ำหนัก (g)
27 - 35	0.1025
43 -45	0.5047
72 - 85	0.2676
86 - 105	0.2165

จากภาพที่ 29 จะเห็นว่า fractions ที่ 43-45, 72-85 และ 86-105 ไม่บริสุทธิ์ จึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) ได้ แต่ fractions ที่

27-35 คาดว่าน่าจะเป็นไมทราไจนีน จึงนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย เทคนิค ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ได้ผลดังนี้

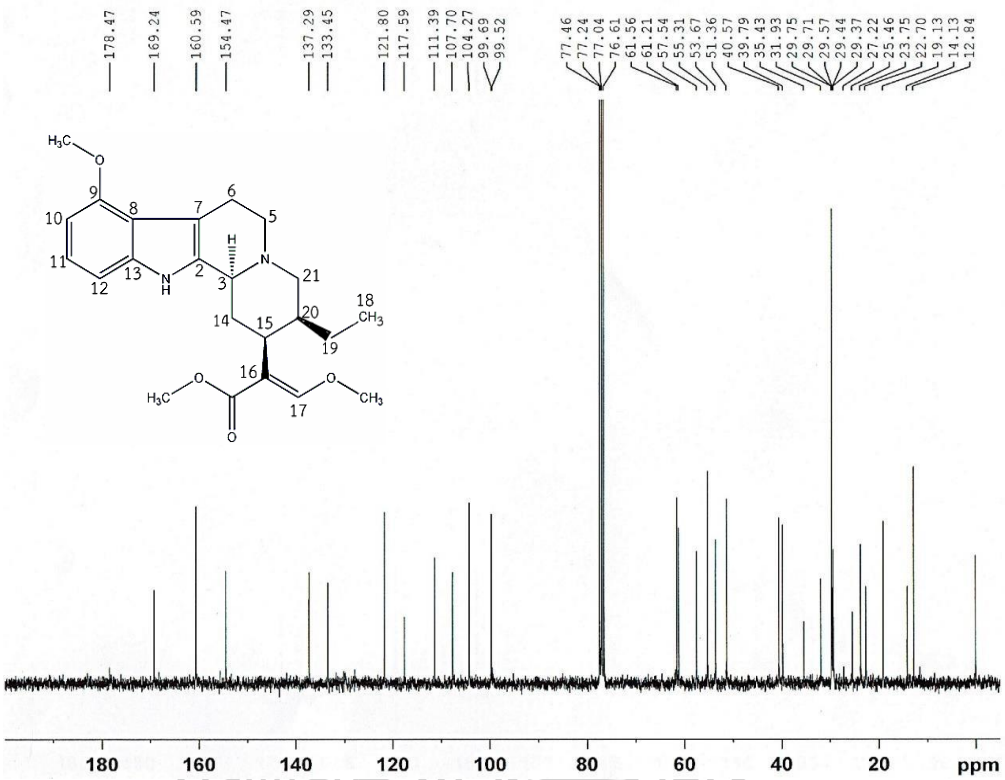


ภาพที่ 30 ^{1}H-NMR spectral ของ fractions 27-35 (300 MHz, $CDCl_3$)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 12 ผลการ Interpret ^{1}H-NMR spectrum ของ fractions 27-35

Reference	Experiment	Possible position
7.65 s	3.79 s (1H)	NH-
7.41 s	7.43 s (1H)	17
6.97 dd	6.97 s (1H)	11
6.88 dd	6.89 s (1H)	12
6.43 dd	6.45 d (1H)	10
3.86 s (3H)	3.88 s (3H)	OCH_3-9
3.71 s (3H)	3.71 s (3H)	OCH_3-17
3.69 s (3H)	3.70 s (3H)	$COOCH_3$
3.14 d	3.16 d (1H)	3
3.10 m	3.05 m (2H)	6
3.02 ddd	2.98 d (1H)	15
2.99 dd	2.99 m (2H)	21
2.51 m	2.51 m (2H)	5
1.78 m	1.78 m (2H)	14
1.66 m	1.61 m (1H)	20
1.18 m	1.25 s (2H)	19
0.85 t	0.87 t (3H)	18



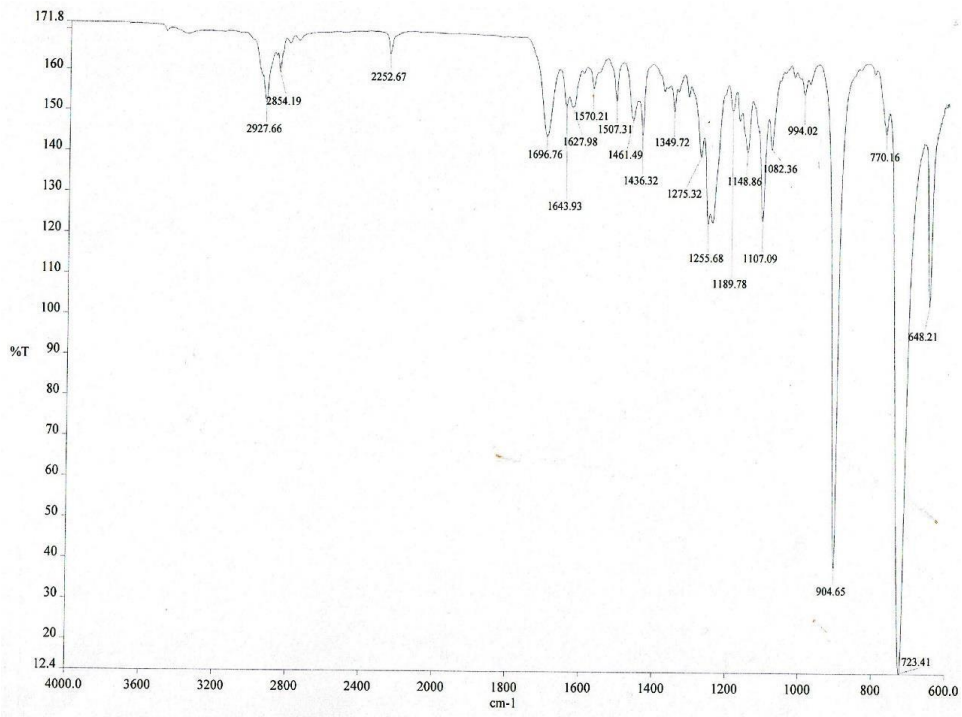
ภาพที่ 31 ^{13}C-NMR spectrum ของ fractions 27-35

ตารางที่ 13 ผลการ Interpret ^{13}C-NMR ของ fractions 27-35

Reference	Experiment	Possible position
169.6	169.2	22
160.5	160.5	17
154.5	154.5	9
137.2	137.2	13
133.7	133.5	2
121.8	121.8	11
117.7	117.7	8
111.5	111.3	16
107.9	107.7	7
104.1	104.3	12
99.8	99.8	10
61.5	61.5	OCH_3-17
61.2	61.2	3
57.8	57.5	21
55.3	55.3	OCH_3-9
53.8	53.8	5
51.3	51.3	$COOCH_3$
40.7	40.7	20
39.9	39.9	15
30.0	29.9	14
23.9	23.9	6
19.1	19.1	19
12.9	12.9	18

จากค่า chemical shift พบว่ามีจำนวนและตำแหน่งของ ^{1}H และ ^{13}C ที่ตำแหน่งต่างๆ ตรงกับโครงสร้างของไมทราไจนีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ดูได้ที่ภาคผนวก) ดังนั้นผลของ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR spectrum ที่แสดงข้างต้นนี้ สามารถยืนยันได้ว่า fractions 27-35 ที่ได้จากการทำ quick column chromatography ไม่ผ่านการสกัด เป็นไมทราไจนีน

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของไมทราไจนีน (fractions 27-35) ที่ได้จากการทำ quick column chromatography ด้วยเทคนิค fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)



ภาพที่ 32 FTIR spectrum ของไมทราไจนีน (fractions 27-35)

จากภาพที่ 32 เป็น FTIR spectrum ของ ไมทราไจนีน (fractions 27-35) พบว่าปรากฏพีค stretching และ bending ของพันธะ C-H ที่ประมาณ 2927 cm^{-1} พีคของพันธะ C=C ของวง aromatic ปรากฏพีคที่ประมาณ 1436-1570 cm^{-1} และปรากฏพีค stretching ของ carbonyl group ที่ 1696 cm^{-1} พีคของ C-O จากพันธะของ ester ปรากฏพีคที่ 1275 cm^{-1} และพีคของ N-H ปรากฏพีคที่มากกว่า 3000 cm^{-1} ซึ่งจากค่า frequency ที่แสดงข้างต้นนี้ ตรงกับหมู่ฟังก์ชันของไมทราไจนีน จึงสามารถยืนยันได้ว่า fractions 27-35 ที่แยกได้จากใบกระท่อมโดยการทำ quick column chromatography ไม่ผ่านการสกัด ก่อนลง column chromatography

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

จากการทดลองแยก mitragynine ออกจากใบกระท่อมด้วย 2 วิธีที่แตกต่างกัน คือ การสกัดเพื่อนำ crude ที่ได้มาแยกด้วยวิธี column chromatography และวิธี quick column chromatography ไม่ผ่านการสกัด พบว่า วิธี quick column chromatography เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการแยกตัวอย่างที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน เนื่องจากวิธีนี้สามารถแยกสารได้อย่างรวดเร็วและได้ครั้งละปริมาณมาก แต่ใบของพืชกระท่อมเป็นตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนมาก วิธี quick column chromatography จึงแยก mitragynine ออกจากใบกระท่อมได้เพียง 0.2687% และสามารถแยกสารอัลคาลอยด์ตัวอื่นที่เป็นองค์ประกอบของใบกระท่อมได้อีกด้วย เช่น paynantheine เป็นต้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดเพื่อนำ crude ที่ได้ มาแยกด้วยวิธี column chromatography วิธีนี้จะสามารถแยก mitragynine ออกจากใบกระท่อมได้ปริมาณมากกว่าวิธี quick column chromatography หรือคิดเป็น 0.948 % แต่เนื่องจากวิธีนี้ต้องทำการสกัดเพื่อลดการปนเปื้อนที่มีในองค์ประกอบของพืชกระท่อม และกำจัดส่วนที่ละลายออกจากส่วนที่ไม่ละลาย โดยอาศัยความสามารถในการละลายของตัวถูกละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ไม่ผสมกัน ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องใช้เวลาเพื่อทำให้เกิดการแยกที่สมบูรณ์ จึงอาจจะทำให้สารสกัดของใบกระท่อมมีโอกาสเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและสลายตัว หลังจากนั้นจะต้องนำสารสกัดที่ได้มาเติม sodium hydroxide (NaOH) หรือ ammonium hydroxide (NH_4OH) เพื่อปรับให้สารละลายเป็นด่าง ในขั้นตอนนี้ ถ้าเติมเบสมากเกินไปจะทำให้สารสกัดเกิดความร้อน และ mitragynine มีโอกาสสลายตัว นอกจากนี้การแยก mitragynine ให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี column chromatography มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการแยก เช่น ความเป็นขั้วของตัวทำละลาย ขนาดของคอลัมน์ อัตราการไหลของตัวทำละลาย การเตรียมคอลัมน์ และการ load สารตัวอย่าง เป็นต้น ดังนั้นจากสาเหตุที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้ เป็นผลทำให้ปริมาณ mitragynine ที่สกัดและแยกด้วยวิธี column chromatography มีปริมาณไม่มาก

ตารางที่ 14 สรุปปริมาณ mitragynine ที่แยกได้จากตัวอย่างใบกระท่อมด้วย 2 วิธีที่ต่างกัน

Methods	Column chromatography	Quick column chromatography
ปริมาณ mitragynine (mg)	0.0948	0.0192
%yield	0.948 %	0.2687%

จากการสกัดไมทราไจนีนด้วยสองวิธีคือ วิธีการสกัดแล้วนำมาลง column chromatography และวิธี quick column chromatography ไม่ผ่านการสกัด แล้วนำมาลง column chromatography ได้ปริมาณไมทราไจนีนเท่ากับ 0.0948 mg/g และ 0.0192 mg/g ในผงใบกระท่อมแห้ง 10 กรัม ตามลำดับ เปรียบเทียบกับวิธีการสกัดไมทราไจนีนโดยใช้คลอโรฟอร์มในงานวิจัยของ นราพงศ์ บุรมรา [14] พบว่าได้ปริมาณไมทราไจนีนอยู่ในช่วง 1.391 mg/g – 7.810 mg/g ในผงใบกระท่อมแห้ง 10 กรัม จากการเปรียบเทียบพบว่า วิธีการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จะได้ไมทราไจนีนในปริมาณที่สูงกว่า ใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่า มีต้นทุนในการสกัดที่ต่ำกว่าวิธีการสกัดผ่าน column chromatography และวิธี quick column chromatography ไม่ผ่านการสกัด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

1. ศิริพร หมาดหล้า และ พจนพร ไกรดิษฐ์, สารอัลคาลอยด์จากพืช และกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลในการต้านมะเร็ง. สงขลานครินทร์เวชสาร, 2559. 35(1): หน้า. 83-94.
2. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, ก. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ กระท่อม (*Kratom)*. 2561 15 สิงหาคม 2561]; เข้าถึงจาก: http://narcotic.fda.moph.go.th/welcome/?p=2539.
3. Information, N.C.f.B. *Mitragynine*. 2561 4 ส.ค. 2561]; เข้าถึงจาก: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mitragynine#section=Pharmacol%20ogy-and-Biochemistry.
4. สำนักงานกิจการยุติธรรม กระทรวงยุติธรรม, สถานการณ์ยาเสพติดต่อกระบวนการยุติธรรมไทย. 2557, ศูนย์พัฒนาข้อมูลกระบวนการยุติธรรม สำนักงานกิจการยุติธรรม: กรุงเทพฯ.
5. Orio, L., Alexandru, L., Cravotto, G., Mantegna, S. and Barge, A. , *UAE, MAE, SFE-CO*2 *and classical methods for extraction of Mitragyna speciosa leaves. Ultrasonics Sonochemistry.* Elsevier, 2555. 19: หน้า. 591-595.
6. จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล. พืชกระท่อม (*Kratom)* 2558 15 สิงหาคม 2561]; เข้าถึงจาก: file:///C:/Users/acer/Downloads/Kratom%20CPE%20juraithip%2015%20March%202017---%20(2).pdf.
7. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, ภ.ค., โครมาโทกราฟฟี (*Chromatography)*. 2553.
8. โพธิ์ศรี, ธ., นิวเคลียแมกเนติก เรโซแนนซ์ สเปกโตรสโคปี 2540. หน้า. 67-70.
9. อนุชิต โอฬาร, ว., เทคนิค *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)* 2546, ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ: กรุงเทพมหานคร.
10. Field, E., *Mitragynine and mitraversine, two new alkaloids from species of Mitragyne.* Journal of the Chemical Society, 2464. 119: หน้า. 887–891.
11. KS, G., *Observations on the pharmacology of mitragynine.* J Pharmacol Expr Ther, 2475. 46(3): หน้า. 251-271.
12. Joshi, B., Raymond-Hamet, และ W.I. Taylor, *Structure of mitragynine (9-methoxycorynantheidine).* Chemistry and Industry, 2506. 14: หน้า. 573.
13. นิวัติ แก้วประดับ แอลคาลอยด์จากใบสดของต้นกระท่อม, in เภสัชวิทยา. 2533, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
14. Hiromitsu T.et al., *The First Total Synthesis Of (-)-Mitragynine, an analgesic indole alkaloid in Mitragynine speciose.* Tetrahedral letters 36, 2538. 51: หน้า. 9337-9340.

15. Somsmorn C.et al., *Quantitative analysis of mitragynine, codeine, caffeine, chlorpheniramine and phenylephrine in a kratom (Mitragyna speciosa Korth.) cocktail using high-performance liquid chromatography.* Forensic Science Intrenational, 2541. 217: หน้า. 81-86.

16. Chan, และคณะ., *Psychoactive plant abuse: the identification of mitragynine in ketum and in ketum preparations.* Bulletin of Narcotics, 2548. 57(1-2): หน้า. 249-256.

17. Kitajima, M., และคณะ., *A new indole alkaloid, 7-hydroxyspeciociliatine, from the fruits of Malaysian Mitragyna speciosa and its opioid agonistic activity.* Journal of Natural Medicines, 2548. 60(1): หน้า. 28-35.

18. นราพงศ์ บุรมรา, การหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากแหล่งต่างๆ ใน ประเทศไทย, in นิติวิทยาศาสตร์. 2554, มหาวิทยาลัยศิลปากร กรุงเทพฯ.

19. Kruegel, A.C., Gassaway, M.M., Kapoor, A., Varadi, 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 of opioid receptor modulators.* Journal of the American Chemical Society, 2559. 138(21): หน้า. 6754–6764.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายโอภาส กุรีวรรณ์
วัน เดือน ปี เกิด	26 เมษายน 2522
สถานที่เกิด	อำเภอเบญจลักษ์ จังหวัดศรีสะเกษ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ที่อยู่ปัจจุบัน	321/27 บ้านเอื้ออาทรรามอินทรา 117 ตึก 14 ชั้น 4 ถนนเจริญพัฒนา แขวงบางชัน เขตคลองสามวา กทม. ๅจฤจ