การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนเพื่องานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากกระท่อม

โดย
นายกิตติศักดิ์ เหมือนดาว

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

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนเพื่องานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากกระท่อม

โดย
นายกิตติศักดิ์ เหมือนดาว

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

COMPARATIVE EXTRACTION METHOD OF MITRAGYNINE FOR FORENSIC SCIENCEAND THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTY OF *MITRAGYNA SPECIOSA* KORTH.

By

MR. Kittisak MUANDAO

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (FORENSIC SCIENCE)

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2018

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนเพื่องานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากกระท่อม
โดย	กิตติศักดิ์ เหมือนดาว
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

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

พิจารณาเห็นชอบโดย

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

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

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

60312315 : นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : สารสกัดหยาบ, ไมทราไจนีน, ต้านแบคทีเรีย

นาย กิตติศักดิ์ เหมือนดาว: การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนเพื่องานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากกระท่อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ดร. มูฮำหมัด นิยมเดชา

เปรียบเทียบวิธีการสกัด และการแยกสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม ในเชิงปริมาณและความรวดเร็วของวิธีการสกัดด้วยวิธีที่นิยมใช้ในสกัดสารอัลคาลอยด์ทั่วไป (Yubin et al, 2014) และ วิธีที่ดัดแปลงเพิ่มเติมคือ การเพิ่มอุณหภูมิ เวลา และเครื่อง Ultra sonicator ในขั้นตอนการสกัดด้วย acetic acid จากผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม การใช้วิธีเพิ่มอุณหภูมิ เวลา รวมถึงเพิ่มการใช้ เครื่อง Ultra sonicator มีผลทำให้สามารถสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมได้จำนวนเพิ่มมากยิ่งขึ้น ซึ่งแนวโน้มการสกัดได้เพิ่มขึ้นของ %Yield ของสารไมทราไจนีน เพิ่มขึ้นตามเวลา และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น รวมถึงการใช้ เครื่องUltra sonicator ซึ่งวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากกระท่อมที่ดีที่สุดคือ การสกัดด้วยวิธีการใช้ acetic acid ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 30 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนมากที่สุดได้ %yield = 2.6910±0.1287 % แต่ ที่เวลา 30 นาที ในอุณหภูมิห้อง น่าจะดีที่สุด สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้ %yield = 1.4200±0.0679 % ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากพืชกระท่อม จากการสกัดแยกตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทธิล อะซีเตท, เอทานอล, กรดอะซีติก ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และสารไมทราไจนีนที่สามารถแยกได้จากใบพืชกระท่อม ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียโดยสนใจทำการศึกษาแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ สตาฟิโลคอคคัส ออเรียส และ เอสเชอริเชีย โคไล โดยใช้วิธี disk diffusion techniques และ Minimum inhibitory concentration พบว่า สารสกัดจากใบพืชกระท่อมมีฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ได้ ซึ่งในสารไมทราไจนีน สามารถต้านแบคทีเรีย *S.aureus* มี Inhibition zone 4.35 ± 0.68 มิลลิเมตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านแบคทีเรียได้อยู่ที่ 6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบที่สกัดโดย 50 เปอร์เซ็นต์ Acetic acid มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ได้ทั้ง 2 ชนิด โดยมี Inhibition zone 5.52 ± 0.44 และ 4.65 ± 1.02 มิลลิเมตร โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านต้านแบคทีเรียได้อยู่ที่ 6 และ 9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

60312315 : Major (FORENSIC SCIENCE)
Keyword : Crude Extracts, Mitragynine, Antibacterial

MR. KITTISAK MUANDAO : COMPARATIVE EXTRACTION METHOD OF MITRAGYNINE FOR FORENSIC SCIENCEAND THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTY OF *MITRAGYNA SPECIOSA* KORTH. THESIS ADVISOR : MUHAMMAD NIYOMDECHA

This experiment studied and compared the extracting method and separating of Mitragynine from Katom in a quantitative and speed of the extraction method. The method commonly used in the general extraction of alkaloids and the way that more modifications.The use of heat and Ultra sonicater in the extraction step with acitic acid.The results showed that the method of extraction Mitragynine from Katom. The increase heating and time, as well as the increase in the use of Ultra sonicater, resulted in an increase in the extraction of Mitragynine. The tendency extraction was increased by % Yield of Mitragynine Increased by of increase the time, temperature and use of Ultra sonicater. The best to extraction Mitragynine is acetic acid with heating at 80 ° C for 30 min resulted in the highest yield of Mitragynine. % Yield = 2.6910 ± 0.1287%. Their Antibacterial Activity of Mitragyna Speciosa Korth. Crude extracts from hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and 50% acetic acid were used as the solvents extraction and purified mitragynine from the extract of Kratom showed antibacterial activity. Inhibit the growth of two species of Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* tested by using disk diffusion technique and Minimum inhibitory concentration. Result found that purified mitragynine show the ability to inhibit bacterial growth especially *S. aureus* with inhibition zone 4.35±0.68 mm. in length and have the minimal inhibitory concentration (MIC) at 6 mg/ml. While crude extract with 50% acetic acid demonstrates the inhibition zone 5.52±0.44 mm. and 4.65±1.02 mm. in length and the MIC is 6 mg/ml. and 9 mg/ml. toward *S. aureus* and *E. coli* respectively. But crude extracts hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol has no inhibited the growth of all two species.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์สำเร็จเสร็จสิ้นกิจ วิจัยฤทธิ์กระท่อมตั้งใจหมาย
ทั้งสกัดแยกสารอีกมากมาย ศาสตร์ทั้งหลายล้วนสำเร็จเสร็จสมปอง
ขอขอบคุณอาจารย์ มูฮำหมัด อาจารย์ศิริรัตน์ท่านทั้งสอง
อีกอาจารย์สุชารัตน์ช่วยคัดกรอง ความถูกต้องเนื้อหาวิชาการ
ป้ายุพินและพี่จิตติมา อาจารย์อภิตาช่วยประสาน
ยามฉันทุกข์ร้อนใจในการงาน คอยประคองให้ฉันผ่านทุกข์นั้นไป
ขอขอบคุณพี่หน่อยคนึงสุข เราเหมือนลูกข้าวปลาหามาให้
และอีกคนช่วยเหลือฉันไม่แพ้ใคร ลืมไม่ได้คือ ดร.พีรพงษ์
ขอขอบคุณบิดามารดาและย่าแจ่ว สำเร็จแล้วที่มุ่งหวังดังประสงค์
ขอขอบคุณตัวฉันที่มั่นคง เพื่อน ตอง ต้อม หงส์ ในไมตรี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญเดช เบิกฟ้า ผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ภาควิชาเคมี ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร และ ศูนย์เทคโนโลยี หลังการเก็บเกี่ยว คณะ เกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้อ อุปกรณ์ สถานที่ในการทำการทดลอง

กิตติศักดิ์ เหมือนดาว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ญ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์การวิจัย 2

สมมุติฐานการวิจัย 3

ขอบเขตการศึกษา 3

ประโยชน์การวิจัย 4

นิยามศัพท์เฉพาะ 4

บทที่ 2 5

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

1.พืชกระท่อม 5

2. สารไมทราไจนีน (Mitragynine) 9

3.พิษวิทยาของกระท่อมที่ส่งผลต่อมนุษย์ 12

4. การตรวจพืชกระท่อม และวิธีการวิเคราะห์สาร mitragynine 13

5. ประวัติการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารไมทราไจนีน จากใบกระท่อม 14

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16
บทที่ 3 19
วิธีดำเนินการวิจัย 19
1. การคัดเลือกตัวอย่าง ใบกระท่อมที่จะนำมาใช้ในการทดลอง 19
2. วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี 19
2.1 อุปกรณ์ 19
2.2 สารเคมี 20
3. วิธีการทดลอง 20
3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากใบพืชกระท่อม 20
3.2 ทดลองสกัดไมทราไจนีนจากใบกระท่อม ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี 21
3.3 วิธีการแยกสารไมทราไจนีนให้บริสุทธิ์ 22
3.4 วิเคราะห์ ด้วย เทคนิค FTIR ^{1}H-NMR และ ^{13}C- NMR 22
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) 22
บทที่ 4 24
ผลการทดลอง 24
บทที่ 5 43
บทสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 43
บทสรุป อภิปรายผล 43
ข้อเสนอแนะ 45
ภาคผนวก 46
รายการอ้างอิง 49
ประวัติผู้เขียน 54

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ 24

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบอุณหภูมิและเวลาการสกัดไมทราไจนีน 28

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบอุณภูมิ และเวลาในการสกัดไมทราไจนีน (%yild) 30

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบวิธีการสกัด 32

ตารางที่ 5 ค่า Chemical Shift ของ Protron แต่ละชุดที่ได้จากเทคนิค ^{1}H-NMR 34

ตารางที่ 6 ค่า Chemcal shifts ของ Carbon แต่ละชุดที่ได้จากเทคนิค ^{13}C-NMR 35

ตารางที่ 7 Inhibition zone (mm.) ที่วัดได้จากวิธีการ agar disc diffusion 36

ตารางที่ 8 ความเข้มข้น ต่ำสุดที่สามารถต้านแบคทีเรียได้ 41

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นกระท่อม 6

ภาพที่ 2 แสดงชนิดกระท่อมก้านแดงและก้านเขียว 7

ภาพที่ 3 ลักษณะของดอกกระท่อม 7

ภาพที่ 4 น้ำต้มกระท่อม "สี่คูณร้อย" 9

ภาพที่ 5 โครงสร้างไมทราไจนีน 10

ภาพที่ 6 ตัวอย่างโครงสร้างอัลคาลอยด์อื่น ๆ ที่พบในกระท่อม 11

ภาพที่ 7สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร 25

ภาพที่ 8 สีของสารสกัดหยาบเมื่อหยดลงแผ่น TLC 25

ภาพที่ 9 การแยกสารภายในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค TLC 26

ภาพที่ 10 แถบของไมทราไจนีนบนแผ่น TLC ที่ R_f 0.5 27

ภาพที่ 11 แถบสารไมทราไจนีน 33

ภาพที่ 12 การทดลองต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* 37

ภาพที่ 13 การทดลองการต้านเชื้อ *E.coli* 38

ภาพที่ 14 การทดลองต้านเชื้อแบคทีเรีย S.*aureus* 39

ภาพที่ 15 การทดลองต้านเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* 40

ภาพที่ 16 หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 40

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

การตรวจพยานวัตถุทางเคมีในงานตรวจพิสูจน์หลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ นับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง ต่อการสอบสวน เป็นการตรวจวิเคราะห์ทั้งด้านคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis) และด้านปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis) ซึ่งเป็นงานตรวจวิเคราะห์ที่กว้างขวางและหลากหลายรูปแบบของพยานวัตถุ ทั้งที่เป็นของแข็ง ของเหลวและก๊าซ เช่น พยานวัตถุประเภทยาเสพติด ประเภทวัตถุมีพิษ ยาพิษ วัตถุระเบิด เพลิงไหม้ เขม่าดินปืน หรือโลหะหนักที่เป็นพิษ ถึงแม้ว่าสารเสพติดที่ผิดกฎหมายจะได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นส่วนใหญ่ แต่ก็ยังมีสารบางชนิดที่สามารถสกัดได้จากพืช ซึ่งสารเหล่านั้นถูกเชื่อว่าเป็นสารเสพติดที่ให้โทษต่อร่างกายมนุษย์ ในระดับจิตประสาท จึงถูกจัดให้เป็นสารเสพติดที่ผิดกฎหมาย เช่น กัญชา ฝิ่น และพืชกระท่อม

พืชกระท่อม *Mitragyna speciosa* (Korth) Havil. มีสารไมทราไจนีน (Mitragynine) เป็นอัลคาลอยด์ ที่ออกฤทธิ์หลักของพืชกระท่อม [1] ซึ่งเป็นสิ่งผิดกฎหมายตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษประเภท 5 ปีพุทธศักราช 2522 [2] พืชกระท่อมในปัจจุบัน ถูกพัฒนาแปรรูปเป็นรูปแบบต่างๆ หลากหลายรูปแบบ ทั้งในรูปของผงกระท่อมบด น้ำต้มกระท่อม สารสกัดกระท่อมในแคปซูล การตรวจพิสูจน์จึงไม่สามารถพิจารณาได้ง่ายๆ ด้วยตาเปล่า การตรวจพยานหลักฐานที่สันนิษฐานว่ามีส่วนประกอบของพืชกระท่อม เช่น น้ำต้มใบกระท่อม จึงต้องใช้การตรวจพิสูจน์องค์ประกอบสารทางเคมี ซึ่งสารสำคัญที่กำหนดในกฎหมายที่ใช้ยืนยันว่าเป็นพืชกระท่อมนั้น คือสารไมทราไจนีน โดยจะต้องทำการตรวจพิสูจน์ด้วยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เช่น High Performance Liquid Chromatography หรือ HPLC การตรวจสอบจึงจำเป็นต้องใช้สารมาตรฐาน ไมทราไจนีน ในการวิเคราะห์ ซึ่งมีข้อจำกัดคือ มีราคาสูง ต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ

ในส่วนแรกของงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดและศึกษาการแยกสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม เพื่อประโยชน์ในงานการตรวจพิสูจน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ นอกจากสนใจวิธีการแยกสารไมทราไจนีนแล้ว การศึกษาฤทธิ์บางประการของสารไมทราไจนีนก็เป็นอีกหนึ่งเรื่องที่มีความน่าสนใจ จากการศึกษาเกี่ยวกับผลต่อระบบประสาทของสาร mitragynine ใน

งานวิจัยต่างๆ ทั้งในประเทศ และต่างประเทศ พบว่ามีผลกระตุ้นระบบประสาท เช่นเดียวกับโคเคน ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ และอาเจียน[3] [4]นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าสารสกัดที่ได้จากใบพืชกระท่อมเป็นพิษต่อตับ และไต [5] จากผลกระทบในทางพิษวิทยาที่กล่าวมาข้างต้น ยังมีรายงานใน

ตำรายาไทยที่ใช้พืชกระท่อมเข้าเป็นตัวยาในตำรับยา ประเภทยาแก้ท้องเสียในสูตรยาของหมอพื้นบ้านหรือหมอแผนโบราณ เช่น ตำรับยาประสะกระท่อม สามารถรักษา บรรเทาโรคเบาหวาน และระงับอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย หมอพื้นบ้านนำส่วนเปลือกและใบของพืชกระท่อม มารักษาอาการท้องร่วง ปวดท้อง ลดการปวดบิดถ่ายเป็นเลือด รักษาโรคกระเพาะอาหาร ความดันโลหิตสูง โรคผิวหนังเป็นแผลหนอง [6]

สำนักงบประมาณความช่วยเหลือด้านป้องกันและปราบปรามยาเสพติด (NAS) สถานเอกอัครราชทูตสหรัฐอเมริกา ประจำประเทศไทย สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม ได้สนับสนุนให้จัดทำหนังสือ พืชกระท่อมในสังคมไทย สำรวจพฤติกรรมการบริโภค รวมถึงการใช้พืชกระท่อมรักษาโรคของหมอพื้นบ้านภาคใต้ หนึ่งในนั้นคือการใช้ใบพืชกระท่อมรักษาอาการท้องเสีย และแผลหนอง [6]

ในส่วนที่สองผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ (crude extract) และสารสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สตาฟิโลคอคคัส ออเรียส (*S.aureus*) แบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเป็นปรสิตที่ผิวหนังของคนและสัตว์ เป็นสาเหตุทำให้เกิดฝีแผลพุพอง และ เอสเชอริเชีย โคไล (*E.coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ในกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการท้องเสียบ่อยที่สุดทั้งในเด็ก และผู้ใหญ่ [7] เพื่อพิจารณาแนวโน้มการออกฤทธิ์ของใบพืชกระท่อม ว่ามีฤทธิ์ในการรักษาโรคได้ตามความเชื่อของหมอพื้นบ้านที่ใช้พืชกระท่อมรักษาอาการท้องเสีย และแผลหนองตามภูมิปัญญาพื้นบ้านดังกล่าว โดยศึกษาด้วยวิธี disc diffusion และ Minimum inhibitory concentration

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ทดลองวิธีการสกัดใบพืชกระท่อมโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้
2. ทดลองหาวิธีการสกัด แยกสารไมทราไจนีน และ เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม 3 วิธี ดังนี้

1. วิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์พื้นฐาน[8]โดยการสกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid)

2.วิธีที่ดัดแปลงเพิ่มเติมด้วยการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดอะซีติก (acetic acid) และ

3.วิธีดัดแปลงโดยการใช้เครื่อง Ultrasonicator ในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดอะซีติก (acetic acid)

3. ตรวจพิสูจน์ เอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีนด้วยเทคนิค FT-IR ^{1}H-NMR ^{13}C-NMR
4. ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ (crude extract) และสารสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อมด้วยวิธี disc diffusion และ Minimum inhibitory concentration

สมมุติฐานการวิจัย

1. วิธีการสกัดใบพืชกระท่อมโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้
2. วิธีการสกัด แยกสารไมทราไจนีน ที่แตกต่างกันทั้ง 3 วิธี มีผลต่อปริมาณของสารไมทราไจนีนที่แยกได้
3. สารสกัดหยาบ และสารไมทราไจนีน จากพืชกระท่อม มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

ขอบเขตการศึกษา

1. ตรวจสอบพืชกระท่อมเบื้องต้น ด้วยการตรวจเอกลักษณ์ของพืชกระท่อม ควบคุมการทดลองโดยการใช้พืชกระท่อมจากแหล่งเดียวกันทั้ง 3 วิธีการสกัด โดยใช้ใบกระท่อมสดจำนวน 5 กิโลกรัม แล้วนำไปอบแห้งจนน้ำหนักแห้งคงที่ ในแต่ละการทดลองใช้น้ำหนักกระท่อมแห้ง 2.5 กรัม
2. ศึกษาเอกลักษณ์ของไมทราไจนีน ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR และ FT-IR
3. ใช้วิธีการสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม 3 วิธี ดังนี้

3.1 วิธีการสกัดจากวิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์ [8]

3.2 วิธีการดัดแปลงจากวิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์ โดยการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดอะซีติก (acetic acid)

3.3 วิธีการดัดแปลงจากวิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์ โดยการเพิ่มเครื่อง Ultrasonicator ในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดอะซีติก (acetic acid)

4. แยกสารไมทราไจนีนออกจากสารอัลคาลอยด์อื่นๆ ด้วย Column chromatography

5. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ศึกษาด้วยวิธี disc diffusion และ Minimum inhibitory concentration

ประโยชน์การวิจัย

1. ได้วิธีการสกัดสารไมทราไจนีนที่ดีที่สุดจาก 3 วิธี เพื่อนำไปใช้ในการสกัดและแยกสารไมทราไจนีน เพื่อแก้ปัญหาการซื้อสารมาตรฐานไมทราไจนีนจากต่างประเทศที่มีราคาแพง

2. ได้ทราบถึงประโยชน์ ข้อจำกัด ข้อเสีย ของสารสำคัญของพืชกระท่อม เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนางานด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้

3. จากความรู้ในการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย อาจจะสามารถนำพืชกระท่อมไปพัฒนาเป็นตัวยาจากธรรมชาติที่ปลอดภัย เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะในอนาคตได้

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. การสกัด คือ การแยกสารอัลคาลอยด์ทั้งหมดที่มีไมทราไจนีนเป็นองค์ประกอบหลัก ออกจากพืชกระท่อม

2. วิธีการสกัดที่ดีที่สุดคือวิธีการแยกไมทราไจนีนออกจากใบกระท่อมที่ได้ปริมาณของไมทราไจนีนมากที่สุด

3. วิธีการดัดแปลงวิธีการสกัด คือ การเพิ่ม หรือลดกระบวนการสกัดที่มีอยู่ดั้งเดิมซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย และเป็นที่ยอมรับของสากล เพื่อประโยชน์อย่างใดอย่างหนึ่ง

4.ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย คือ ศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ (crude extract) ในตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด และสารสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อมในการต้านการเจริญเติบโตของสตาฟิโลคอคคัส ออเรียส (*S.aureus*) และ เอสเชอริเชีย โคไล (*E.coli*)

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.พืชกระท่อม

พืชกระท่อม [9] พบมากแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นไม้ยืนต้นที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า มิตราไจนา สเปซิโอซา คอร์ท *Mitragyna Speciosa* (Korth.) Havil. จัดอยู่ในตระกูล รูเบียซีอี (Rubiaceae) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะประเทศไทย มาลายู จนถึงเกาะนิวกินี สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยมีอยู่ ๓ พันธุ์ คือ 1.พันธุ์แตงกวา (ก้านเขียว) 2.พันธุ์ยักษาใหญ่ (รูปใบใหญ่) และ 3.พันธุ์ก้านแดงการเรียกชื่อพืชกระท่อม เรียกแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ เช่น ในประเทศไทย ทางภาคเหนือเรียก อีด่าง อีแดง กระอวม ทางภาคใต้เรียกท่อม หรือท่ม ในมลายูเรียกคูทุม (Kutum) หรือ คีทุมเบีย (Ketum Bia) หรือเบียก (Biak) ในประเทศลาวเรียก ไนทุม (Neithum) ส่วนในแถบอินโดจีนเรียก โคดาม (Kodam)

สถานการณ์พืชกระท่อมในประเทศไทย [10] พืชกระท่อมได้กระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย มีการลักลอบนำเข้าจากประเทศมาเลเซียอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้สามารถพบในบางจังหวัดของภาคกลาง เช่น ปทุมธานี แต่จะพบมากในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้ เช่น สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง สตูล พัทลุง สงขลา ยะลา ปัตตานี นราธิวาส และตอนบนของประเทศมาเลเซีย

ประเทศไทยพืชกระท่อมจัดอยู่ในสารเสพติดประเภท 5 [11]พืชกระท่อม เป็นไม้ยืนต้นที่จัดเป็นยาเสพติด ตามความในพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 มาตรา 7 เช่นเดียวกับกัญชา พืชกระท่อม มีบทลงโทษทางกฎหมาย กรณีผลิตนำเข้า ส่งออก หรือจำหน่าย มีบทลงโทษจำคุกไม่เกิน 2 ปี และปรับไม่เกิน 20,000 บาท (ม.75ว.2) กรณีครอบครอง มีบทลงโทษ จำคุกไม่เกิน 1 ปี และปรับไม่เกิน 10,000 บาท หรือทั้งจำทั้งปรับ (ม.76ว.3) ถ้า 10 กก.ขึ้นไป ถือว่าครอบครองเพื่อจำหน่าย (ม.26ว.2) กรณีเสพ มีบทลงโทษ จำคุกไม่เกิน 1 เดือน หรือปรับไม่เกิน 1,000 บาท (ม.92ว.2) กรณีใช้อุบายหลอกลวง ขู่เข็ญ ใช้กำลัง ประทุษร้ายฯ ให้ผู้อื่นเสพ มีบทลงโทษ จำคุก 1-10 ปี และปรับ 10,000-100,000 บาท (ม.93) แต่ถ้ากระทำต่อหญิงหรือต่อผู้ไม่บรรลุนิติภาวะ หรือเพื่อจูงใจให้ผู้อื่นกระทำความผิดอาญา หรือเพื่อประโยชน์ในการกระทำความผิดอาญา จำคุก 3 ปี

ไปจนถึงตลอดชีวิต และปรับ 30,000-500,000 บาท และ กรณียุยงส่งเสริม ให้ผู้อื่นเสพ มีบทลงโทษจำคุกไม่เกิน 1 ปี และปรับไม่เกิน 10,000 บาท (ม.93 ทวิ ว.2) พืชกระท่อมออกฤทธิ์ประเภทกระตุ้นประสาท [12] การเสพใบกระท่อมมาก ๆ หรือเป็นระยะเวลานาน มักจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีขึ้นที่บริเวณผิวหนังมีผิวคล้ำและเข้มขึ้น และยังพบอีกว่าเสพกระท่อมไม่ได้รูดเอาก้านใบออกจากตัวใบ จะทำให้เกิดอาการ“ถุงท่อม” ในลำไส้ได้ เนื่องจากก้านใบและใบของพืชกระท่อมไม่สามารถย่อยได้ จึงติดค้างอยู่ภายในลำไส้ ทำให้ขับถ่ายออกมาไม่ได้ ทำให้เกิดเป็นก้อนถุงขึ้นมาในลำไส้ บางรายจะมีอาการโรคจิตหวาดระแวง เห็นภาพหลอน คิดว่าคนจะมาทำร้ายตน และพูดไม่ค่อยรู้เรื่อง

ลักษณะทางสรีระวิทยาของพืชกระท่อม [9] กระท่อมเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ปานกลาง มีแก่นเป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 10 -15 เมตร

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นกระท่อม

ที่มา: ภิรมวรุณ.พืชกระท่อม.เข้าถึงเมื่อ 16 พฤษภาคม 2561.เข้าถึงได้จาก http://piromwaroon.blogspot.com

ลักษณะของใบพืชกระท่อมมีลักษณะคล้ายใบกระดังงา มีชนิดก้านใบแดงและใบเขียว เป็นใบเดี่ยวเรียงตัวเป็นคู่ตรงข้ามและมีหูใบ 1 คู่ (interpetiolar stipules) แผ่นใบสีเขียว เป็นรูปไข่รีแกมขอบขนาน บริเวณปลายแหลมมีขนาดของแผ่นใบ กว้าง x ยาว ประมาณ 5-10 x 8-14 ซม. ขอบใบเรียบ ฐานใบมน วัดบริเวณก้านใบออกจากฐานใบ มีความยาวประมาณ 2-4 ซม.

เส้นใบเรียงตัวแบบขนนก เส้นกลางใบและเส้นแขนงใบมีสีแดงเรื่อ มีขนอ่อนสั้นๆ บริเวณเส้นใบที่อยู่ด้านท้องใบ มีเส้นแขนงใบ 10-15 คู่

ภาพที่ 2 แสดงชนิดกระท่อมก้านแดงและก้านเขียว
ที่มา: ภิรมวรุณ.พืชกระท่อม.เข้าถึงเมื่อ 1 พฤษภาคม 2561.เข้าถึงได้จาก http://piromwaroon.blogspot.com

ดอกกระท่อม มีลักษณะเป็นช่อตุ้มกลม มีขนาด 3-5 ซม. ใน 1 ช่อประกอบด้วยดอกย่อยขนาดเล็กสีขาวอมเหลืองจำนวนมาก ดอกย่อยสมบูรณ์เพศ

กระท่อมก้านแดง กระท่อมก้านเขียว

ภาพที่ 3 ลักษณะของดอกกระท่อม

ตำราแพทย์แผนโบราณ ของไทย [6] ระบุสรรพคุณใช้ระงับอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ระงับอาการปวดท้อง และระงับอาการประสาท รักษาโรคกระเพาะอาหาร โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคผิวหนัง เป็นต้น โดยหมดพื้นบ้านแนะนำให้เคี้ยวใบกระท่อมที่แกะก้านใบออก เคี้ยว อาจกลืนหรือคาย กาก ดื่มน้ำตาม ความนิยมใช้พืชกระท่อมปรุงเป็นยา เรียกว่า ประสะกระท่อม ใช้รักษาโรคบิด แก้ปวดมวนท้อง ปวดเบ่ง ปวดเมื่อยร่างกาย ท้องเฟ้อ ท้องเสีย ท้องร่วง ทำให้นอนหลับและระงับประสาท ที่กล่าวว่ามีประสะกระท่อมนั้น แสดงว่าในใบกระท่อมนั้นมีพิษอยู่ด้วย คนโบราณ

นั้นเชื่อว่าหากยาชนิดไหนที่มีพิษจะมีการประสะ คือ ทำให้พิษอ่อนลง มีวิธีการทำได้หลายรูปแบบ เช่นการต้ม การคั่ว หรือผสมกับสารตัวอื่นในปริมาณที่เท่ากัน ก็จะเรียกว่าประสะ ในทางแผนโบราณหากเป็นยาจะต้องมีการผสม มีประสะ แก้พิษ จะต้องเป็นตำรับที่มีความพอดี รับประทานเข้าไปแล้วจะไม่มีผลข้างเคียงและไม่ติด เนื่องจากแพทย์เป็นผู้สั่งใช้ และที่สำคัญในอดีตเคยมีการนำกระท่อมมาทดแทนฝิ่นหรือเฮโรอีนได้ เนื่องจากกระท่อมสามารถลดอาการถอนยา อาการปวดเมื่อย และรักษาอาการอยากยาได้ ชาวนานิยมบริโภคโดยการเคี้ยวใบสด หรือเอาใบมาย่างให้เกรียมและตำผสมกับน้ำพริกรับประทานเป็นอาหารเพื่อให้มีแรงทำงานและสามารถทนตากแดดอยู่กลางแจ้งได้เป็นเวลานานโดยไม่รู้สึกเหนื่อย ชาวมลายูใช้ใบกระท่อมตำพอกแผล และใช้ทั้งใบเผาให้ร้อนวางบนท้องรักษาโรคม้ามโตตลอดจนใช้กระท่อมเพื่อทดแทนฝิ่นในท้องที่ซึ่งหาฝิ่นไม่ได้

พฤติกรรมการใช้พืชกระท่อม [13] การใช้พืชกระท่อมแบบดั้งเดิม มีวัตถุประสงค์เพื่อการทำงาน มีวิธีการเสพโดยการเคี้ยวใบสด เพื่อให้สามารถทำงานได้มีประสิทธิภาพ (ทำงานกลางแดดได้นานขึ้น) บางตำราใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรค อาทิเช่น ลดอาการไอ ปวดท้อง เบาหวาน (ลดน้ำตาลในเลือด) ฯลฯ นอกจากวิธีเสพที่เคี้ยวใบสดแล้ว ผู้ใช้กระท่อมอาจเคี้ยวใบกระท่อมร่วมกับน้ำชา กาแฟ เครื่องดื่มบำรุงกำลัง ในเยาวชนมีวิธีการเสพกระท่อมโดยวิธีใช้การเสพกระท่อมผสม เช่น การเสพน้ำต้มใบกระท่อมผสมกับโค้ก ยาแก้ไอ และสารอื่น ๆ ตามสูตรของแต่ละท้องถิ่น มักรู้จักกันในชื่อ “สี่คูณร้อย” ซึ่งชื่อเรียกนั้นจะเปลี่ยนแปลงได้ โดยแตกต่างกันไปตามกลุ่มผู้ใช้ตั้งชื่อโดยมักอ้างอิงจากการผสมสารประกอบอื่นๆ ที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่ามีการใช้สี่คูณร้อยร่วมกับบุหรี่ กัญชา รวมถึงอัลพราโซแลม[14] (อัลพราโซแลม เป็นยาในกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทที่ชื่อเบนโซไดอะซีปีน (Benzodiazepines) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด) การใช้พืชกระท่อมผสมเกิดขึ้นเมื่อมีการปราบปรามยาเสพติดอย่างเข้มงวด ทำให้ยาเสพติดอื่นๆ หายาก จึงมีการคิดค้นกระท่อมผสมเป็นสารทดแทนตั้งแต่ปี 2546 และมีการนำกระท่อมผสมไปเชื่อมโยงกับปัญหาความมั่นคงในพื้นที่ 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ เนื่องจากมีการสร้างความเชื่อว่าเสพสี่คูณร้อยแล้วเกิดความฮึกเหิม

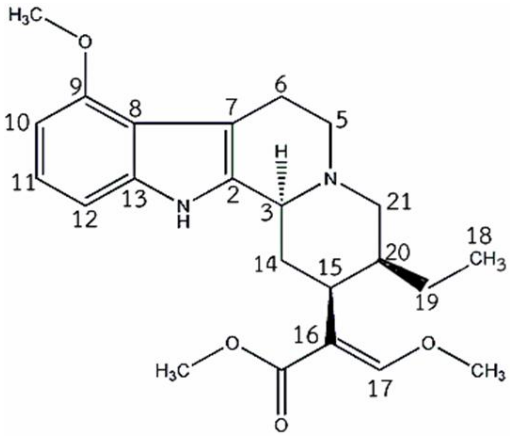
ภาพที่ 4 น้ำต้มกระท่อม "สี่คูณร้อย"

ที่มา: หาดใหญ่นิวส์.น้ำท่อมอันตรายภัยร้ายคร่าชีวิต.เข้าถึงเมื่อ 10 พฤษภาคม 2561.เข้าถึงได้จาก https://www.hatyaifocus.com

จากการศึกษาพบว่าประเทศเพื่อนบ้านของประเทศไทย คือ ลาว เขมร มาเลเซีย อินโดนีเซีย พบว่า กระท่อมที่อยู่ในรูปของ ต้น ใบ ราก ไม่เป็นสิ่งผิดกฎหมาย และประชาชนบางกลุ่มที่นิยมบริโภคในรูปของใบสดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน อีกทั้งในข้อตกลงของสหประชาชาติก็ไม่ได้กำหนดให้กระท่อมเป็นสิ่งเสพติดหรือผิดกฎหมาย ประเทศไทยเป็นประเทศเดียวเท่านั้นที่กำหนดให้กระท่อมเป็นพืชที่ผิดกฎหมาย นอกจากนี้ พ.ร.บ.ป่าไม้ พ.ศ. 2484 ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดย พ.ร.บ.ป่าไม้ (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2518 ได้กำหนดให้ต้นกระท่อมเป็นพืชหวงห้าม จะตัดฟันต้องได้รับอนุญาตจากเจ้าพนักงาน ทำให้เกิดปัญหาว่าหากประชาชนมีต้นกระท่อมอยู่ในสวนหรือที่ดินก็จะไปตัดโดยพลการไม่ได้ แต่ขณะเดียวกันการครอบครองกระท่อมก็ผิดกฎหมายตาม พ.ร.บ.ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522

2. สารไมทราไจนีน (Mitragynine**)**

สาร mitragynine [15]จัดเป็นแอลคาลอยด์ ชนิด corynanthe อาจเรียกชื่อ mitragynine ตามลักษณะโครงสร้างว่า 9-methoxy-corynantheidine ลักษณะโครงสร้างจัดอยู่ประเภทเดียวกับอัลคาลอยด์ ที่พบในสกุล Yohimbeและสกุล Uncaria สาร mitragynine มีลักษณะเป็นผงสีขาว (white amorphous powder) มีคุณสมบัติละลายในตัวทำละลายชนิดแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และกรดอะซิติก



ภาพที่ 5 โครงสร้างไมทราไจนีน

ชื่อทางเคมี 9-methoxy-corynantheidine

สูตรทางเคมี $C_{23}H_{30}N_2O_4$

M.W. = 398.22 g/mol

M.P. = 110 – 115.6 °C

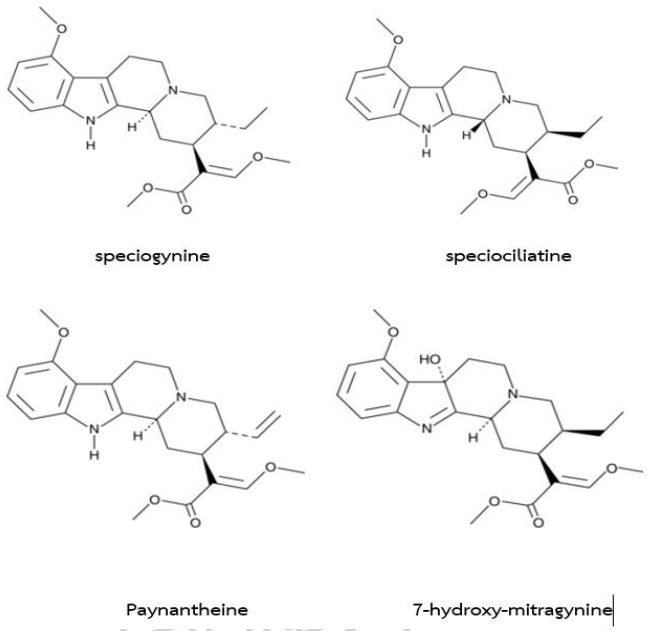
B.P. = 230 – 240 °C

Mitragynine เป็นสารอัลคาลอยด์ ที่สามารถออกฤทธิ์กดประสาทส่วนกลาง (CNS depressant) เช่นเดียวกับสารเสพติดกลุ่มเดียวกัน เช่น ยาบ้า มีผลต่อการลดระดับการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ทำให้เกิดอาการชาเฉพาะที่และกดระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากสารไมทราไจนีนในใบกระท่อมยังพบสาร alkaloid ตัวอื่น ๆ ได้อีก [15] เช่น speciogynine, speciociliatine, paynantheine และ 7-hydroxy-mitragynine เป็นต้น ตัวอย่างโครงสร้าง alkaloid ที่พบในพืชกระท่อม ดัง แสดงในรูปที่ 3 ชนิด รูปแบบการสร้างและการสะสมแอลคาลอยด์และสารอื่น ๆ ในพืชกระท่อมมีความแตกต่าง หลากหลาย ขึ้นอยู่กับฤดูกาล และแหล่งเพาะปลูก

อัลคาลอยด์ [16] เป็นสารประเภท เมแทบอไลท์ทุติยภูมิ ในโมเลกุลประกอบด้วยธาตุไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อะตอม มีสถานะเป็นด่าง พบมากในพืช โดยส่วนมากสารอัลคาลอยด์ เป็นสารที่มีพิษ และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายระบบ จึงถูกนำ มาใช้ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ยาระงับปวด ยาชาเฉพาะที่ ยาลดความดัน ยาใช้สำหรับควบคุมการเต้นของหัวใจ

นอกจากนี้ยังมีอัลคาลอยด์บางชนิดมีฤทธิ์สามารถต้านโรคมะเร็ง [17] การจำแนกชนิดของสารอัลคาลอยด์ทำ ได้หลายวิธี เช่น การแบ่งตามกลุ่มของพืชที่มีอัลคาลอยด์นั้นๆ แบ่งตามคุณสมบัติ

ทางเภสัชวิทยาแบ่งตามชนิดของสารตั้งต้น และแบ่งตามสูตรโครงสร้างทางเคมี วิธีที่นิยมคือ แบ่งตามชนิดของสารตั้งต้น ในชีวสังเคราะห์ ซึ่งสามารถแบ่งอัลคาลอยด์ได้เป็น 3 กลุ่ม[18] [19] คือ



ภาพที่ 6 ตัวอย่างโครงสร้างอัลคาลอยด์อื่น ๆ ที่พบในกระท่อม

1. อัลคาลอยด์แท้จริง (true alkaloids) มีอะตอมไนโตรเจนอย่างน้อย 1 อะตอมในโครงสร้าง ที่มาจากกรดอะมิโน และอะตอมไนโตรเจนเป็นส่วนของวงเฮเทอโรไซคลิก (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) อะโทรปีน (atropine)

2. โพรโทอัลคาลอยด์ (protoalkaloids) เช่น เมสคาลีน (mescaline) ฮอร์ดินีน (hordenine) และโยฮิมบีน (yohimbine) เป็นกลุ่มของสารอัลคาลอยด์ที่อะตอมไนโตรเจนในโครงสร้าง มาจากกรดอะมิโนเช่นเดียวกับอัลคาลอยด์แท้จริง แต่โครงสร้าง มีอะตอมไนโตรเจนอยู่นอกวงเฮเทอโรไซคลิก สารตั้งต้น ในชีวสังเคราะห์ของอัลคาลอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ แอล-ไทโรซีน และ แอล-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) อะดีนีน (adenine) และกวานีน (guanine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) หรือสารที่เกิดจากกระบวนการเปลี่ยนของสารตั้งต้น (postcursor)ของกรดอะมิโน ตัวอย่างสารอัลคาลอยด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น คาเฟอีน (caffeine) แคปไซซิน (capsaicin) ทีโอโบรมีน (theobromine) และธิโอฟิลลีน (theophylline)

3.พิษวิทยาของกระท่อมที่ส่งผลต่อมนุษย์

มีรายงานน้อยมากที่ศึกษาเกี่ยวกับพิษวิทยาของพืชกระท่อม มีรายงานการทดลองในสุนัข [5] ในขนาดยา 920 mg/kg ไม่พบอาการสั่นและชัก ส่วนการ ทดลองในหนู ทั้งแบบเฉียบพลัน (acute) และกึ่งเรื้อรัง (sub chronic) ผลการทดลองพบว่าการใช้สารสกัดกระท่อมเป็นพิษต่อตับของหนู โดยทุกขนาดยา 100, 500 และ 1000 mg/kg ทำให้ระดับ creatinine เพิ่มขึ้น จึงสรุปได้ ว่าสารสกัดกระท่อมเป็นพิษต่อตับ และไต ส่วนการศึกษาพิษของพืชกระท่อมและสาร mitragynine โดยพบว่าผู้ที่ใช้ใบกระท่อมปริมาณมาก และเป็นเวลานาน พบอาการถอนยา เมื่อหยุดการใช้กระท่อม มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ใบกระท่อมร่วมกับยาอื่น ๆ อาจเป็นสาเหตุให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์รุนแรงขึ้นหรือส่งผลทำให้เสียชีวิต ยาเหล่านั้นตัวอย่างที่พบได้บ่อย [20] เช่น carisoprodol, monafinil, propylhexedrine, Datura stramonium, fentanyl, diphenhydramine, caffeine, morphine และ/หรือ O-desmethyltramadol (krypton)

กรณีศึกษาที่ 1 [21] ในชายวัย 43 ปี ที่ ได้รับ hydromorphone ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อวัน เพื่อรักษาอาการ opioid withdrawal ในช่วงเวลาหนึ่ง พบว่าไม่สามารถหายา hydromorphone ดังกล่าวได้ จึงสั่งซื้อพืชกระท่อมผ่านทางอินเตอร์เน็ต ชงดื่มใน รูปแบบชา วันละ 4 ครั้ง ภายหลังมีการใช้ร่วมกับยา modafinil ขนาด 100 มิลลิกรัม ทำให้ชายผู้นี้มีอาการชัก (tonic-clonic seizure) ภายหลังจากได้รับยา modafinil เพียง 20 นาที

กรณีศึกษาที่ 2 [22] การตายของชายวัย 21ปี ที่เสพน้ำต้มใบกระท่อม 4 x100 เมื่อตรวจปัสสาวะและเลือด ด้วยวิธี Liquid chromatography-electrospray ionization-time of flight

mass spectrometry พบว่าสามารถตรวจพบmitragynine, caffeine, diphenhydramine, alprazolam, nortriptyline, methadone, tramadol, methamphetamineและสารเมตาบอไลท์อื่นๆ ผู้วิจัยได้ตั้งข้อสมมติฐานการตายของชายดังกล่าวว่าเกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง และภาวการณ์หายใจล้มเหลวซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุการเสพยา หลายชนิด รวมถึง น้ำต้มใบกระท่อม 4 x 100 ซึ่งมักจะใช้น้ำต้มใบกระท่อม ร่วมกับเครื่องดื่มจำพวกโคล่า ยาแก้ไอ และยากล่อมประสาท หรือ ขดยากันยุง

กรณีศึกษาที่ 3 [23] การรายงานการตายของชายวัย 17 ปี ที่มีอาการบวมน้ำ และน้ำท่วมปอดโดยชายดังกล่าวมีประวัติการ ใช้พืชกระท่อมรักษาอาการปวดหลัง ภายหลังจากการตรวจเลือดด้วยวิธี LC-MS พบสาร dextromethorphan (0.28 mg/L), diphenhydramine (0.33 mg/L), temazepam (0.21 mg/L),7amino-clonazepam (0.21 mg/L) และmitragynine (0.60mg/L)จึงสรุปว่าสาเหตุการตายที่เป็นไปได้ของชายดังกล่าวเป็นผลเนื่องจากพิษของพืชกระท่อม

จากกรณีศึกษาในข้างต้นนั้นสามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่า ยังไม่มีรายงานการตายของผู้ที่บริโภคพืชกระท่อมเพียงอย่างเดียว ส่วนใหญ่จะเกิดจากการบริโภคแบบผสมโดยใช้ยาออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทร่วมกันหลาย ๆ ตัว [24] จนทำให้การทำงานของสมอง และการทำงานของหัวใจล้มเหลว

4. การตรวจพืชกระท่อม และวิธีการวิเคราะห์สาร mitragynine

การตรวจพืชกระท่อม [25] สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจพิจารณาลักษณะภายนอก (macroscopic examination) ดูรูปร่างใบ หูใบ แต่ถ้าอยู่ในรูปผงยาสามารถตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) ซึ่งจะพบองค์ประกอบที่เป็นส่วนของใบเช่น palisade parenchyma, spongy parenchyma, epidermis, paracytic stomata, non-glandular trichome, prism crystal เป็นต้น นอกจากนี้สามารถสกัดสารจากผงยาดังกล่าวเพื่อนำมาตรวจสอบสาร mitragynine ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ได้แก่ วิธี thin layer chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC เป็นต้น) นอกจากนี้อาจใช้เทคนิคทางโมเลกุลใช้ลายพิมพ์ดี เอ็น เอ (PCR-RFLP) มาแยกแยะกระท่อมออกจากพืชสกุล Mitragyna spp. อื่นๆ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์พืชกระท่อมในปัจจุบันมีมากขึ้นทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ เทคนิคที่มีการใช้อย่างแพร่หลายคือวิธีโครมาโตกราฟี [26] โดยการใช้สาร mitragynine

เป็น marker การวิเคราะห์ทำได้ในตัวอย่างหลายชนิด เช่นตัวอย่างพืชกระท่อม ผลิตภัณฑ์ที่มีพืชกระท่อมเป็นส่วนประกอบ รวมถึงการวิเคราะห์หาสาร mitragynine และสารเมตาบอไลท์ในเลือดและปัสสาวะ [27] เทคนิคที่มีการรายงานได้แก่ high performance liquid chromatography (HPLC) ร่วมกับเครื่องตรวจวัดต่างๆ เช่น UV, diode array detector (DAD) และ MS นอกจากนี้ยังมีการใช้ gas chromatography (GC) [28] ร่วมกับเครื่องตรวจวัดมวลโมเลกุล (MS detector) การใช้ supercritical fluid chromatography ร่วมกับ DADและเทคนิค direct analysis in real time ร่วมกับ MS spectrometry (DART-MS) สำหรับตรวจสอบพืชกระท่อมในเชิงคุณภาพ วิธีการเหล่านี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับไมโครกรัม(µg) จนถึงนาโนกรัม(ng) นอกจากวิธีโครมาโตกราฟีแล้ว ยังมีการวิเคราะห์สาร mitragynine ในพืชกระท่อมด้วยเทคนิค enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับไมโครกรัม (µg)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้พัฒนาชุดทดสอบน้ำต้มใบกระท่อม ประกอบด้วย 7 ขั้นตอน ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ กรองผ่านชุดกรอง จากนั้นนำของเหลวที่ผ่านชุดกรองมาระเหยในจานหลุม และเติมน้ำยาทดสอบสีเหลือง ผลบวกต่อ mitragynine จะให้ตะกอนสีน้ำเงิน โดยชุดทดสอบนี้จะเป็นการทดสอบแบบปฏิกิริยาทางเคมี

5. ประวัติการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารไมทราไจนีน จากใบกระท่อม

ในปี ค.ศ.1921 Field [29] ได้ทำการสกัดแยกสารอัลคาลอยด์จากใบกระท่อม คือ Mitragynine

ในปี ค.ศ.1932 Grewel [3] ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของไมทราไจนีนต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองซึ่งไมทราไจนีนมีฤทธิ์ในการลดการตึงตัว (tone) และความแรง (amplitude) ของการบีบตัวกล้ามเนื้อเรียบ ทาให้เกิดการชาเฉพาะที่มีฤทธิ์ฆ่าโปรโตซัวทั่วไปได้ แต่ไม่ฆ่าโปรโตซัวที่ก่อโรคต่อมนุษย์และมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางคล้ายกับการใช้โคเคน

ในปี ค.ศ.1963 Joshi และคณะ[30]ได้ศึกษาและรายงานสูตรโครงสร้างของไมทราไจนีนว่าเป็นสาร indole alkaloid และบริเวณ C-9 จะมีกลุ่ม methoxy จับอยู่โดยโครงสร้างของไมทราไจนีนซึ่งเป็นวงแหวนแบบเปิด

ในปี ค.ศ.1972 Macko, Weisbechและ Douglas [31] ทำการศึกษาฤทธิ์ของไมทราไจนีนในการระงับปวดและแก้ไอ พบว่า สารไมทราไจนีนมีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับการใช้โคเดอีนในขนาดเท่ากัน แต่ไม่มีผลทำให้อาเจียนหรือหายใจขัด (dyspnea) และไม่ทำให้ติดเหมือนฝิ่น จากการทดสอบในหนู mice พบว่าการให้ไมทราไจนีนทางปากออกฤทธิ์แก้ปวดได้ดีกว่าการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) แสดงให้เห็นว่าเมตาบอไลต์ของไมทราไจนีนออกฤทธิ์ได้ดีกว่าไมทราไจนีน

ในปี 1974 นิวัติ แก้วประดับ [32] ทำการสกัดใบกระท่อมสด สามารถสกัดสารอัลคาลอยด์ออกมาได้ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ mitragynine, paynantheine, speciogynine, mitraciliatine, ajmalicine, isotoropodine, mitraphyllineและ tetrahydroalitonine โดยtetrahydroalitonine นี้ไม่มีรายงานว่าเคยสกัดพบมาก่อนเนื่องจากความคงตัวไม่ดีจึงพบเฉพาะใบกระท่อมสดเท่านั้น

ในปี ค.ศ.1978 Rueffer [33] ป้อนสารติดฉลาก strictosidine สารกึ่งกลาง(intermediate) สำคัญ ในชีวสังเคราะห์ของ terpenoid indole 10 alkaloid ผลการทดลองพบว่าสาร strictosidine ได้ถูกนำไปใช้ และมีฉลากติดบนสาร mitragynine การศึกษาดังกล่าวจึงสรุปในเบื้องต้นว่าสาร mitragynine สร้างผ่านสารกึ่งกลาง strictosidine เช่นเดียวกัน ด้วยสมมติฐานนี้ สาร mitragynine จะถูกสร้างขึ้นจากองค์ประกอบ 2 ส่วนคือ ส่วน indole ที่ได้จาก tryptamine ในวิถีชิกิเมท และส่วนของ iridoid ที่ได้จาก secologanin Rueffer et al.

ในปี ค.ศ.2005 Chan, Pakiamและ Rahim [28]ได้ทำการสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อมและน้ำต้มใบกระท่อมและทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) และ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์สารไมทราไจนีนมาตรฐานด้วย GC-FID และ GC-MSปรากฏพีคของสารไมทราไจนีนที่เวลา (Retention time: RT) 16.5 นาที จึงใช้เป็นพีคอ้างอิงของไมทราไจนีนโดยมี mass spectrum คือ 186,199, 214, 383 และ 397 และเมื่อใช้ตรวจสารสกัดจากใบกระท่อมและน้ำต้มใบกระท่อมพบว่าให้พีคที่เวลาเดียวกันและมีค่ามวลต่อประจุในลักษณะเหมือนกับของไมทราไจนีนมาตรฐาน

ในปี ค.ศ. 2012 Ori และคณะ[16] ได้พัฒนาวิธีการสกัด mitragynine จากใบกระท่อมอินโดนีเซีย โดยใช้คลื่นเสียง ไมโครเวฟ และ solid-phase extraction พบว่าได้ปริมาณสูงกว่าวิธีดั้งเดิม (Orio et al, 2012) ในใบกระท่อมทั้งของไทยและมาเลย์ ยังพบสาร alkaloid ตัวอื่น ๆ ได้อีก เช่น speciogynine, speciociliatine, paynantheine และ 7-hydroxy-mitragynine เป็นต้น

ในปี ค.ศ.2016 Kruegel [34] ได้รายงานการศึกษาสาร mitragynine โดยการทำ molecular docking ต่อการจับกับตัวรับออปิออยด์ที่แยกได้จากมนุษย์ ผลการทดลองให้ผลสรุปว่า mitragynine และ7-hydroxymitragynine เป็น partial μ opioid agonist และเป็น competitive antagonist ต่อ opioid receptor (Kruegel et al. 2016) ดังนั้นสารออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท mitragynine และ 7-hydroxymitragynine มีคุณสมบัติแก้ปวด ผ่านการจับกับ μ opioid receptor

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปี 2015 Christine และคณะ [35] ได้ศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพและการหาปริมาณ Kratom ในผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ โดยไม่จำกัดว่าจะเป็นชนิด ผง หรือของเหลว โดยใช้ขั้นตอนการสกัดด้วยเมทานอลและทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC / MS และ LC-MS / MS สำหรับการตรวจคัดกรองครั้งแรกและการยืนยันด้วยสเปกตรัมของ mitragynine ใน Kratom และการวัดปริมาณผ่าน UPLC / PAD; 2) LC-MS / MS ในห้องปฏิบัติการควบคุม สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างใช้ตัวทำละลาย mitragynine มาตรฐานสำหรับการระบุเปรียบเทียบของ Kratom และการวัดปริมาณระดับของ mitragynine ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทดสอบ คือผลิตภัณฑ์ Kratom ที่ซื้อผ่านทางอินเทอร์เน็ต จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค: GC / MS, LC-MS / MS และ UPLC / PDA ข้อมูล UPLC / PDA มีค่าเฉลี่ย 1.041% (n = 21, 4.2%) และ LC-MS / MS1.140% (n = 14, 6.81%)

ปี 2016 วราพงษ์ เสนะวีระกุล [36] ได้ทำการทดลองการสกัดใบกระท่อมด้วย acetic acid ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปรับ pH ให้อยู่ ในช่วง9-10 ด้วยสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น สกัดซ้ำด้วยethyl acetate เมื่อนำชั้นของ ethyl acetate มาวิเคราะห์ เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค gas chromatography ชนิด mass detector พบปริมาณสาร mitragynine ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟ) ซึ่งสารสกัด mitragynine ที่ได้มีปริมาณสูงพอ

นำไปใช้เป็นสารเปรียบเทียบแทนสารมาตรฐาน mitragynine ได้ การสกัดตัวอย่างนำน้ำต้มกระท่อมทั้ง 12 ตัวอย่าง ด้วยการปรับ pH และสกัดด้วย ethyl acetate สามารถตรวจพบสาร mitragynine ได้ในทุกตัวอย่างที่ทดสอบ สำหรับเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ที่เหมาะสม ในการตรวจพิสูจน์สาร mitragynine คือ วิธีthin layer chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ hexane : ethyl acetate ในสัดส่วน 6:4 และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography ชนิด FID detector ด้วยวิธีดัดแปลง สามารถใช้แทนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography ชนิด mass detector ได้

ปี 2017 Nathan Fuenffinger และคณะ [37] ได้มีการพัฒนาวิธีการ IMS เพื่อการตรวจหา mitragynine ซึ่งเป็น alkaloid ที่มีมากที่สุดใน Mitragyna speciosa หรือที่เรียกว่า kratom ค่าสูงสุดที่สอดคล้องกับไอออนโปรตอนไทเทเนียมของ mitragynine มีค่าการเคลื่อนที่ของไอออนลดลง 0.95 ± 0.00014 cm2 / (V s) และขีด จำกัด ของการตรวจหา mitragynine โดยใช้ IMS เท่ากับ 0.5 ng การทดลองได้ใช้วิธี IMS ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 15 ตัวอย่างที่น่าสงสัยว่ามี kratom ผลจากการวิเคราะห์ของ IMS ถูกนำมาเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS / MS) ของตัวอย่างเดียวกัน พบ Mitragynine ใน 14 ตัวอย่างจาก 15 ตัวอย่างโดยใช้ LC-MS / MS และ 13 จาก 15 ตัวอย่างที่ใช้ IMS ความแตกต่างระหว่างวิธีการสะท้อนให้เห็นว่าตัวอย่างหนึ่งมี mitragynine ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าขีด จำกัด การตรวจหา IMS การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของ IMS ในการตรวจคัดกรองผลิตภัณฑ์ที่มี kratom รวมทั้งความเชื่อถือได้ทางวิทยาศาสตร์ของวิธีการคัดกรอง IMS ซึ่งแสดงให้เห็นโดยการเปรียบเทียบผลของ IMS กับผลการยืนยันที่ได้จากการใช้ LC-MS / MS

ปี 2018 Mei JinLee [38] ได้ทดลองวิธีการที่ใช้ solid phase extraction และ liquid chromatography-tandem mass spectrometry เพื่อหาปริมาณ mitragynine, 16-carboxy mitragynine และ 9-O-demethyl mitragynine ในตัวอย่างปัสสาวะของมนุษย์โดยการใช้การตรวจสอบปฏิกิริยาใน positive ionization mode โดยใช้ nalorphine เป็นมาตรฐาน วิธีการนี้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์ ในช่วง 83.6-117.5% โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนน้อยกว่า 13% เปอร์เซ็นต์ recovery ของ mitragynine, 16-carboxy mitragynine และ 9-O-demethyl mitragynine อยู่ในช่วง 80.1-118.9% ขีด จำกัด ล่างของการวัดปริมาณคือ 1ng / ml สำหรับ

mitragynine, 2ng / ml สำหรับ 16-carboxy mitragynine และ 50ng / mL สำหรับ 9-O-demethyl mitragynine วิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำสูงโดยเมื่อทำการทดลองซ้ำ ก็คงยังได้เปอร์เซ็นต์ recovery ของ mitragynine , 16-carboxy mitragynine และ 9-O-demethyl mitragynine ที่คงตัว ในปัสสาวะของมนุษย์

7. กรอบแนวคิดการวิจัย

ตัวแปรต้น

1.ทดลองวิธีการสกัดใบพืชกระท่อมโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้

2. ทดลองหาวิธีการสกัดสารสกัดหยาบ สกัดและแยกสารไมทราไจนีน

3.เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม

4.ตรวจพิสูจน์ เอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีนด้วยเทคนิค FT-IR 1H-NMR 13C-NMR

5.ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ (crude extract) และสารสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม

↓

ตัวแปรตาม

1.วิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมที่ดีที่สุดจากการทดลอง

2.สารมาตรฐานไมทราไจนีน

3. ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียจากพืชกระท่อม

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกตัวอย่าง ใบกระท่อมที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

ตรวจสอบให้ถูกต้องตามลักษณะเอกลักษณ์ของใบกระท่อม ควบคุมการทดลองโดยการใช้ใบกระท่อมจากแหล่งเดียวกันทั้ง 3 วิธีการสกัด ซึ่งขนาดของใบ ความแก่ของใบ และสีของใบต้องใกล้เคียงกันโดยใช้ใบกระท่อมสด จำนวน 5 กิโลกรัมที่ทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่

2. วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากกระท่อม

2.1.1.1 Filter paper No.1

2.1.1.2 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, F-TIR

2.1.1.3 เครื่อง Ultrasonicator

2.1.1.4 อุปกรณ์พื้นฐานห้องปฏิบัติการเคมี

2.1.2 ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากกระท่อม

2.1.2.1 paper disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)

2.1.2.2 จานเลี้ยงเชื้อ

2.1.2.3 ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ

2.1.2.4 96 well plate

2.1.2.4 ปากคีบปลอดเชื้อ (Sterile forceps)

2.1.2.5 อาหาร MHB

2.1.2.6 เวอร์เนีย คาลิปเปอร์ (Vernier calipers)

2.1.2.7 แบคทีเรียสตาฟิโลคอคคัส ออเรียส (*S. aureus*)

2.1.2.8 แบคทีเรียเอสเชอริเชีย โคไล (*E.coli*)

2.2 สารเคมี

2.2.1 Hexane (C_6H_{14})

2.2.2 acetic acid

2.2.3 Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$)

2.2.4 Ammonia

2.2.5 ใบกระท่อมสด

2.2.6 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)

2.2.7 เอทานอล (ethanol)

2.2.8 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

2.2.9 ยา Tetracyclin

3. **วิธีการทดลอง**

3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) จากใบพืชกระท่อม

การเตรียมสารสกัดหยาบโดยใช้ตัวทำละลายดังนี้1.เฮกเซน (Hexane) 2.ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) 3.เอทธิล อะซีเตท (Ethyl Acetate) 4.เอทานอล (ethanol) และ 5. กรดอะซีติก (Acetic acid) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ อย่างละ 200 มิลลิลิตร โดยชั่งผงใบพืชกระท่อมบดละเอียด 20 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย เรียงการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามาก ครั้งละ 200 มิลลิลิตร ในแต่ละครั้งนำสารสกัดหยาบที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator จนสารละลายระเหยหมด จากนั้นชั่งสารสกัดหยาบที่สกัดได้ คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ yield

3.2 ทดลองสกัดไมทราไจนีนจากใบกระท่อม ด้วยวิธีการสกัด 3 วิธี

วิธีที่ 1 วิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์ {8} โดยใช้ กรดอะซีติก (acetic acid) สกัดนาน 1 นาที นำใบกระท่อม อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปั่นให้ละเอียด นำผงกระท่อม 2.5 กรัม สกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จากนั้นปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 9-10 ด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ ammonium hydroxide จากนั้นเติม ethyl acetate ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทิ้งเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปใส่กรวยแยก ทิ้งไว้จนสารแยกจากกันเป็นสองชั้น แล้วเก็บสารละลายชั้นบนของ Ethyl acetate

วิธีที่ 2 ดัดแปลงวิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์ {8} โดยใช้ กรดอะซีติก (acetic acid) ที่อุณหภูมิ 4°C RT 50°C และ 80°C นาน 1 นาที 10 นาที และ 30 นาที โดยทำการทดลองซ้ำสองครั้ง โดยมีวิธีการดังนี้ นำใบกระท่อม อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปั่นให้ละเอียด นำผงกระท่อม 2.5 กรัม สกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตรจากนั้นให้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จากนั้นปรับ pH ให้อยู่ในช่วง9-10 ด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ ammonium hydroxide จากนั้นเติม ethyl acetate ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทิ้งเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 3000รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเก็บสารละลายชั้นบนของ Ethyl acetate

วิธีที่ 3 ดัดแปลงวิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์ {8} โดยใช้ กรดอะซีติก (acetic acid) และตั้งบน Ultrasonicator ที่อุณหภูมิ 4°C RT 50°C และ 80°C นาน 1 นาที 10 นาที และ 30 นาที โดยทำการทดลองซ้ำสองครั้ง โดยมีวิธีการดังนี้ นำใบกระท่อม อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปั่นให้ละเอียด นำผงกระท่อม 2.5 กรัม วางบนเครื่อง Ultrasonicator โดยตั้งเวลา และอุณหภูมิบนเครื่องตามที่กำหนดไว้ในแผนการทดลอง จากนั้นสกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตรจากนั้นให้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จากนั้นปรับ pH ให้อยู่ในช่วง9-10 ด้วย 25 เปอร์เซ็นต์ ammonium hydroxide จากนั้นเติม ethyl acetate ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทิ้งเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 3000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเก็บสารละลายชั้นบนของ Ethyl acetate

3.3 วิธีการแยกสารไมทราไจนีนให้บริสุทธิ์

นำสารละลายในชั้น เอทิล อะซีเตต ระเหยเอทิลอะซีเตตออก ให้ได้มากที่สุด จากนั้นนำมาหยดบนแผ่น TLC โดยควบคุมอัตราการหยดเท่าๆกัน อย่างสม่ำเสมอ โดยใช้เข็มฉีดยาเป็นอุปกรณ์ในการหยด ในการทดลองนี้ใช้ Ethyl acetate และHexane ในอัตราส่วน 7 : 3 ตามลำดับ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้น นำแท้ง TLC มาล้างกลั้วให้ทั่วแท้ง ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ แล้วเทออก เติมวัฏภาคเคลื่อนที่ลงในแท้ง วัดขึ้นมาจากฐานประมาณ 1.5 เซนติเมตร จากนั้นใส่แผ่น TLC ลงไปในแท้ง ปิดฝาแท้ง แล้วจับเวลา เมื่อพิจารณาว่าสารบนแผ่น TLC แยกกันดีแล้ว ก็วัดค่า Rf แล้วขูดแบรนดีที่คาดว่าจะเป็นไมทราไจนีน มากรองเอาซิลิก้าเจลออกด้วยเอทานอล จากนั้นนำสารที่ได้ ไประเหยแล้วนำไปวิเคราะห์ ด้วย เทคนิค FT-IR ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR เพื่อพิสูจน์อัตลักษณ์ ไมทราไจนีน

3.4 วิเคราะห์ ด้วย เทคนิค FTIR ^{1}H-NMR และ ^{13}C- NMR

นำสารที่สกัดได้ ละลายใน $CDCl_3$ นำไปวิเคราะห์ด้วย FTIR (Perkin-Elmer GX FT-IR spectrometer) และNMR โดยสำหรับ ^{1}H-NMR ทำการ Run ที่ chemical shift 0-9 ppm และ ^{13}C- NMR (300 MHz Bruker spectrometer) ทำการ Run ที่ chemical shift 0-200 ppm

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)

3.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี disc diffusion ดัดแปลงจาก CLSI {43} เขี่ยเชื้อ *S. aureus* จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคโลนี ใส่ลง ในอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่น ให้ได้ความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland No. 0.5 จะได้ความเข้มข้นของจำ นวนเซลล์เท่ากับ 1.5×108 CFU/ml การเตรียมแผ่น paper disc โดย เจาะกระดาษกรอง Whatman No.1 ให้มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และเตรียมสารสกัดให้มี ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยละลายด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) จากนั้นดูดสารสกัดที่เตรียมได้แล้ว ปริมาตร 10 µl หยดลงกลางแผ่น paper disc ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง ก่อนใช้ในการทดสอบ ใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อ จุ่มเชื้อทดสอบที่ เตรียมไว้ข้างต้น นำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA จากนั้นใช้ปากคีบปลอดเชื้อ (Sterile forceps) คีบ paper disc ข้างต้น วางบนอาหาร MHA ที่ swab เชื้อแล้ว โดยให้แผ่น paper disc ห่างกัน 15-20 mm และ ห่างจากขอบจานอาหาร 15 mm (ในหนึ่งจานอาหาร เลี้ยงเชื้อจะวางแผ่น paper disc ทั้งหมด 6 แผ่น) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอร์เนีย คาลิปเปอร์ (Vernier calipers)

วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของวงใส หรือบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) รอบ แผ่น paper disc ทั้งหมด 3 ครั้ง และคำนวนหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุม negative control ใช้เป็น DMSO และ positive control ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ Tetracycline เตรียมความเข้มข้นเท่ากับสารตัวอย่าง

3.5.2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MIC) หาค่า MIC โดยวิธี microdilution method ดัดแปลงจาก CLSI {43} เตรียมเชื้อแบคทีเรียตาม วิธีการข้างต้น และเตรียมสารสกัดหยาบที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ เข้มข้น 0-10 mg/ml โดยเจือจางด้วยอาหาร MHB ใน 96 well plate จากนั้นเติมเชื้อที่ ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 1×106 CFU/ml ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การอ่านผลการ ทดลองค่า MIC ให้สังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารที่ ไม่มีเชื้อเจริญเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่ อาหารกับสารสกัด ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อให้บันทึกผลการทดลองเป็น ค่า MIC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ใช้ยาปฏิชีวนะ Tetracycline เป็น positive control โดยเตรียมเช่นเดียวกับสารตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

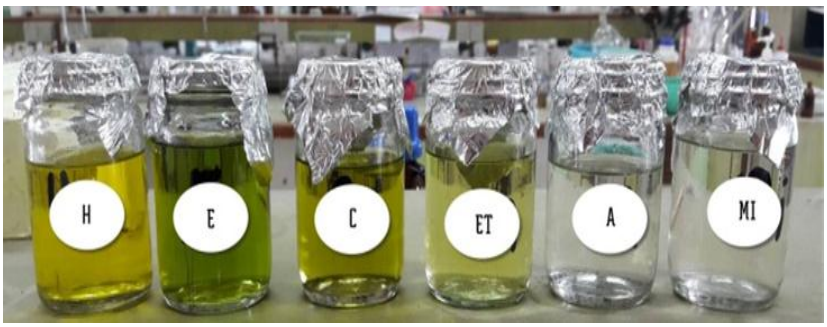
1.ผลการสกัดใบพืชกระท่อมโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้จากพืชกระท่อม

การสกัดพืชกระท่อม ด้วยตัวทำลายดังนี้ 1.เฮกเซน (Hexane) 2.ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)3.เอทธิล อะซีเตท (Ethyl Acetate)4.เอทานอล (ethanol) และ 5.กรดอะซีติก (Acetic acid) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัด 30 นาที ต่อตัวทำละลาย 1 ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่างๆ

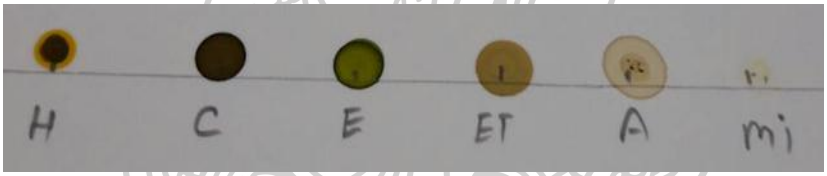
ตัวทำละลาย	**เปอร์เซ็นต์ที่สกัดได้ (% Yield)**
เฮกเซน (Hexane)	0.135
ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)	1.517
เอทธิล อะซีเตท (Ethyl Acetate)	0.523
เอทานอล (ethanol)	20.953
กรดอะซีติก (Acetic acid)	22.862

สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันได้สี และแถบบนแผ่น TLC แตกต่างกัน ดังภาพที่ 7,8 และ 9



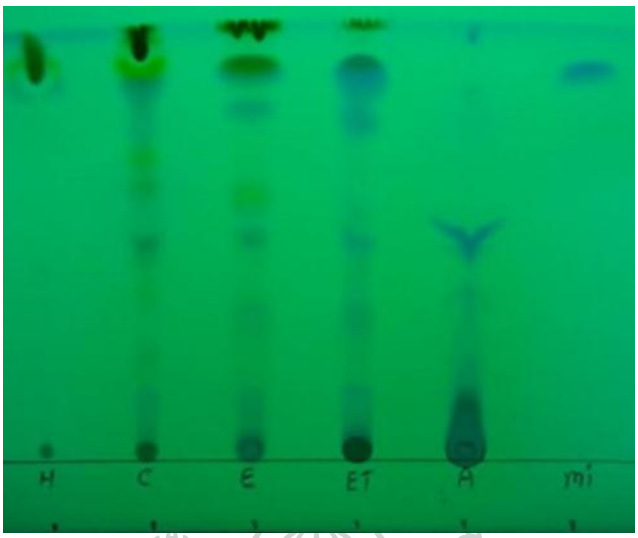
ภาพที่ 7สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

(H = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane, C= สารสกัดด้วยตัวทำละลาย CH2Cl2
E = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ETOAC, ET = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ETOH
และ A = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 % v/v Mi= สาร Mitragynine)



ภาพที่ 8 สีของสารสกัดหยาบเมื่อหยดลงแผ่น TLC

(H = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane, C= สารสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2
E = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ETOAC, ET = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ETOH
และ A = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 % v/v Mi= สาร Mitragynine)



ภาพที่ 9 การแยกสารภายในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค TLC
(H = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane, C= สารสกัดด้วยตัวทำละลาย CH2Cl2,
E = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ETOAC, ET = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ETOH
และ A = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 % v/v Mi= สาร Mitragynine)

2.ผลการทดลองหาวิธีการสกัดแยกสารไมทราไจนีนและเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม 3 วิธี

1.วิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์พื้นฐาน [8]โดยการสกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid)

2.วิธีที่ดัดแปลงเพิ่มเติมด้วยการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid)

3.วิธีดัดแปลงโดยการใช้เครื่อง Ultrasonicator ในขั้นตอนการสกัดด้วยกรดอะซีติก(acetic acid)

2.1 ผลการสกัดสารไมทราไจนีน ด้วยวิธีการสกัดสารอัลคาลอยด์พื้นฐานของ Yubin [8]

จากการทดลอง สกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมอบแห้ง น้ำหนัก 2.5 กรัม ด้วย กรดอะซีติก 50 % v/v ปริมาตร 40 mL ที่อุณหภูมิห้อง (RT) โดยใช้สารละลายแอมโมเนีย 25% ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 9-10 สามารถสกัดได้สารไมทราไจนีน 7.3 mg

เปอร์เซ็นต์ Yield ของสารไมทราไจนีนที่สกัดได้

$$\%\ Yield\ = \frac{7.3}{2500} \times 100$$

ดังนั้น เปอร์เซ็นต์ Yield ของสารไมทราไจนีนที่แยกได้ = 0.292 เปอร์เซ็นต์

*เปอร์เซ็นต์ yield ของสารไมทราไจนีนที่แยกได้เป็นการแยกครั้งแรกในพืชพระท่อม ซึ่ง Yubin [8] ได้ใช้พืชอื่น

2.2 ผลการทดลองแยกสารไมทราไจนีนด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

สารละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมะสม โดยผสมสาร ethyl acetate และ Hexane ในอัตราส่วน ethyl acetate 7: Hexane 3 ดังภาพที่ 7

ภาพที่ 10 แถบของไมทราไจนีนบนแผ่น TLC ที่ R_f 0.5

ค่า R_f สารไมทราไจนีน $= \frac{8}{16}$

ดังนั้น ค่า R_f ของสารไมทราไจนีนบนแผ่น TLC คือ 0.50

2.3 ศึกษาวิธีการสกัด ด้วยการดัดแปลงวิธีการสกัดสารอัลคาลอยด์พื้นฐานของ Yubin[8]

โดยใช้กรดอะซีติก *(acetic acid) 50* % v/v ปริมาตร 40 mL และ การใช้ Ultra sonicator ที่อุณหภูมิ และเวลาแตกต่างกัน

2.3.1 ผลการทดลองการสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมโดยใช้ กรดอะซีติค*(acetic acid)* 50 % v/v ที่อุณหภูมิ และเวลาในการสกัดต่างกัน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบอุณหภูมิและเวลาการสกัดไมทราไจนีน

อุณหภูมิในการสกัด	เวลา (นาที)	(%yield)
4 °C	1	0.8866±0.0093fg
	10	0.9108±0.0096ef
	30	1.0433±0.0499e
RT	1	0.6972±0.0279i
	10	0.8745±0.0092fg
	30	1.4200±0.0679d
50°C	1	0.7294±0.0292hi
	10	0.8624±0.0091fg
	30	0.8032±0.0384fgh
80°C	1	1.5878±0.0635c
	10	2.3374±0.0246b
	30	2.6910±0.1287a
F-test (α=0.05)		*

หมายเหตุ ใช้การจัดกลุ่มทางสถิติ ANOVA Completely Randomized Design (CRD)ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (n=2)

กรณีที่ 1 การเปรียบเทียบโดยใช้เวลาเป็นเกณฑ์สามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ดังนี้

เวลา 1 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดคือ 80°C = 1.5878±0.0635 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดคือ RT = 0.6972±0.0279 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เวลา 10 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดคือ 80°C = 2.3374±0.0246 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดคือ 50°C = 0.8624±0.0091 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เวลา 30 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดคือ 80°C = 2.6910±0.1287 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดคือ 50°C = 0.8032±0.0384 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

กรณีที่ 2 การเปรียบเทียบโดยใช้อุณหภูมิเป็นเกณฑ์ สามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ดังนี้

อุณหภูมิ 4 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดเวลา 30 นาที = 1.0433±0.0499 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดที่เวลา 1 นาที = 0.8866±0.0093 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ RT สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดเวลา 30 นาที = 1.4200±0.0679 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดที่เวลา 1 นาที = 0.6972±0.0279 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ 50 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดเวลา 10 นาที = 0.8624±0.0091 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดที่เวลา 1 นาที = 0.7294±0.0292 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ 80 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดเวลา 30 นาที = 2.6910±0.1287 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดที่เวลา 1 นาที = 1.5878±0.0635 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 ผลศึกษาวิธีการสกัด ด้วยการดัดแปลงวิธีการสกัดสารอัลคาลอยด์พื้นฐานของ Yubin [8] โดยใช้กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 % v/v ปริมาตร 40 mL ร่วมกับการใช้ Ultrasonicator ที่อุณหภูมิ และเวลาแตกต่างกัน

ผลจากการทดลอง การสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมโดยใช้ กรดอะซีติค (acetic acid) 50 % v/v ร่วมกับการใช้ Ultra sonicator ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบอุณภูมิ และเวลาในการสกัดไมทราไจนีน (%yild)
จากใบกระท่อมโดยใช้ กรดอะซีติก (acetic acid) + Ultra sonicator

อุณหภูมิในการสกัด	เวลา (นาที)	(%yield)
4 °C	1	0.5216±0.0429e
	10	1.1882±0.0568c
	30	0.6127±0.0293e
RT°C	1	0.0333±0.0638f
	10	1.7595±0.0841a
	30	1.6353±0.0782ab
50°C	1	0.0249±0.0477f
	10	0.8860±0.0424d
	30	1.8257±0.0873a
80°C	1	0.6249±0.0289e
	10	0.5713±0.0273e
	30	0.0249±0.0477b
F-test (α=0.05)		*

หมายเหตุ ใช้การจัดกลุ่มทางสถิติ ANOVA Completely Randomized Design (CRD) ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (n=2)

กรณีที่ 1 การเปรียบเทียบโดยใช้เวลาเป็นเกณฑ์สามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ดังนี้

เวลา 1 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดคือ 4°C = 0.5216±0.0429 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดคือ 80°C = 0.0151±0.0289 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เวลา 10 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดคือ RT = 1.7595±0.0841 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดคือ 80°C = 0.5713±0.0273 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เวลา 30 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดคือ 50°C = 1.8257±0.0873 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดคือ 4°C = 0.6127±0.0293 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

กรณีที่ 2 การเปรียบเทียบโดยใช้อุณหภูมิเป็นเกณฑ์ สามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ดังนี้

อุณหภูมิ 4 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดเวลา 10 นาที = 1.1882±0.0568 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดที่เวลา 1 และ 30นาที = 0.5216±0.0429 และ 0.5216±0.0429 %yield ตามลำดับ(1นาที และ30 นาที เป็นค่าต่ำสุดทั้งคู่เพราะมีค่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ RT สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดเวลา 10 นาที = 1.7595±0.0841 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดที่เวลา 1 นาที = 0.0333±0.0638 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ 50 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดเวลา 30 นาที = 1.8257±0.0873 %yield และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดที่เวลา 1 นาที = 0.0249±0.0477 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิ 80 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้มากที่สุดเวลา 1 และ 10 นาที = 0.6249±0.0289 และ0.5713±0.0273 %yield ตามลำดับ(1นาที และ10 นาที เป็นค่าสูงสุดทั้งคู่

เพราะมีค่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) และสามารถสกัดไมทราไจนีนได้น้อยที่สุดที่เวลา 30 นาที = 0.0249±0.0477 %yield ค่าสูงสุดและต่ำสุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.3.3 ผลการเปรียบเทียบวิธีการสกัด ด้วยการดัดแปลงวิธีการสกัดสารอัลคาลอยด์พื้นฐานของ Yubin [3] โดยใช้กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 % v/v และวิธีการสกัด ด้วยการดัดแปลงวิธีการสกัดสารอัลคาลอยด์พื้นฐานของ Yubin [3] โดยใช้กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 % v/v ร่วมกับการใช้ Ultra sonicator ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบวิธีการสกัด
โดยใช้กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 % v/v ปริมาตร 40 mL และวิธีการสกัด โดยใช้กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 % v/v ปริมาตร 40 mL ร่วมกับการใช้ Ultrasonicator

อุณหภูมิในการสกัด	เวลา (นาที)	Acetic acid (%yield)	Acetic acid + ultra sonicator (%yield)
4 °C	1	0.8866±0.0093jkl	0.5216±0.0429p
	10	0.9108±0.0096jk	1.1882±0.0568hi
	30	1.0433±0.049ij9	0.6127±0.0293op
RT°C	1	0.6972±0.0279lmo	0.0333±0.0638q
	10	0.8745±0.0092jkl	1.7595±0.0841cd
	30	1.4200±0.0679fg	1.6353±0.0782de
50°C	1	0.7294±0.0292klm	0.0249±0.0477j
	10	0.8624±0.0091jkl	0.8860±0.0424jkl
	30	0.8032±0.0384kl	1.8257±0.0873c
80°C	1	1.5878±0.0635def	0.6249±0.0289op
	10	2.3374±0.0246b	0.5713±0.0273op
	30	2.6910±0.1287a	0.0249±0.0477q
F-test (α=0.05)		*	*

หมายเหตุ ใช้การจัดกลุ่มทางสถิติ ANOVA Completely Randomized Design (CRD) ข้อมูลทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (n=2)

จากการใช้ การคำนวณทางสถิติ Post Hoc Tests จากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ Yield เปรียบเทียบ วิธีการสกัด โดยใช้กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 % v/v ปริมาตร 40 mL และวิธีการสกัด โดยใช้กรดอะซีติก (acetic acid) ความเข้มข้น 50 % v/v ปริมาตร 40 mL ร่วมกับการใช้ Ultra sonicator พบว่า

อุณหภูมิ 4 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนมากที่สุดด้วยวิธีการใช้ acetic acidร่วมกับ Ultra sonicator เป็นเวลา 10 นาที ได้ %yield = 1.1882±0.0568

อุณหภูมิ RT สามารถสกัดสารไมทราไจนีนมากที่สุดด้วยวิธีการใช้ acetic acidร่วมกับ Ultra sonicator เป็นเวลา 10 นาที ได้ %yield = 1.7595±0.0841

อุณหภูมิ 50 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนมากที่สุดด้วยวิธีการใช้ acetic acidร่วมกับ Ultra sonicator เป็นเวลา 30 นาที ได้ %yield = 1.8257±0.0873

อุณหภูมิ 80 °C สามารถสกัดสารไมทราไจนีนมากที่สุดด้วยวิธีการใช้ acetic acid เป็นเวลา 30 นาที ได้ %yield = 2.6910±0.1287 ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้ %yield มากที่สุดเมื่อเทียบกับทุกวิธีการสกัด

เมื่อรวมรวมสารไมทราไจนีนที่ขูดเก็บออกมาจากแผ่น TLC ในระยะ R_f ประมาณ 0.56 แล้วนำไป วิเคราะห์การแยกสารด้วยเทคนิค TLC อีกครั้ง ผลปรากฏว่า ได้แถบเป็นทรงกลมมนไม่มีหางแบรน ดังภาพที่

ภาพที่ 11 แถบสารไมทราไจนีน

3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีน ด้วยเทคนิค FTIR ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR

3.1 พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีน ด้วยเทคนิค FTIR

Spectrum ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค FTIR พบว่า ปรากฏพีคการดึงและยืดของพันธะ C-H ที่ 2950 cm^{-1}พีคของ C-C และ C=C ของอโรมาติก เกิดที่ 1462 cm^{-1}-1500cm^{-1},1580 cm^{-1}-1698 cm^{-1} พีคการยืดของหมู่คาร์บอนิลที่ 1702 cm^{-1} พีคของ C-O จากพันธะเอสเทอร์เกิดที่ 1284 cm^{-1}และพีคของ N-H เกิดที่>3000 cm^{-1}ซึ่งตรงกับหมู่ฟังก์ชันของ Mitragynine

3.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีน ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR

ตารางที่ 5 ค่า Chemical Shift ของ Protron แต่ละชุดที่ได้จากเทคนิค ^{1}H-NMR

ตำแหน่ง	Chemical shift, ppm	Chemical shift, ppm (อ้างอิง)[39]
1	7.75 (1H,s,-N<u>H</u>)	7.79 (1H,s,-N<u>H</u>)
2	7.45-6.45 (3H,m,Ar-<u>H</u>)	7.42-6.45 (3H,m,Ar-<u>H</u>)
3	6.45 (1H,s,=CH)	6.43 (1H,s,=CH)
4	3.85 (3H,s,-O-CH_3)	3.86 (3H,s,-O-CH_3)
5	3.73 (3H,s,-O-CH_3)	3.71 (3H,s,-O-CH_3)
6	3.75 (3H,s,-O-CH_3)	3.70 (3H,s,-O-CH_3)
7	3.01-2.99 (4H,m,-N-CH_2)	3.01-2.99 (4H,m,-N-CH_2)
8	2.98 (1H,s,-CH)	2.98 (1H,s,-CH)
9	2.30-2.60 (2H,m, -CH_2)	2.25-2.51 (2H,m, -CH_2)
10	2.55 (1H,s,-CH)	2.50 (1H,s,-CH)
11	1.65 (1H,s,-CH)	1.63 (1H,s,-CH)
12	1.50-2 (2H,m,-CH_2)	1.80-1.77 (2H,m,-CH_2)
13	1.35-1.15 (2H,m,-CH_2)	1.53-1.33 (2H,m,-CH_2)
14	0.85 (3H,t,J=7.5 Hz)	0.862 (3H,t,J=7.5 Hz)

3.3 พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารไมทราไจนีน ด้วยเทคนิค ^{13}C-NMR

ตารางที่ 6 ค่า Chemcal shifts ของ Carbon แต่ละชุดที่ได้จากเทคนิค ^{13}C-NMR

ตำแหน่ง	**Chemical shift ,ppm**	**Chemical shift ,ppm(อ้างอิง) [39]**
1	169.30	169.20
2	160.62	160.50
3	154.41	154.40
4	137.33	137.20
5	133.72	133.60
6	121.67	121.70
7	117.55	117.60
8	111. 42	111.40
9	107.56	107.70
10	104.36	104.10
11	99.61	99.60
12	61.30	61.20
13	57.70	57.70
14	55.29	55.30
15	53.75	53.70
16	51.34	51.30
17	40.62	40.60
18	39.9	39.80
19	29.80	29.80
20	24.00	23.80
21	19.10	19.00
22	12.85	12.80

4.ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ (crude extract) และสารสกัดไมทราไจนีน จากพืชกระท่อมด้วยวิธี disc diffusion และ Minimum inhibitory concentration

4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ด้วยเทคนิค disk diffusion techniques ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 Inhibition zone (mm.) ที่วัดได้จากวิธีการ agar disc diffusion ของสารสกัด เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เอทธิล อะซีเตท (Ethyl Acetate) เอทานอล (ethanol) กรดอะซีติก (Acetic acid) และ Mi สารไมทราไจนีน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli*

ความเข้มข้น (mg/mL)	แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	Inhibition zone (mm)							
		H	D	E	Et	A	Mi	P	N
10	*S aureus*	NA	NA	NA	NA	5.52±0.44	4.35±0.68	7.52±0.35	NA
	E. coli	NA	NA	NA	NA	4.65±1.02	NA	6.82±0.45	NA

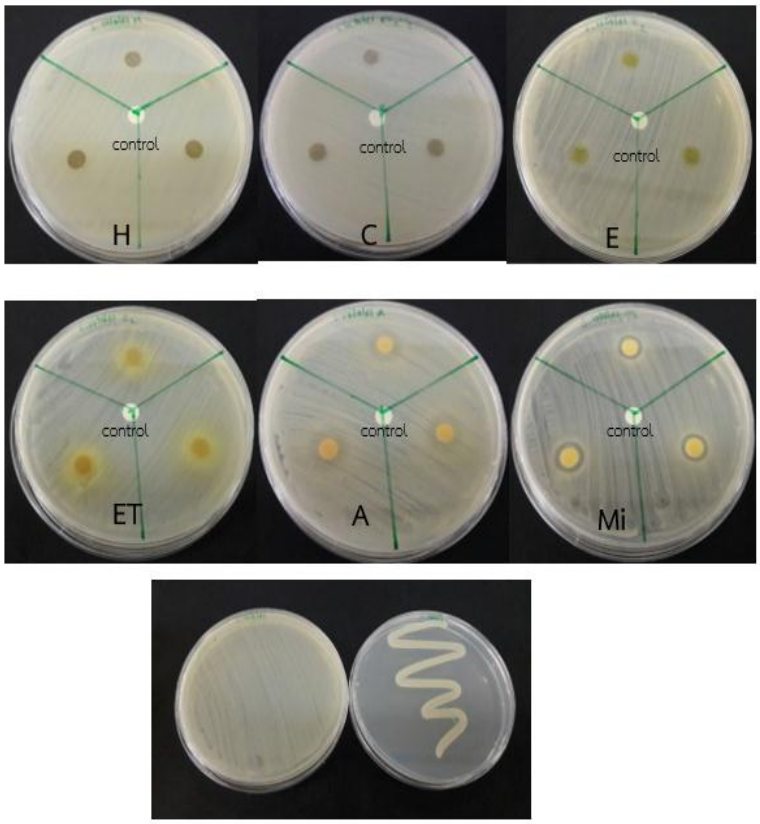
หมายเหตุ ค่า a-c คือการจัดกลุ่มทางสถิติ ANOVA Completely Randomized Design (CRD)

NA = No Activity

(H = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane D= สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Dichloromethane,
E = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl Acetate ET = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol ,
A = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย กรดอะซีติก (Acetic acid) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์,
Mi= สาร Mitragynine P=Positive Control (Tetracycline) และ N=Negative Control (DMSO))

จากตารางที่ 7 พบว่า ที่ความเข้มข้น 10มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบการต้านแบคทีเรียดังนี้

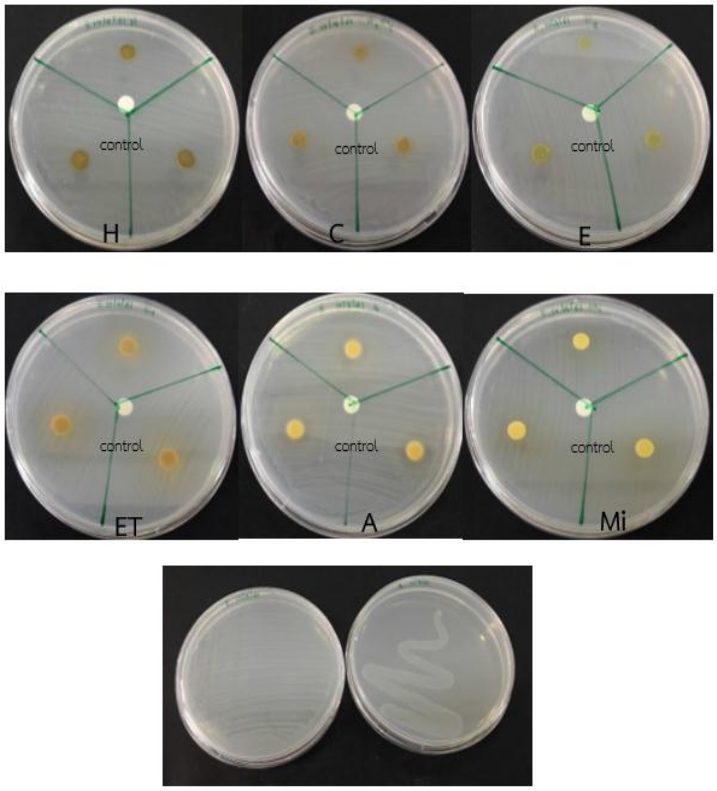
เชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* พบว่ามีการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากกระท่อมเพียง 2 ชนิด ดังนี้ สารสกัดหยาบ Acetic acid 50 % v/v และ สารไมทราไจนีน พบInhibition zoneดังนี้ 5.52±0.44 และ 4.35±0.68 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งสารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การทดลองต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*

(H = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane, C= สารสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 E = สารสกัดด้วยตัวทำละลายม, ETOAC ET = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ETOH A = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ และ Mi= สาร Mitragynine)

เชื้อแบคทีเรีย *E.coli* มีเพียงสารสกัดหยาบ 50 เปอร์เซ็นต์ Acetic acid เพียงอย่างเดียวเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบ Inhibition zone 4.65±1.02 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 13

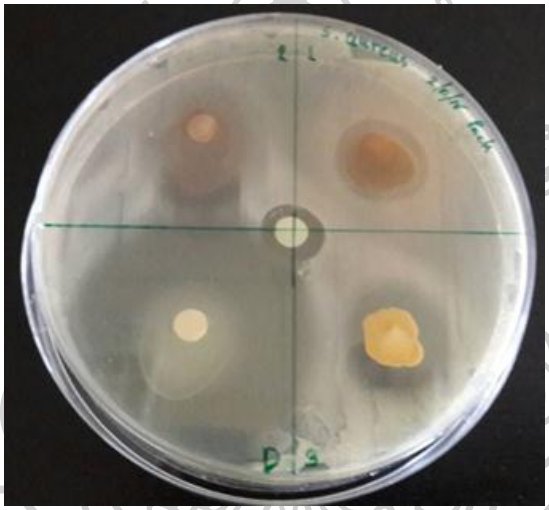


ภาพที่ 13 การทดลองการต้านเชื้อ *E.coli*

(H = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Hexane, C= สารสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 E = สารสกัดด้วยตัวทำละลายม, ETOAC ET = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ETOH A = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ และ Mi= สาร Mitragynine)

3.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ Mitragynine และยาปฏิชีวนะ Tetracycline

พบว่า ในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli* ของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ Mitragynine ความเข้นข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่ำกว่าการต้านเชื้อแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะ. Tetracycline ที่ความเข้มข้นเดียวกัน การต้านเชื้อ *S. aureus* พบ Inhibition zone 4.52±0.52 และ 3.62±0.64 และ 7.52±0.35 มิลลิเมตรตามลำดับ การต้านเชื้อ *E. coli* พบInhibition zone 3.52±0.43 และ 5.22±0.24 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 14 และ 15



ภาพที่ 14 การทดลองต้านเชื้อแบคทีเรีย S.*aureus*

สารสกัดหยาบ Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ ไมทราไจนีน จากกระท่อม และยา

(A = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ Mi= สาร Mitragynine

D=ยา Tetracycline)

ภาพที่ 15 การทดลองต้านเชื้อแบคทีเรีย *E.coli*

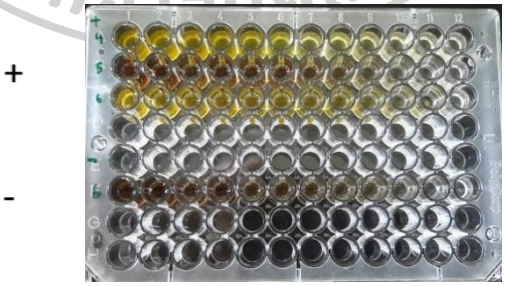
สารสกัดหยาบ Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ จากกระท่อม และ ยา Tetracycline

(A = สารสกัดด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ D=ยา Tetracycline)

3.3 ผลการทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) OD_{600} = 0.05

สารตัวอย่างถูกทดสอบความเข้มข้นในช่วง 0 ถึง 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อหาค่าความเข้มข้น ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) OD_{600} = 0.05



ภาพที่ 16 หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

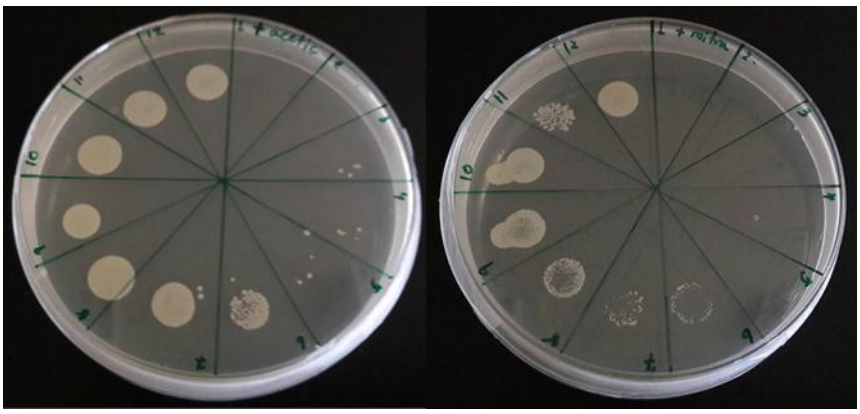
(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* และ แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ และสารไมทราไจนีน ที่ความเข้มข้น 0,0.5,1,2,3,4,5,6,7,8,9 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 8 ความเข้มข้น ต่ำสุดที่สามารถต้านแบคทีเรียได้
(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) OD_{600} = 0.05

	S.aureus		*E.coli*
ความเข้มข้นสาร สกัด มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร	**50%Acetic acid**	**Mitragynine**	**50% Acetic acid**
0	++	++	++
0.5	++	++	++
1	++	++	++
2	++	++	++
3	++	++	++
4	++	++	++
5	++	++	++
6	--	--	++
7	--	--	++
8	--	--	++
9	--	--	--
10	--	--	--

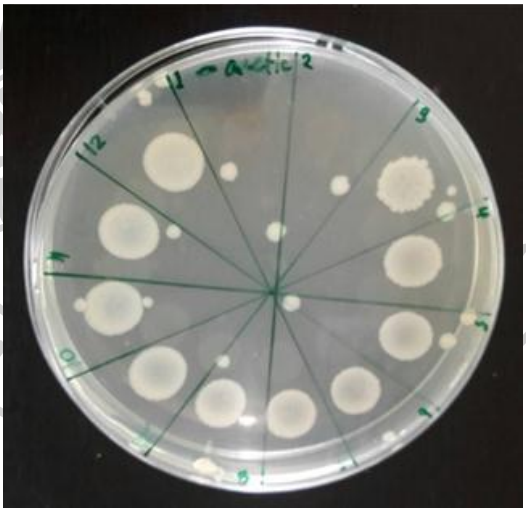
หมายเหตุ ++ หมายถึง จุลินทรีย์เจริญเติบโต
-- หมายถึง แบคทีเรียไม่เจริญเติบโต

จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของแบคทีเรียแกรมบวก *S.aureus* โดยสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ และสารไมทราไจนีน มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ 6 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร เหมือนกันทั้งสองชนิด และแบคทีเรียแกรมลบ *E.coli* โดยสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ 9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังภาพที่ 18 และ 19



ภาพที่ 17 หาค่าความเข้มข้น ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของแบคทีเรียแกรมบวก *S.aureus* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ และสารไมทราไจนีน ที่ความเข้มข้นดังนี้ 12= 0 11= 0.5 10=1 9=2 8=3 7=4 6=5 7=6 4=7 3=8 2=9 และ 1=10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 18 หาค่าความเข้มข้น ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของแบคทีเรียแกรมลบ *E.coli* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย Acetic acid 50 เปอร์เซ็นต์ และสารไมทราไจนีน ที่ความเข้มข้นดังนี้ 12= 0 11= 0.5 10=1 9=2 8=3 7=4 6=5 7=6 4=7 3=8 2=9 และ 1=10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 5

บทสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

บทสรุป อภิปรายผล

1.ทดลองวิธีการสกัดใบพืชกระท่อมโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้

ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารสกัดหยาบจากพืชกระท่อมออกมาได้มากที่สุดคือ กรดอะซีติก (Acetic acid) 22.862 % Yield และสกัดสารสกัดหยาบได้น้อยที่สุดคือ เฮกเซน (Hexane) 0.135 % Yield

2. ทดลองหาวิธีการสกัด แยกสารไมทราไจนีน และเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากพืชกระท่อม 3 วิธี ดังนี้ 1. วิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์พื้นฐาน[8]โดยการสกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid) 2.วิธีที่ดัดแปลงเพิ่มเติมด้วยการเพิ่มอุณหภูมิ และเวลาในขั้นตอนการสกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid) และ3.วิธีดัดแปลงโดยการใช้เครื่อง Ultrasonicator ในขั้นตอนการสกัดด้วย กรดอะซีติก (acetic acid)

การทดลองนี้ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัด และการแยกสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม ในเชิงปริมาณ และความรวดเร็วของวิธีการสกัด โดยทดลองสกัดสารไมทราไจนีนจากวิธีที่นิยมใช้สกัดสารอัลคาลอยด์ทั่วไป และ วิธีที่ดัดแปลงเพิ่มเติมคือ การใช้ความร้อน และเครื่อง Ultrasonicater ในขั้นตอนการสกัดด้วย acetic acid เพื่อใช้เป็น สารมาตรฐานในการตรวจพิสูจน์พยานหลักฐานต่างๆ ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์ที่คาดว่าจะมีส่วนผสมของใบกระท่อม เพื่อประโยชน์ที่จะสามารถพัฒนาให้การตรวจพิสูจน์น้ำต้มกระท่อม หรือ วัตถุพยานที่มีส่วนผสมของใบกระท่อมง่ายขึ้น จากผลการทดลอง เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 % จะเห็นได้ว่าในวิธีการส่วนใหญ่ จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสามารถพิจารณาความเหมาะสมในการสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมได้ดังนี้

การพิจารณาโดยใช้ปริมาณที่สกัดได้เป็นสำคัญ จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดโดยใช้ acetic acid , acetic acid ร่วมกับการให้ความร้อน และ acetic acid ร่วมกับการใช้เครื่อง Ultrasonicater ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารไมทราไจนีนออกจากใบกระท่อมคือ วิธีการสกัดด้วยวิธีการใช้ acetic acid ร่วมกับการให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 80 °C เวลา 30 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนมากที่สุดได้ %yield = 2.6910±0.1287 ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้ %yield มากที่สุดเมื่อเทียบกับทุกวิธีการสกัด

การพิจารณาโดยใช้ปริมาณและความเร็วในการสกัดเป็นสำคัญ จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัด โดยใช้ acetic acid , acetic acid ร่วมกับการให้ความร้อน และ acetic acid ร่วมกับการใช้เครื่อง Ultrasonicater ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารไมทราไจนีนออกจากใบกระท่อมคือ วิธีการสกัดด้วยการใช้ acetic acid ร่วมกับการใช้ความร้อนอุณหภูมิ 80 °C ที่เวลา1 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้ = 1.5878±0.0635 %yield ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่สุดที่สามารถสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมได้มากกว่า วิธีการสกัดสารอัลคาลอยทั่วไป

การพิจารณาโดยใช้ปริมาณและความเร็วรวมถึงความคุ้มค่าในการประหยัดพลังงานในการสกัดเป็นสำคัญ จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัด โดยใช้ acetic acid , acetic acid ร่วมกับการให้ความร้อน และ acetic acid ร่วมกับการใช้เครื่อง Ultrasonicater ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารไมทราไจนีนออกจากใบกระท่อมคือ การใช้วิธีการสกัดโดย acetic acid ที่อุณหภูมิห้อง (RT) เป็นเวลา 30 นาที สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้ = 1.5878±0.0635 %yield ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วและประหยัดพลังงานมากที่สุดที่สามารถสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมได้มากกว่าวิธีการสกัดสารอัลคาลอยทั่วไป

จะเห็นได้ว่าวิธีการสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อม การใช้วิธีเพิ่มความร้อน เพิ่มเวลา รวมถึงเพิ่มการใช้ เครื่องUltrasonicater มีผลทำให้สามารถสกัดสารไมทราไจนีนจากใบกระท่อมได้จำนวนเพิ่มมากยิ่งขึ้น ซึ่งหากใช้การเปรียบเทียบโดยสถิติ การใช้วิธีการดั้งเดิมในการสกัดสารอัลคาลอย เพื่อใช้สกัดสารไมทราไจนีน ถึงแม้จะใช้เวลาน้อยเพียงแค่ 1 นาที ในอุณหภูมิห้อง แต่สามารถสกัดสารไมทราไจนีนได้น้อยกว่าวิธีการเพิ่มความร้อน เพิ่มเวลา รวมถึงเพิ่มการใช้เครื่อง Ultrasonicater ซึ่งผล %Yield แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแนวโน้มการสกัดได้เพิ่มขึ้นของ

%Yield ไมทราไจนีน เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของเวลา และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น รวมถึงการใช้เครื่อง Ultrasonicater

3.ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ (crude extract) และสารสกัดไมทราไจนีนจากพืชกระท่อมด้วยวิธี disc diffusion และ Minimum inhibitory concentration

สารสกัดจากพืชกระท่อมที่มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli* ได้นั้นมีเพียงสารสกัดไมทราไจนีน และ สารสกัดหยาบ 50 เปอร์เซ็นต์ Acetic acid ในสารสกัดไมทราไจนีน มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* ความเข้มข้นต่ำสุด 6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบ 50 เปอร์เซ็นต์ Acetic acid มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli* โดยใช้ความเข้มข้นต่ำสุด 6 และ 9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบ Hexane, Dichloromethane, Ethyl Acetate และ ethanol ไม่พบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *S.aureus* และ *E.coli*

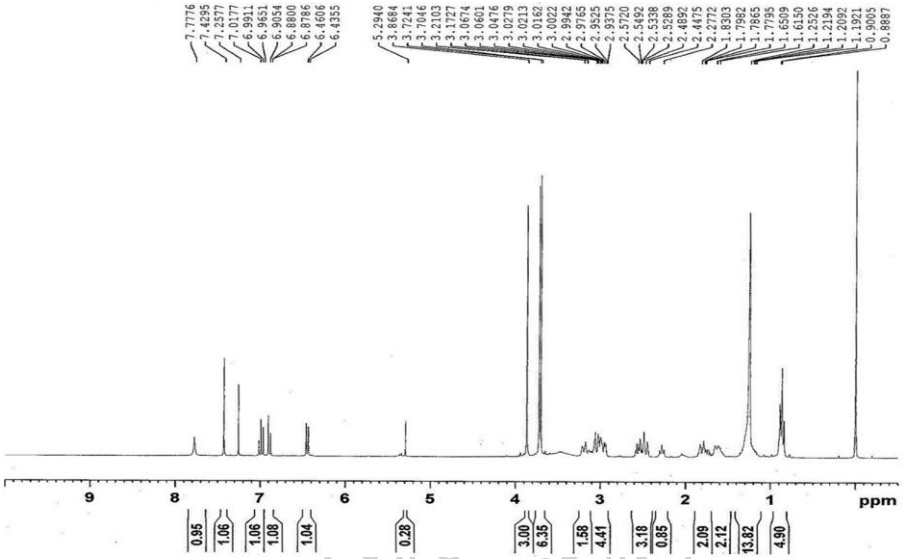
ซึ่งผลการทดลองนั้นก็มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับการกล่าวถึงสรรพคุณสูตรยาของหมอพื้นบ้านหรือหมอแผนโบราณที่ใช้พืชกระท่อมเข้าเป็นตัวยาในตำรับพวกประเภทยาแก้ท้องเสียและรักษาแผลหนอง รวมถึงงานวิจัยต่างประเทศที่กล่าวว่า กระท่อมถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการติดเชื้อของแผล และ โรคอุจจาระร่วง [40-43]ซึ่งมีผลมาจาก *S.aureus* ซึ่งเป็นปรสิตที่ผิวหนังของคนและสัตว์ เป็นสาเหตุทำให้เกิดฝีแผลพุพองและ เกิดการติดเชื้อ และ *E.coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดอาการ ท้องเสียบ่อยที่สุด ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ การต้านเชื้อแบคทีเรียนั้น แตกต่างกันออกไปตามชนิดของสารที่อยู่ในกระท่อม (เมื่อพิจารณาจาก ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน) และยังขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับของสารนั้นๆ ด้วย

ข้อเสนอแนะ

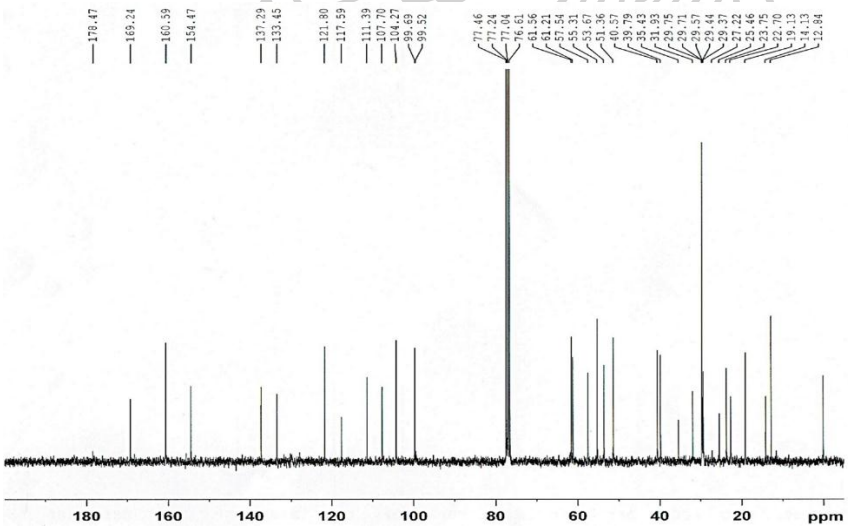
อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาสารพฤกษเคมีที่สำคัญของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ดังกล่าวอย่างละเอียดและศึกษาการใช้ในมนุษย์เพื่อยืนยันสมบัติก่อนนำไปใช้ในทางคลินิกต่อไป ซึ่งการทดลองนี้อาจเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้ผู้สนใจ และผู้ที่เกี่ยวข้องเห็นความสำคัญ และนำพืชกระท่อมไปพัฒนาเป็นตัวยาจากธรรมชาติที่ปลอดภัย เพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะในอนาคตได้

ภาคผนวก

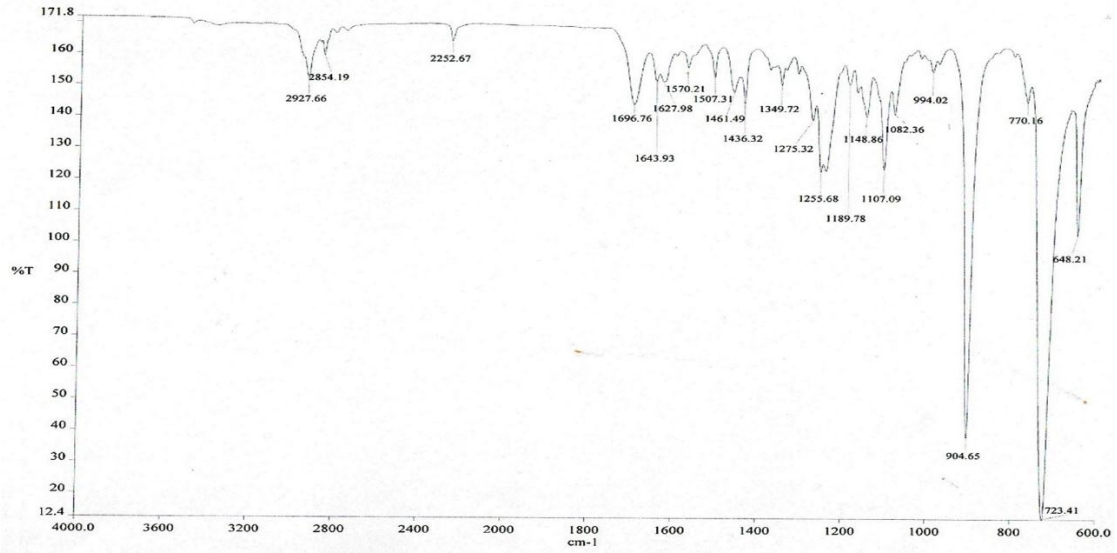
^{1}H-NMR spectrum of mitragynine



^{13}C-NMR spectrum of mitragynine



FT-IR spectrum of mitragynine



มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

1. กระทรวงยุติธรรม., ส.ป.ป.ส., รวมกฎหมายยาเสพติดพร้อมด้วยกฎกระทรวง ระเบียบข้อบังคับที่เกี่ยวข้อง. 2556, กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดบางกอกบล็อก.
2. เบญจกุล, ส. หลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์กับกระบวนการยุติธรรม. 2560 3 กุมภาพันธ์ 2561]; Available from: http://www.manager.co.th/Daily/ViewNews.aspx?NewsID=9500000087821.
3. Grewal, K.S., *OBSERVATIONS ON THE PHARMACOLOGY OF MITRAGYNINE.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1932. 46(3): p. 251.
4. Grewal, K.S., *THE EFFECT OF MITRAGYNINE ON MAN.* British Journal of Medical Psychology, 1932. 12(1): p. 41-58.
5. Harizal, S.N., et al., *Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of Mitragyna speciosa Korth in Rodent.* Journal of Ethnopharmacology, 2010. 131(2): p. 404-409.
6. อยุธยา, ส.อ.แ.อ.ศ.ณ., พืชใบพืชกระท่อมในสังคมไทย. 2548, สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม,ห้างหุ้นส่วนจำกัดบางกอกบล็อก. 179.
7. กระทรวงสาธารณสุข, ส.ส., *ICD-10-TM :* บัญชีจำแนกโรคระหว่างประเทศฉบับประเทศไทย อังกฤษ-ไทย เล่มที่ 1 ตารางการจัดกลุ่มโรค ฉบับปี 2009. 2009, นนทบุรี: สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข, 2552.
8. Yubin, J., *The extraction, separation and purification of alkaloids in the natural medicine.* Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2014: p. 338-345.
9. เต็ม.สมิตินันท์, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. 2557, กรุงเทพฯ: จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด: บรรณาธิการ หน่วยระบาดวิทยา คณะ แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
10. สำนักงานคณะกรรมการปราบปรามยาเสพติด, สถานการณ์ พืชกระท่อม ปี2555. 2555: กระทรวงยุติธรรม.
11. ป.ป.ส.กระทรวงยุติธรรม, ส. พืชกระท่อม. 16 พฤษภาคม 2561]; Available from: https://www.oncb.go.th/ncsmi/cottage1/ข้อมูลพื้นฐาน%20พืชกระท่อม.docx.
12. หวังสินทวีกุล, จ., พืชออกฤทธ์ต่อจิตประสาท. 2554, สงขลานีโอพ้อยท์: เภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

13. สาวิตรี อัษณางค์กรชัย, et al., บทสรุปของพืชกระท่อม. 2558.
14. กระทรวงสาธารณสุข, ก. อัลพาโซแลม Available from: https://www.dmh.go.th/news/view.asp?id=849.
15. บุรมรา, น., การหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย. 2554, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
16. Orio, L., et al., *UAE, MAE, SFE-CO2 and classical methods for the extraction of Mitragyna speciosa leaves.* Ultrasonics Sonochemistry, 2012. 19(3): p. 591-595.
17. Mohan K, Jeyachandran R, and Deepa, *Alkaloids as anticanceragents. Ann Phytomed* 2012. 1: p. 46 – 53.
18. Pradip, G., et al., *Recent alkaloids from Dalbergia sissoo and various herbs as anticancer agents.* Interna tional Journal of Traditional System of Medicine, 2014. 1: p. 28-33.
19. Lu, J.-J., et al., *Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012. 2012.
20. Consult, F. and O. Henry, *Kratom, a Legal Drug of Abuse.*
21. Boyer, E.W., et al., *Self-treatment of opioid withdrawal using kratom (Mitragynia speciosa korth).* Addiction, 2008. 103(6): p. 1048-1050.
22. Tungtananuwat, W. and S. Lawanprasert, *Fatal 4x100; home-made kratom juice cocktail.* Journal of Health Research, 2010. 24(1): p. 43-47.
23. Neerman, M.F., R.E. Frost, and J. Deking, *A drug fatality involving Kratom.* Journal of forensic sciences, 2013. 58: p. S278-S279.
24. อินทนนท์, ถ., การประเมินผลกระทบของการใช้ยาเสพติด 2550, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: สงขลา.
25. Kowalczuk, A.P., A. Łozak, and J.K. Zjawiony, *Comprehensive methodology for identification of Kratom in police laboratories.* Forensic Science International, 2013. 233(1): p. 238-243.
26. Sukrong, S., et al., *Molecular analysis of the genus Mitragyna existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: Mitragyna speciosa.* Biological and Pharmaceutical Bulletin,

2007. 30(7): p. 1284-1288.

27. Chittrakarn, S., P. Penjamras, and N. Keawpradub, *Quantitative analysis of mitragynine, codeine, caffeine, chlorpheniramine and phenylephrine in a kratom (Mitragyna speciosa Korth.) cocktail using high-performance liquid chromatography.* Forensic science international, 2012. 217(1-3): p. 81-86.

28. Chan, K.B., C. Pakiam, and R.A. Rahim, *Psychoactive plant abuse: the identification of mitragynine in ketum and in ketum preparations.* Bull Narc, 2005. 57(1-2): p. 249-56.

29. Field, E., *Mitragynine and mitraversine, two new alkaloids from species of mitragyne.* Journal of the Chemical Society, Transactions, 1921. 119: p. 887-891.

30. Joshi, B., RAYMONDHAMET, and W. Taylor, *Structure of mitragynine (9-methoxycorynantheidine).* CHEMISTRY & INDUSTRY, 1963(14): p. 573-573.

31. Macko, E., J. Weisbach, and B. Douglas, *Some observations on the pharmacology of mitragynine.* Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie, 1972. 198(1): p. 145.

32. ประดับ, นิวัตแก้วประดับ., การศึกษาสารกลุ่มอินโดลแอลคาลอยด์จากต้น.

33. Rueffer, M., N. Nagakura, and M.H. Zenk, *Strictosidine, the common precursor for monoterpenoid indole alkaloids with 3 α and 3 β configuration.* Tetrahedron Letters, 1978. 19(18): p. 1593-1596.

34. Kruegel, A.C., et al., *Synthetic and receptor signaling explorations of the Mitragyna alkaloids: mitragynine as an atypical molecular framework for opioid receptor modulators.* Journal of the American Chemical Society, 2016. 138(21): p. 6754-6764.

35. Casey, C.R., et al., *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): p. 1-14.

36. เสนะวีระกุล, ว., การตรวจพิสูจน์ *Mitragynine* เชิงคุณภาพในนÊ้าต้มกระท่อม ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟ, in (เภสัชวิทยา). 2533, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.: กรุงเทพฯ.

37. Fuenffinger, N., et al., *Evaluation of ion mobility spectrometry for the detection of mitragynine in kratom products.* Journal of pharmaceutical and biomedical

analysis, 2017. 134: p. 282-286.

38. Lee, M.J., et al., *Method validation in quantitative analysis of phase I and phase II metabolites of mitragynine in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Analytical biochemistry, 2018. 543: p. 146-161.

39. Shamima, A.R., et al., *Antinociceptive action of isolated mitragynine from Mitragyna speciosa through activation of opioid receptor system.* International journal of molecular sciences, 2012. 13(9): p. 11427-11442.

40. Suwanlert, S., *A study of kratom eaters in Thailand.* Bulletin on narcotics, 1975.

41. Said, I.M., N.C. Chun, and P.J. Houghton, *Ursolic acid from Mitragyna speciosa.* Planta medica, 1991. 57(04): p. 398-398.

42. Prozialeck, W.C., J.K. Jivan, and S.V. Andurkar, *Pharmacology of kratom: an emerging botanical agent with stimulant, analgesic and opioid-like effects.* The Journal of the American Osteopathic Association, 2012. 112(12): p. 792-799.

43. Watanabe, K., et al., *Inhibitory effect of mitragynine, an alkaloid with analgesic effect from thai medicinal plant Mitragyna speciosa, on electrically stimulated contraction of isolated guinea-pig ileum through the opioid receptor.* Life Sciences, 1997. 60(12): p. 933-942.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายกิตติศักดิ์ เหมือนดาว
วุฒิการศึกษา	ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต(เคมี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานตีพิมพ์	National Conference in Science and Technology (NCST)
รางวัลที่ได้รับ	- รางวัลชนะเลิศการนำเสนอผลงานดีเด่นภาคบรรยาย ในงานประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี National Conference in Science and Technology (NCST) - ได้รับเกียรติบัตร นักศึกษาที่ทำชื่อเสียงให้แก่คณะวิทยาศาสตร์ในงานวันไหว้ครู จากการประชุมระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี "วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสู่การพัฒนาชุมชนและท้องถิ่น" ในระหว่างวันที่ 19 - 20 กันยายน 2561

มหาวิทยาลัยศิลปากร