

ส่วนสกัดจากใบกฤษณาออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์โคเลสเตอรอล  
(ดีพีพีเอส)

สร้อยลักษณ์ เฟื่องเหมือน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

**THE ACTIVE FRACTION FROM LEAF OF *AQUILARIA*  
*CRASSNA PIERRE EX LECOMTE* AGAINST DIPEPTIDYL  
PEPTIDASE IV (DPP IV) ENZYME**

**SARANLUK PENGMIUAN**

**A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements  
for Master of Science in Chemistry  
Academic Year 2017**

**Copyright of Bansomdejchaopraya Raiabhat University**

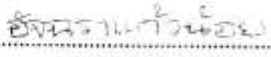
ชื่อเรื่อง ส่วนสกัดจากใบกฤษณาออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์  
โคเลสเตอรอล ทีเคเอส (ดีพีพีเอส)  
ชื่อผู้วิจัย สรลลักษณ์ เฟื่องเหมือน  
สาขาวิชา เคมี  
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร.อัจฉรา แก้วน้อย  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณ ชาญชัยชาววิวัฒน์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์สุชาดา มานอก

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาค้นคว้าตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

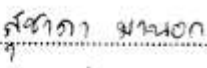
  
..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารีวรรณ เอี่ยมสะอาด)

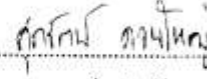
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ดร.ม่องพรรณ ศรีพจน์)

  
..... กรรมการ  
(ดร.อัจฉรา แก้วน้อย)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณ ชาญชัยชาววิวัฒน์)

  
..... กรรมการ  
(อาจารย์สุชาดา มานอก)

  
..... กรรมการและเลขานุการ  
(อาจารย์สุกริตน์ ควนใหญ่)

อธิการบดีของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ชื่อเรื่อง	ส่วนสกัดจากใบกฤษณาออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ ไคเพปทีดิลเพปทีเดสสี่ (ดีพีพีสี่)
ชื่อผู้วิจัย	สร้อยลักษณ์ เพ็งเหมือน
สาขาวิชา	เคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ดร. อัจฉรา แก้วน้อย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์สุชาดา มานอก
ปีการศึกษา	2559

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาการแยกสารสำคัญของสารสกัดจากใบกฤษณาด้วยวิธีซีเคเวนเซิล 2) ศึกษาการแยกส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไคเพปทีดิลเพปทีเดสสี่ (DPP-4) จากใบกฤษณาที่ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีซีเคเวนเซิล และ 3) ศึกษาการแยกส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-4 จากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre exlecomte* โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ผลการวิจัยพบว่า

1. การแยกสารสำคัญของสารสกัดจากใบกฤษณาด้วยวิธีซีเคเวนเซิลในสารสกัดเมทานอลที่แยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 3 กิโลกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-4 มากที่สุด ที่ร้อยละ 19.24

2. การแยกส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไคเพปทีดิลเพปทีเดสสี่ (DPP-4) จากใบกฤษณาที่ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีซีเคเวนเซิล พบสารที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-4 คือส่วนสกัด ASM 4, ASM 7, ASM 8, ASM 9 และ ASM 10 ที่ความเข้มข้น 500 ppb ต้านเอนไซม์ได้ร้อยละ 72.80, 12.24, 2.24, 9.36 และ 8.49 ตามลำดับ

3. การแยกส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-4 จากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre exlecomte* โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และ Preparative Thin-layer Chromatography (PLC) อย่างต่อเนื่องเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-4 มาศึกษาสูตรโครงสร้างของสารโดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี พบว่าผลิตภัณฑ์ลำดับที่ F 3-2 (301-

306), F 2-4 (308-311) และ F 3 (334-2) เมื่อผ่านการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) พบว่าสารสกัดที่ได้น่าจะเป็นสารบริสุทธิ์ และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี NMR พบว่า เป็นสารกลุ่ม แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Alkaloid flavonoid glycosides) ผลการทดสอบหาสาร ฟลาโวนอยด์โดยวิธีของสารอลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride colorimetric method) ของผลึก 319-1 และ 334-2 ในชั้นของสารละลาย Octyl alcohol ที่อยู่ชั้นบนสุดให้สีส้มของ สารละลาย จะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าผลึกของสารสกัดลำดับที่ 319-1 และ 334-2 ที่สกัดแยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เป็นสารในกลุ่ม Flavone ชนิด Aglycone

**คำสำคัญ:** เอกวิลาเรีย คลาสนา วิธีซีเวนเชิล ดีพีพีลี

<b>Title</b>	<b>The Extract of <i>Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte</i> leaves with Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) enzymes Activity</b>
<b>Author</b>	<b>Saranluk Pengmuan</b>
<b>Program</b>	<b>Chemistry</b>
<b>Major Advisor</b>	<b>Dr.Atchara Kaewnoi</b>
<b>Co–advisor</b>	<b>Assist Prof Dr. Arun Chanchaichaovivat</b>
<b>Co–advisor</b>	<b>Suchada Manok</b>
<b>Academic Year</b>	<b>2016</b>

### ABSTRACT

The purposes of this research were 1) to study the extraction of chemical components from *Aquilaria crassna Pierre exlecomte* leaves using sequential method 2) to study the extraction of substances against enzyme Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) from *Aquilaria crassna Pierre exlecomte* with sequential method and 3) to study the extraction of substances against enzyme Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) from *Aquilaria crassna Pierre exlecomte* with column chromatography method.

The findings revealed as follows.

1. The Methanol extract from 3.0 kg. of *Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte* leaves with 500 ppb concentration had the maximum anti-DPP-4 at 19.24%.

2. The anti-DPP-4 substances found from extraction of 3 kg. of *Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte* leaves in 158.48 gm. of Methanol are ASM 4, ASM 7, ASM 8, ASM 9, and ASM 10 in the amount of 0.00121, 0.00184, 0.0157, 0.00122 , 0.00139 mg. at 500 ppb concentration, found at 72.80%, 12.24%, 2.24%, 9.36%, and 8.49%.

3. After the continue separation of the active compounds against the enzyme DPP-4 by using column chromatography and Preparative Thin-layer Chromatography (PLC) and chemical identification spectroscopy techniques, the crystals were mixed sequence F 3-2 (301-306), F 2-4 (308-311) and F 3 (334-2). After preliminary examination by Thin-layer Chromatography (TLC),

the gained extract was purified. The results from NMR spectrometer analysis indicated a substance in alkaloid flavonoid glycosides group by testing compounds flavonoid by Aluminium chloride colorimetric method of the crystals 319-1 and 334-2 in the solution of Octyl alcohol that was on top of the orange substance solution. Therefore, it can be concluded that the extracts crystals no.319-1 and 334-2 extracted from 11.50 kg. *Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte* leaves by column chromatography contain substance of the Flavone – Type Aglycone.

**Keywords :** *Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte*, Sequential Extraction, Dipeptidyl peptidase-4

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จรูกลงไปได้ด้วยดีเนื่องจากบุคคลหลายฝ่ายที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือจากอาจารย์และบุคคลต่างๆ ดังรายนามดังต่อไปนี้

ขอขอบคุณ บิดา มารดา ที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนตลอดมา

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้คำแนะนำในการค้นคว้าหาข้อมูล การเก็บรวบรวมข้อมูล และการแนะนำในด้านต่างๆ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

ขอขอบคุณอาจารย์ในสาขาวิชาเคมี และเคมีอุตสาหกรรม รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านเครื่องมือ และการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหิดล คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านเครื่องมือ และการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านเครื่องมือ และการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยในครั้งนี้

ทั้งนี้ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างยิ่งมา ณ โอกาสนี้

สร้อยลักษณ์ เฟื่องเหมือน



# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฐ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>5</b>
วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร.....	5
เทคนิคโครมาโทกราฟี.....	14
สารสำคัญที่พบในใบกฤษณา.....	25
เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี.....	38
เอ็นไซม์ไคเพปทีลเพปทีเดสตี.....	49
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	51
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>57</b>
กลุ่มตัวอย่าง.....	57
วิธีดำเนินการวิจัย.....	57
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	62
การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้.....	64

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....</b>	66
ผลการศึกษการสกัดตัวอย่างสมุนไพร.....	66
ผลการศึกษการแยกองค์ประกอบจากสารสกัดสมุนไพรวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	67
ผลการตรวจสอบหาสารสำคัญกลุ่มแอลคาลอยด์.....	73
ผลการทดสอบคุณภาพวิเคราะห์สมบัติในการต้านเอ็นไซม์โคเลสเตอรอล.....	79
ผลการทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์.....	139
<b>บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....</b>	143
สรุปผลการวิจัย.....	143
การอภิปรายผล.....	144
ข้อเสนอแนะ.....	147
<b>บรรณานุกรม.....</b>	148
<b>ภาคผนวก.....</b>	152
ภาคผนวก ก การสกัดแยกสาร.....	153
ภาคผนวก ข การแยกสาร โดยวิธี PLC.....	165
ภาคผนวก ค การทดสอบสมบัติในการต้านเอ็นไซม์ DPP-4.....	172
ภาคผนวก ง การเตรียมสารละลาย.....	176
ภาคผนวก จ การทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์.....	178
ภาคผนวก ฉ การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางสเปคโทรสโกปี.....	180
ภาคผนวก ช หนังสือตอบรับลงบทความ.....	184
<b>ประวัติผู้วิจัย.....</b>	185

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การใช้ทินเลเซอร์โครมาโทกราฟีในการตรวจสอบกลุ่มสารต่างๆ.....	13
2	สายพันธุ์ไม้กฤษณาและแหล่งที่พบไม้กฤษณา.....	20
3	สกุลไม้กฤษณาและแหล่งที่พบในประเทศไทย.....	22
4	สายพันธุ์ไม้กฤษณาที่ปลูกและแหล่งที่พบในประเทศไทย.....	23
5	โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ <i>Aquilariaagallocha</i> Roxb.(Thymelaeaceae).....	25
6	โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ <i>Aquilariamalaccensis</i> Lamk.(Thymelaeaceae).....	27
7	โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ <i>Aquilariasinensis</i> (Lour.) Gilg.(Thymelaeaceae).....	30
8	การจำแนกชนิดของฟลาโวนอยด์โดยขึ้นอยู่กับตำแหน่งของหมู่แทนที่.....	36
9	การเปรียบเทียบความแตกต่างของโรคเบาหวานประเภทที่ 1 และประเภทที่ 2.....	43
10	ปริมาณและร้อยละของสารสกัดหยาบและสีของสารละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเมทานอล ที่สกัดแยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 3 กิโลกรัม.....	66
11	ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจากใบกฤษณา ที่ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเมทานอล จำนวน 3 กิโลกรัม.....	67
12	ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 158.48 กรัม ในส่วนของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	69
13	ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 158.48 กรัมในแต่ละส่วน ของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	70
14	น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 1 – ASM 12 ที่แยกได้จาก ใบกฤษณาจำนวน 3 กิโลกรัม ในส่วนของเมทานอล158.48 กรัม โดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี.....	71
15	ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารจำนวน 25.02 กรัม ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10.....	75

## สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
16 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารจำนวน 25.02 กรัม ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 ASM 7 – ASM 10 ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	76
17 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 1 – ASM 11 ที่แยกได้จากสารจำนวน 25.02 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10.....	77
18 ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาจำนวน 158.480 กรัม ที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	80
19 ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจำนวน 25.023 กรัม ที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10.....	81
20 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 5จำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	84
21 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 5จำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด.....	85
22 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 5-1 – ASM (7-10) 5-11 ที่แยกได้จากสารสกัดจำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	86
23 ที่ 22 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 1(7-10) 6จำนวน 3.05 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	88
24 23 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 6จำนวน 3.05 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด.....	89
25 24 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 6-1 – ASM (7-10) 6-8 ที่แยกได้จากสารจำนวน 3.05 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	90
26 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 7จำนวน 6.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	92
27 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 7 จำนวน 6.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด.....	93

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
28	น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 7-1 – ASM (7-10) 7-10 ที่แยกได้จากสารจำนวน 6.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	94
29	ร้อยละและปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 169.58 กรัม ในส่วนสกัดเมทานอลจากใบกฤษณา โดยวิธีคอลัมน์โครมาโท กราฟี .....	96
30	ปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณา ในแต่ละส่วนของสารสกัด.....	97
31	น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 2-1 – ASM 2-12 ที่แยกได้จากใบ กฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัมในส่วนของเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	98
32	ร้อยละและปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 35 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโท กราฟีของสารสกัดเมทานอลในส่วนสกัดที่ ASM 2 –11.....	102
33	ปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารจำนวน 35 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 2 -11 .....	103
34	น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 2 (11) 1 – ASM 2 (11) 12 ที่แยกได้จากสารจำนวน 35 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 2 (11) .....	104
35	ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจากใบกฤษณาจำนวน 169.580 กรัม ที่แยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	104
36	ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจำนวน 35 กรัม จากใบกฤษณาที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	108
37	ร้อยละและปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 2-5 จำนวน 19.78 กรัมโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	112
38	ปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 2-5โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จำนวน 19.78 กรัม ในแต่ละส่วนของสารสกัด.....	112
39	น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (5) 1 – ASM (5) 19 ที่แยกได้จากสารจำนวน 19.780 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	114

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
40 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.12050 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	116
41 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.50 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด.....	116
42 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (8) 1 – ASM (8) 10 ในส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.50 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	117
43 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.69 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	120
44 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.96 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด.....	120
45 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (9) 1 – ASM (9) 12 ในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.69 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .....	122
46 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม ที่แยกสารสกัดเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และแยกต่อด้วยวิธี PLC.....	125
47 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ผสม F 3 (301–306) จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี PLC.....	128
48 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 308–311 จำนวน 0.730 มิลลิกรัม ที่แยกได้จากสารสกัดเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี และแยกต่อด้วยวิธี PLC.....	131
49 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ผสม F 2 (308–311) จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี PLC.....	133
50 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ที่แยกได้จากสารสกัดเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี และแยกต่อด้วยวิธี PLC.....	136

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
51	139
<p>น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลึกผสม ASM F (334-2) เริ่มต้น จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ที่แยกได้จากสารสกัดเมทาอนล จำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และแยกต่อด้วยวิธี PLC.....</p>	
52	140
<p>ผลการทดสอบหาสารฟลาโวน ในผลึกของสารสกัดลำดับที่ 319-1 และ 334-2 ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม.....</p>	

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	4
2	เครื่องมือเพอร์โคเลเตอร์ (Percolator).....	7
3	ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxlet extractor).....	7
4	การกลั่นโดยใช้น้ำ (Water distillation).....	8
5	การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation).....	8
6	การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (Steam distillation).....	9
7	เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator).....	12
8	การแยกสีของหมึกดำโดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษ.....	15
9	ตัวอย่างโครมาโทแกรมโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	16
10	A ลักษณะการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี B การตรวจสอบที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยวิธีทินเลเยอร์ โครมาโทกราฟี.....	20
11	ลักษณะใบ ดอก และผลของ <i>Aquilaria crassna pierre ex lecomte</i> .....	24
12	โครงสร้างสารควินิน (Quinine).....	32
13	โครงสร้างสารที่พบในมอร์ฟีน (Morphine).....	33
14	โครงสร้างของทีโอฟีลลีน (Theophylline).....	33
15	โครงสร้างพื้นฐานของแอลคาลอยด์ : ไพรีดีน (1), พิเพอริดีน (2), เพอโรลิดีน (3), เพอโรล (4), อิมิดาโซล (5), พูรีน (6), เพอโรลิซิดีน (7), ควิโนลีน (8), ไอโซควิโนลีน (9), อะพอร์พีน (10), นอร์-ลูพินน (11), อินโดล (12), สเตียร์รอยด์ (13), โทรเพน (14).	34
16	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids).....	35
17	ส่วนประกอบเครื่อง NMR สเปกโตรมิเตอร์.....	40
18	กลไกการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1.....	42
19	กลไกการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2.....	43
20	บทบาทและหน้าที่ GLP-1 และการควบคุมสมดุลของกลูโคสโดย DPP-4 ผ่าน ทางการทำให้ GLP-1 หมดฤทธิ์.....	47
21	โครงสร้างของ Sitagliptin phosphate.....	48
22	ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ DPP-4 ซึ่งติดกับ Cell membrane.....	49



## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22	โครงสร้างของเอนไซม์ DPP-4 และ Active site ที่ช่องว่างภายใน..... 50
23	กลไกการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ไดเพปทีดิลเพปทีเดสตีในการลดระดับน้ำตาล..... 50
24	โครงสร้างของสาร 2-(2-phenylethyl) chromone, 5,6,7, 8-tetrahydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenethyl)-5,6,7,8 -tetrahydro-4H-chromen-4-one (1)..... 53
25	โครงสร้างของสาร named aquilarin A (1) , balanophonin (2) และ (+)-lariciresinol(3). 54
26	โครงสร้างของสาร aquilarisin (1), aquilarisin (2), hypolaetin 5-O-b-D-glucuronopy ranoside (3) aquilarixanthone (4), mangiferin (5), iriflophenone 2-O-a-L-rhamnopy ranoside (6), iriflophenone 3-C-b-D-glucoside (7) และ iriflophenone 3,5-C-b-D-diglucopyranoside (8) ..... 55
27	TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 158.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดในส่วนเมทานอล ลำดับที่ ASM 1 – ASM 12..... 72
28	TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาจำนวน 159.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1–ASM 12 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents..... 73
29	TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 25.02 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดในส่วนเมทานอล ลำดับที่ ASM (7–10)1 –ASM (7–10) 11 จากส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10..... 78
30	TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 25.023 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .ในส่วนของสารสกัดส่วน ASM (7–10) 1–ASM (7–10) 11 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents..... 79
31	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 158.480 กรัม จากใบกฤษณา จำนวน 3.0 กิโลกรัม ของส่วนสกัดที่ ASM 1– ASM 12 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia)..... 81

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
32	<p>ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดจำนวน 25.02 กรัม ของสารสกัด ส่วน ที่ ASM (7-10) 1 – ASM (7-10) 11 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia).....</p>	82
33	<p>TLC โครมาโตแกรม ของสาร จำนวน 169.58 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1 – ASM 12.....</p>	99
34	<p>TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 169.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1 – ASM 12 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents.....</p>	100
35	<p>TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัด จำนวน 35 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11.....</p>	105
36	<p>TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 35 กรัม ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents.....</p>	106
37	<p>ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม จากใบ กฤษณาจำนวน 11.50 ของสารสกัดส่วนที่ ASM 1– ASM 12 เมื่อเทียบกับสาร มาตรฐาน (Januvia).....</p>	108
38	<p>ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 35 กรัม จากใบ กฤษณาจำนวน 11.50 ของสารสกัดส่วนที่ ASM (11) 1 – ASM (11) 12 เมื่อเทียบ กับสารมาตรฐาน (Januvia).....</p>	109
39	<p>ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดจำนวน 2.5 กรัม ของสารสกัด ส่วนที่ASM (8) 1 – ASM (8) 10 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia).....</p>	118
40	<p>PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม จากสารสกัดเมทานอล จำนวน 169.580 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....</p>	124
41	<p>PLC ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม จากสารสกัด เมทานอล จำนวน 169.580 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....</p>	124

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
42	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม จากสารสกัดเมทานอล จำนวน 169.580 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	125
43	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM 10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	126
44	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	127
45	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	127
46	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จาก การสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 2–10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	129
47	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จาก การสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	130
48	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จาก การสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	130
49	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	132

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
50	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	132
51	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	133
52	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	135
53	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	135
54	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	136
55	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	137
56	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	138
57	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	139

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
58	ผลการทดสอบหาสารฟลาโวน ในผลึกของสารสกัดลำดับที่ 319 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม.....	141
59	ผลการทดสอบหาสารฟลาโวน ในผลึกของสารสกัดลำดับที่ 334-2 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม.....	142

## สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	4
2	เครื่องมือเพอร์โคเลเตอร์ (Percolator).....	7
3	ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxlet extractor).....	7
4	การกลั่นโดยใช้น้ำ (Water distillation).....	8
5	การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation).....	8
6	การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (Steam distillation).....	9
7	เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator).....	12
8	การแยกสีของหมึกดำโดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษ.....	15
9	ตัวอย่างโครมาโทแกรมโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี.....	16
10	A ลักษณะการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี B การตรวจสอบที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยวิธีทินเลเยอร์ โครมาโทกราฟี.....	20
11	ลักษณะใบ ดอก และผลของ <i>Aquilaria crassna pierre ex lecomte</i> .....	24
12	โครงสร้างสารควินิน (Quinine).....	32
13	โครงสร้างสารที่พบในมอร์ฟีน (Morphine).....	33
14	โครงสร้างของทีโอฟีลลีน (Theophylline).....	33
15	โครงสร้างพื้นฐานของแอลคาลอยด์ : ไพรีดีน (1), พิเพอริดีน (2), เพอโรลิดีน (3), เพอโรล (4), อิมิดาโซล (5), พูรีน (6), เพอโรลิซิดีน (7), ควิโนลีน (8), ไอโซควิโนลีน (9), อะพอร์ฟีน (10), นอร์-ลูพิเนน (11), อินโดล (12), สเตียรอยด์ (13), โทรเพน (14)..	34
15	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids).....	35
16	ส่วนประกอบเครื่อง NMR สเปกโตรมิเตอร์.....	40
17	กลไกการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่.....	42
18	กลไกการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2.....	43
19	บทบาทและหน้าที่ GLP-1 และการควบคุมสมดุลของกลูโคสโดย DPP-4 ผ่าน ทางการทำให้ GLP-1 หมดฤทธิ์.....	47
20	โครงสร้างของ Sitagliptin phosphate.....	48
21	ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ DPP-4 ซึ่งติดกับ Cell membrane.....	49

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22	โครงสร้างของเอนไซม์ DPP-4 และ Active site ที่ช่องว่างภายใน..... 50
23	กลไกการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ไดเพปทีดิลเพปทีเดสสี่ในการลดระดับน้ำตาล..... 50
24	โครงสร้างของสาร 2-(2-phenylethyl) chromone, 5,6,7, 8-tetrahydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenethyl)-5,6,7,8 -tetrahydro-4H-chromen-4-one (1)..... 53
25	โครงสร้างของสาร named aquilarin A (1) , balanophonin (2) และ (+)-lariciresinol(3). 54
26	โครงสร้างของสาร aquilarisin (1), hypolaetin 5-O-b-D-glucuronopy ranoside (3) aquilarixanthone (4), mangiferin (5), iriflophenone 2-O-a-L-rhamnopy ranoside (6), iriflophenone 3-C-b-D-glucoside (7) และ iriflophenone 3,5-C-b-D-diglucopyranoside (8) ..... 55
27	TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 158.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดในส่วนเมทานอล ลำดับที่ ASM 1 – ASM 12.. 72
28	TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาจำนวน 159.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1–ASM 12 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents..... 73
29	TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 25.02 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดในส่วนเมทานอล ลำดับที่ ASM (7–10)1 –ASM (7–10) 11 จากส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10..... 78
30	TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 25.023 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี .ในส่วนของสารสกัดส่วน ASM (7–10) 1–ASM (7–10) 11 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents..... 79
31	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 158.480 กรัม จากใบกฤษณา จำนวน 3.0 กิโลกรัม ของส่วนสกัดที่ ASM 1– ASM 12 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia)..... 81

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
32 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดจำนวน 25.02 กรัม ของสารสกัด ส่วน ที่ ASM (7-10) 1 – ASM (7-10) 11 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia).....	82
33 TLC โครมาโตแกรม ของสาร จำนวน 169.58 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1 – ASM 12.....	99
34 TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 169.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1 – ASM 12	
หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff’s reagents.....	100
35 TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัด จำนวน 35 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11.....	105
36 TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 35 กรัม ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff’s reagents.....	106
37 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม จากใบ กฤษณาจำนวน 11.50 ของสารสกัดส่วนที่ ASM 1– ASM 12 เมื่อเทียบกับสาร มาตรฐาน (Januvia).....	108
38 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 35 กรัม จากใบ กฤษณาจำนวน 11.50 ของสารสกัดส่วนที่ กASM (11) 1 – ASM (11) 12 เมื่อเทียบ กับสารมาตรฐาน (Januvia).....	109
39 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดจำนวน 2.5 กรัม ของสารสกัด ส่วนที่ASM (8) 1 – ASM (8) 10 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia).....	118
40 PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม จากสารสกัดเมทานอล จำนวน 169.580 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	124
41 PLC ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม จากสารสกัด เมทานอล จำนวน 169.580 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	124



## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
42	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม จากสารสกัดเมทานอล จำนวน 169.580 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	125
43	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM 10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	126
44	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	127
45	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	127
46	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จาก การสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 2–10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	129
47	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จาก การสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	130
48	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จาก การสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	130
49	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	132

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
50	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ผสม ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	132
51	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ผสม ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	133
52	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	135
53	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	135
54	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	136
55	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	137
56	PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	138
57	TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 334–2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่.....	139

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	สารบัญญภาพ (ต่อ)	หน้า
58	ผลการทดสอบหาสารฟลาโวนในผลึกของสารสกัดลำดับที่ 319 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม.....	141
59	ผลการทดสอบหาสารฟลาโวนในผลึกของสารสกัดลำดับที่ 334-2 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม.....	142

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวานเป็นกลุ่มโรคทางเมแทบอลิซึมที่มีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง อันเป็นผลมาจากความผิดปกติของการหลั่งอินซูลินจากเบตาเซลล์ของตับอ่อน หรือเกิดจากภาวะอินซูลินที่หลั่งออกมาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ หรือเกิดจากสาเหตุร่วมกันทั้งสองอย่าง ปัจจุบันพบว่าอุบัติการณ์ของโรคเบาหวานมีจำนวนมากขึ้น การเจ็บป่วยด้วยโรคเบาหวานจึงเป็นภาวะที่กำลังคุกคามสุขภาพของประชาชนทั่วโลก สมคิด สันวิจิตร (2548, ออนไลน์) กล่าวถึง สถานการณ์เบาหวานโลกในปัจจุบันทั้งในทวีปยุโรป เอเชียและอเมริกา แม้ในประเทศกำลังพัฒนา ชนกลุ่มน้อยและเด็ก พบว่าอัตราการเกิดโรคเบาหวานของประชากรโรคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง สมาพันธ์เบาหวานนานาชาติประมาณการว่า ในปี พ.ศ. 2546 ทั่วโลกมีประชากรเบาหวาน 194 ล้านคน และในปี พ.ศ. 2568 น่าจะมีผู้ป่วยเบาหวานเพิ่มขึ้นเป็น 333 ล้านคน มักเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางระบาดวิทยา สำหรับเบาหวานชนิดที่ 2 องค์การอนามัยโลกคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2568 ทั่วโลกจะมีผู้ป่วยเบาหวานเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าคือจาก 150 ล้านคน เป็น 300 ล้านคน เช่นเดียวกัน การเจ็บป่วยด้วยโรคเบาหวานในประเทศไทยกำลังเพิ่มมากขึ้น โดยมีอัตราของโรคเบาหวานสูงขึ้นในกลุ่มประชากรและผู้สูงอายุ ร้อยละ 2.5-6.8 และร้อยละ 13-15.8 ตามลำดับ

ปัจจุบันประเทศไทยมีสมุนไพรหลากหลายชนิดที่มีศักยภาพในการรักษาโรคต่างๆ มากมาย เช่น โรคเบาหวาน มะเร็ง ในตำหรับยาของไทยได้มีการใช้สมุนไพรจำพวก มะระจีน ใบฝักทอง อบเชย เตยหอม และกฤษณา เป็นต้น โดยสมุนไพรเหล่านี้มีสมบัติในการรักษาโรคเบาหวานและลดระดับน้ำตาลในเลือดได้นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาสมุนไพรให้ในรูปแบบของยา การสกัดสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยสารสกัดส่วนใหญ่จะมีการออกฤทธิ์สำคัญ (Active ingredient) หลายกลุ่ม เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ฤทธิ์ลดการอักเสบ (Anti-inflammatory) และลดปริมาณน้ำตาลในเลือด (Hypoglycemic) เป็นต้น วันดี กฤษณพันธ์ (2536, ออนไลน์) กล่าวถึง การศึกษาสารสำคัญที่อยู่ในส่วนต่างๆ ของสมุนไพร ได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องและก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว เช่น การพบกลุ่มสารแอลคาลอยด์ (Alkaloids) หรือไกลโคไซด์ (Glycosides) จะเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาการรักษาโรคหรืออุตสาหกรรมเคมีอื่นๆ เพื่อให้ได้สารกึ่งสังเคราะห์หรือสารสังเคราะห์หลากหลายชนิด นอกจากนี้การคัดแปลงสูตร โครงสร้างของสารเคมีที่ได้จากสมุนไพรจะนำไปสู่การพัฒนาที่มีสมบัติดียิ่งขึ้นเพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคสูง

อัจฉรา แก้วน้อย และคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาโดยพิสูจน์ฤทธิ์สมุนไพโรบายกฤษณาตำบเบาหวาน ได้ทดสอบฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานของสมุนไพโรบายกฤษณาที่สกัดด้วยน้ำร้อนและทำให้แห้งโดยความเย็น พบว่าใบกฤษณาที่สกัดด้วยน้ำร้อนสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูปกติได้ และจากการศึกษาเบื้องต้นของ สุชาดา มานอก และคณะ (2552) ได้ศึกษาสารประกอบทางเคมีในใบกฤษณาและการออกฤทธิ์ ได้ทำ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH) ของสารสกัดจากใบกฤษณา (*Aquilaria subintegra* Ding Hau) ที่สกัดโดยวิธีซีควนเชียล (Sequential extraction) พบว่า ใบกฤษณาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และถูกคัดเลือกเพื่อทำการศึกษาส่วนที่แยกสกัด นำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารสำคัญออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การพัฒนาพืชสมุนไพรมีวิธีหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาทางเศรษฐกิจของประเทศและยังช่วยเหลือในเรื่องรายได้ของเกษตรกรอีกทางหนึ่ง เมื่อสมุนไพรมบางชนิดได้รับศึกษาและการพัฒนาเป็นยาและเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ก็จะทำให้สมุนไพรมชนิดนั้นเป็นพืชเศรษฐกิจได้และสามารถลดการนำเข้าบางส่วนนอกจากนั้นการนำสมุนไพรมมาใช้เป็นยายังสอดคล้องกับนโยบายของรัฐบาลในเรื่องการให้ประชาชนมีความสามารถในการพึ่งตนเองได้

ผู้วิจัย มีความสนใจศึกษาเกี่ยวกับการแยกหาส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ Dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) จากใบกฤษณาสายพันธุ์ พันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* จากการค้นคว้าข้อมูลพบงานวิจัยที่ค้นพบสารสำคัญจากใบกฤษณาที่มีอยู่หลายสายพันธุ์ ยกเว้นในสายพันธุ์ พันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* ยังไม่ผู้ศึกษาสารสำคัญในใบกฤษณาสายพันธุ์ดังกล่าว และในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านเบาหวาน โดยทำการทดสอบในเอนไซม์ DPP-IV จูลิโอ โรเซนสโตก (Julio Rosenstock, 2007) ได้กล่าวถึง แนวทางใหม่ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 คือ การเพิ่ม Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) Receptor signaling โดยเพิ่ม Endogenous GLP-1 ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ DPP-IV โดยใช้ยา Sitagliptin เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ DPP-IV ที่มีฤทธิ์แรงและเลือกจำเพาะต่อ DPP-IV ทำให้การทำงานของเซลล์ตับอ่อน (Inlet cells) ดีขึ้นโดยการเพิ่มการตอบสนองของแอลฟา และเบตาเซลล์ต่อกลูโคส

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารสำคัญจากใบกฤษณาวิธีซีควนเชียล (Sequential extraction)
2. ศึกษาการแยกส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-IV จากใบกฤษณาที่ได้จากการสกัดแยกสารโดยวิธีซีควนเชียล และการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
3. ศึกษาส่วนสกัดออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-IV จากใบ กฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte*

### ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการสกัดแยกสาร โดยวิธีซีแควนเซียลจากใบกฤษณา
2. ศึกษาการแยกสารที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-IV จากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี
3. พิสูจน์ฤทธิ์ของสารสกัดในแต่ละส่วนสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ DPP-IV

### ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้สารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-IV จากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte*
2. ได้ทราบกลุ่มสารสำคัญที่อยู่ในใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte*
3. ได้รู้ถึงเทคนิคการวิเคราะห์กลุ่มสารโดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทางสเปกโทรสโกปี
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจในการศึกษาเกี่ยวกับสารใบกฤษณา
5. รู้ถึงเทคนิคการสกัดด้วยวิธีซีแควนเซียลและการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

### นิยามศัพท์เฉพาะ

**วิธีซีแควนเซียล** หมายถึง เป็นวิธีการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนเชื้อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายใน ผงสมุนไพรออกมาได้

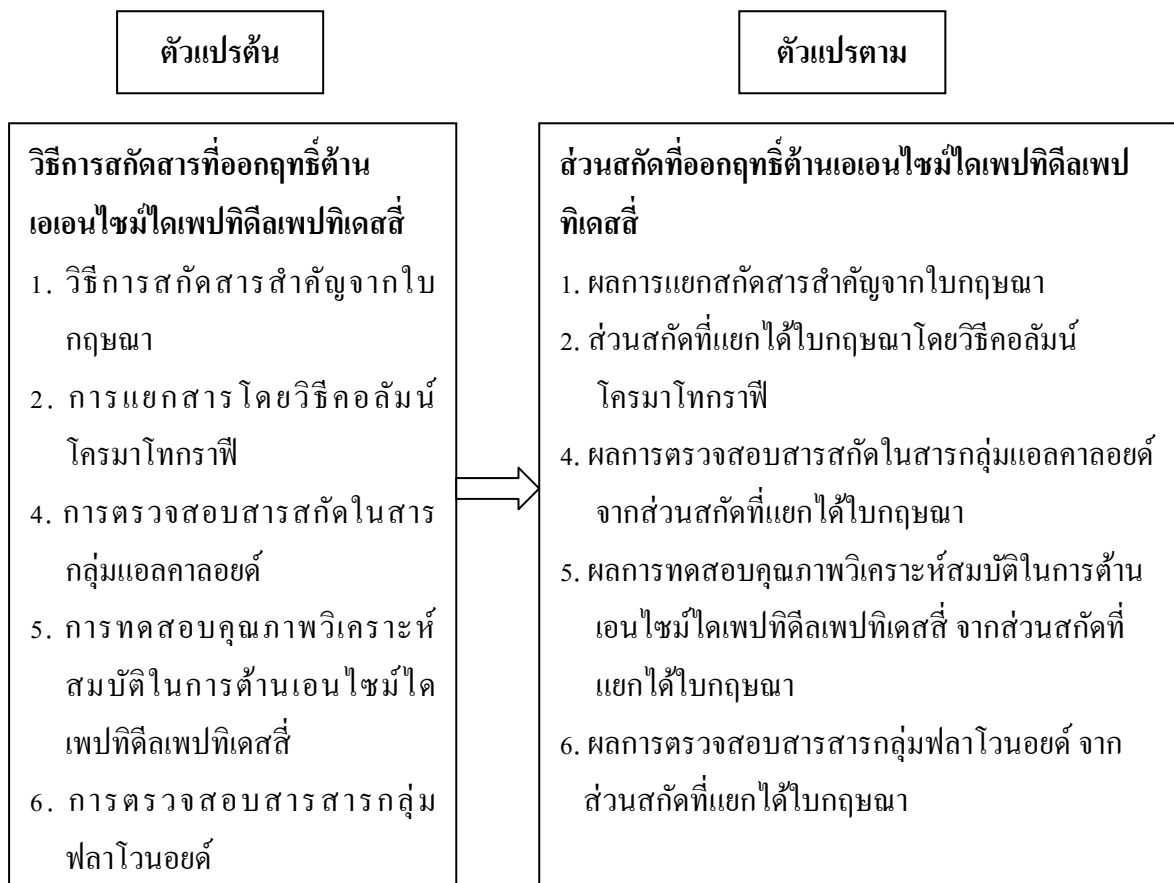
**วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี** หมายถึง การแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยใช้สมบัติการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดระหว่างวัฏภาคที่แตกต่างกัน ปัจจุบันเทคนิคทาง โครมาโทกราฟีที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบที่สำคัญจากพืชสมุนไพร

**กฤษณา** หมายถึง ไม้กฤษณา หรือกฤษณา หรือต้นไม้หอม ไม้กฤษณาที่ยังเป็นต้นไม้อยู่ ซึ่งจะมีเนื้อไม้เป็นสีขาว แต่เมื่อเกิดบาดแผลแล้วก็จะมึนน้ำมันสีดำเกิดขึ้น

**เอนไซม์ DPP-IV** หมายถึง เอนไซม์ที่อยู่ในรูปของ 2 โมเลกุลคู่กัน (Dimeric) หรือ 4 โมเลกุล (Tetrameric) โดยที่ปลายด้านแอมีน (Amine) ตรงตำแหน่ง N terminal จะอยู่ด้านเดียวกันและติดกับเซลล์เมมเบรน (Cell membrane) โดยด้านที่อยู่ติดกับเซลล์ เมมเบรน จะมีประจุบวกซึ่งจะทำให้จับกันอย่างแน่นหนา กับประจุลบ จากฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) เบน เอนไซม์จะประกอบไปด้วยโดเมนที่มีลักษณะเป็นเบตาหรือฟิลาเตอร์ (Beta-propeller) จำนวน 8 อัน และโดเมนของ Alpha, Beta-hydrolase ซึ่งระหว่าง 2 โดเมน

## กรอบแนวคิดในการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้แบ่งขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยดังนี้



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทำวิจัยเรื่อง ส่วนสกัดออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไดเพปติลเพปติเดสสี่ (ดีพีพี 4) จากใบ  
กฤษณา (*Aquilaria crassna pierre ex lecomte*) ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเอกสาร และงานวิจัยที่  
เกี่ยวข้องในแต่ละหัวข้อต่อไปนี้

1. วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร
2. การตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)
3. เทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography)
4. ไม้กฤษณา
5. สารสำคัญที่พบในใบกฤษณา
6. สารกลุ่มแอลคาลอยด์
7. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์
9. เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy)
10. โรคเบาหวานเบาหวาน (Diabetes Mellitus)
11. เอนไซม์ไดเพปติลเพปติเดสสี่ (Dipeptidyl peptidase 4 (DPP 4))
12. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากหัวข้อที่กล่าวมาข้างต้นมีรายละเอียดของเนื้อหา ดังนี้

#### 1. วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นพบว่าจะ  
สกัดด้วยวิธีการใดหรือใช้ตัวทำละลายใด ก็จะต้องประกอบเป็นสารผสมหรือสารสกัดอย่าง  
หยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพร โดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย  
(Solvent) สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร ซึ่งจะมี  
องค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically active constituents) ซึ่งมักเรียกว่าสาร  
สำคัญ (Active constituents) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically  
inactive constituents) ซึ่งเรียกว่า สารเฉื่อย (Inert substances) ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบใน  
สารสกัดจะแปรเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในสารสกัด วัตถุประสงค์  
ของสารสกัดพืชสมุนไพร คือ เพื่อสกัดสารแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพรให้ได้สารสกัดที่มีความ



เข้มข้นของสารสำคัญสูง และเพื่อลดขนาด (Dose) ของการใช้สมุนไพรลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

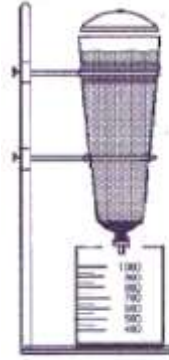
การสกัดสารสำคัญสามารถแบ่งออกได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด สมบัติของสารที่ทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลาย แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีที่ใช้ในการสกัดได้แก่

**1. มาเซอเรชัน (Maceration)** เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายซึ่งเป็นวิธีซีเควนเชียล (Sequential extraction) โดยจะทำให้เนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในตัวทำละลายที่เหมาะสม ทำเป็นเวลานาน 7 วัน หรือตามกำหนดในเภสัชตำรับ หรือจนกระทั่งสารหรือองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในขณะที่ทำการหมักควรมีการเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบเวลาจึงกรอง แยกกาก (Marc) ออกจากตัวทำละลาย วิธีนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งสามารถทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายที่น้อย และเนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะแก่การสกัดสาร แต่วิธีนี้มักจะไม่สามารถเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย เมื่อสารละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในของพืชสมุนไพรและตัวทำละลายที่ใช้ ทำให้อัตราเร็วของสารสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะสำหรับสกัดสารในกรณีที่ต้องการสกัดจากพืชสมุนไพร

**2. เพอร์โคเลชัน (Percolation)** เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรโดยการปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายเอาองค์ประกอบออกจากผงสมุนไพรออกมา โดยการใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เพอร์โคเลเตอร์ (Percolator)

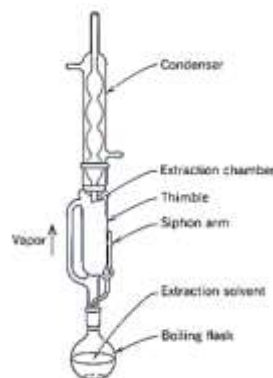
วิธีเพอร์โคเลชัน เป็นการนำผงสมุนไพรมาหมักด้วยตัวทำละลายก่อน 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุผงสมุนไพรลงในเพอร์โคเลเตอร์ มีลักษณะเป็นคอลัมน์ (Column) ปลายปิดทั้งสองด้าน โดยด้านบนจะกว้างด้านล่าง ดังภาพที่ 1 เพื่อความสะดวกในการบรรจุผงสมุนไพร ส่วนปลายด้านล่างเปิดเพื่อควบคุมอัตราการไหลของสารสกัด การสกัดวิธีนี้จัดเป็นสารสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน มีข้อเสียคือ เปลือกตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน



ภาพที่ 1 เครื่องมือเพอร์โคเลเตอร์ (Percolator)  
ที่มา : อรัญญา มโนสร้อย และคณะ (2012, ออนไลน์)

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction) เป็นวิธีการสกัดที่คล้ายกับวิธีเพอร์โคเลชัน แต่ต้องใช้ความร้อนและใช้ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxlet extractor) ซึ่งเป็นระบบเปิด โดยตัวทำละลายจะมีจุดเดือดต่ำเมื่อได้รับความร้อนจากฮีตติ้งแมนเทิน (Heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ จะทำให้ตัวทำละลายระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (Thimble) จะทำให้ตัวทำละลายไหลซ้ำอีกไปเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบที่อยู่ในพืชสมุนไพรถูกสกัดออกมา ซึ่งตัวทำละลายที่สกัดได้จะถูกเก็บไว้ในแชมเบอร์ (Extracting chamber)

การสกัดวิธีนี้เหมาะสำหรับสกัดองค์ประกอบสารที่ทนต่อความร้อนและตัวใช้ตัวทำละลายน้อย มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะสำหรับสกัดองค์ประกอบสารที่ไม่ทนต่อความร้อน



ภาพที่ 2 ซอกซ์เลตเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxlet extractor)  
ที่มา : Oleoresins.melbia (2011, ออนไลน์)

4. การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Extraction of volatile oil) มีอยู่หลายวิธี ซึ่งจะต้องเลือกตามความเหมาะสมของพืชที่ใช้ ซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้

การกลั่น (Distillation) จะมีอยู่ 3 วิธีดังนี้

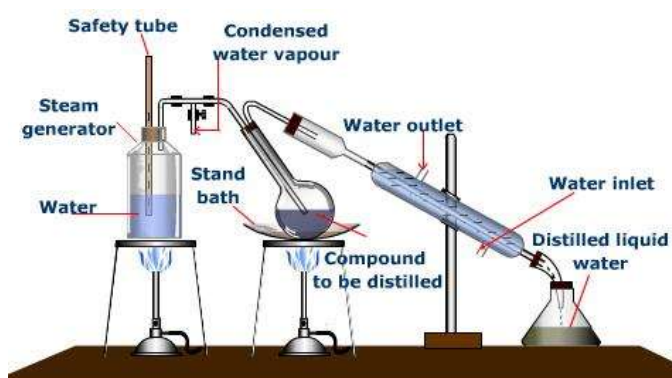
การกลั่นโดยใช้น้ำ (Water distillation) ใช้กับพืชแห้งซึ่งไม่ทำลายเมื่อต้ม เนื่องจากพืชจะแช่อยู่ในน้ำเดือดทั้งหมดตลอดระยะเวลาการกลั่นทั้งหมด เหมาะสำหรับการกลั่นน้ำมันจากเปลือกไม้



ภาพที่ 3 การกลั่นโดยใช้น้ำ (Water distillation)

ที่มา : Omegamanjournal.wordpress.com (2012, ออนไลน์)

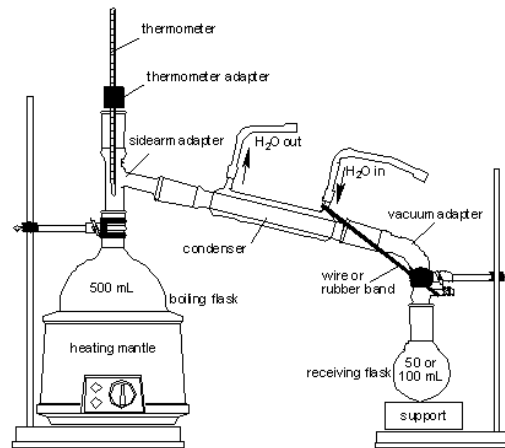
การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation) ใช้กับพืชสดและแห้ง ซึ่งอาจถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกต้ม เช่น กานพลู บดจนเป็นผง เติมน้ำให้ท่วมผ่านไอน้ำเข้าไป ทำให้ได้ทั้งน้ำและน้ำมันออกมา



ภาพที่ 4 การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation)

ที่มา : Melting-rahmani.blogfa (2012, ออนไลน์)

การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (Steam distillation) วิธีนี้ใช้กับพืชสด เช่น สารระเหย โดยนำพืชสดมาวางบนตะแกรง แล้วผ่านไอน้ำเข้าไปโดยตรง โดยไม่มีการหมักพืช



ภาพที่ 5 การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (Steam distillation)

ที่มา : ซานดร้า โคสเตอร์ (Sandra Koster , ออนไลน์)

**การบีบหรือการอัด (Expression)** ใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากวิธีนี้ใช้กลิ่นไม่ได้ เพราะพืชจะทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน

**วิธีเอนฟลอยเรนซ์ (Enfleurage)** ใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ของกลีบดอกไม้ต่างๆซึ่งจะทำให้เก็บความหอมได้ดี

**การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Extraction with solvent)** รัตนา อินทานุปกรณ (2550, น.82, 85-90) พบว่า วิธีนี้สารจะถูกแบ่งออกจากกัน โดยอาศัยสมบัติของการละลายของสารแต่ละชนิด ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุด คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เมทานอล และแอลกอฮอล์ เป็นต้น ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 50 องศาเซลเซียส

#### สมบัติของตัวทำละลาย

สมบัติของตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดจะต้องสามารถซึมเข้าไปในพืชสมุนไพรหรือวัตถุดิบได้เร็ว สามารถแทนที่ตัวละลายได้ดีและก่อให้เกิดความสมดุลโดยเร็ว ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสามารถแยกได้ 3 ประเภท ดังนี้

**ตัวทำละลายชนิดมีขั้ว (Polar)** ตัวทำละลายชนิดนี้มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) สูงสามารถละลายในน้ำได้ เช่น แอลกอฮอล์ อะซิโตน

**ตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว (Non-polar)** จะมีความเฉื่อยในการทำปฏิกิริยาเคมี และมีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกต่ำ โดยทั่วไปไม่ละลายน้ำ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน เฮกเซน

สารประกอบอนุพันธ์คลอรีน เป็นตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำมาก ไม่ละลายน้ำ หนักกว่าตัวทำละลายมีขั้ว หรือตัวทำละลายไม่มีขั้ว

ตัวทำละลายอาจเรียงลำดับสภาพขั้วจากน้อยไปมากได้ดังนี้

ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane)	↓ น้อย          ↓ มาก
คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbontetrachloride)	
เบนซีน (Benzene)	
อีเทอร์ (Ether)	
คลอโรฟอร์ม (Chloroform)	
แอซิโตน (Acetone)	
เอทิล แอซิเตด (Ethyl acetate)	
เอทานอล (Ethanol)	
เมทานอล (Methanol)	
น้ำ (Water)	
กรด/เบส (Acid/Bases)	มาก

ความมีขั้วของสารละลาย

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมสารสกัด ได้แก่ น้ำ แอลกอฮอล์ หรือสารละลายผสมของสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ นอกจากนี้อาจใช้กรด เบส เติมลงในตัวทำละลายเพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายให้เหมาะสมอย่างยิ่งขึ้น ส่วนตัวทำละลายชนิดอื่นๆ เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม มีใช้บางกรณี

นอกจากนี้ตัวทำละลายสกัดชนิดต่างๆ ที่กล่าวมา และตัวทำละลายอินทรีย์อาจใช้ในการสกัดพืชสมุนไพรได้ เช่น เฮกเซน และปิโตรเลียมอีเทอร์ ใช้ในการสกัดสมุนไพรชั้นต้นเพื่อขจัดสารพวกไขมันออกไปก่อนที่จะทำการสกัดสารสำคัญ แต่ต้องระเหยเอาตัวทำละลายเหล่านี้ออกไปจนหมดก่อนทำการสกัดขั้นต่อไป ตัวทำละลายเหล่านี้นิยม ใช้สกัดองค์ประกอบที่มีขั้ว (Polar compound) เช่น ไขมัน (Lipids) สเตียรอยด์ (Steroids) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) เป็นต้น

คลอโรฟอร์ม และอีเทอร์ จัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว ปานกลาง ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว ไปจนถึงสารที่มีขั้วปานกลาง

เมทานอล (Methanol) เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารที่มีขั้ว เช่นเดียวกับแอลกอฮอล์ แต่นิยมใช้แอลกอฮอล์มากกว่า เพราะราคาถูกกว่าและมีความเป็นพิษน้อยกว่า

### การเลือกตัวทำละลาย

หลังจากการทำการเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรสำหรับการสกัดแล้วควรเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับชนิดของสารที่ต้องการสกัด โดยตัวทำละลายควรมีสมบัติดังนี้

1. มีความสามารถในการละลายสารสำคัญมากที่สุดและไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่นๆ ใต้น้อย เนื่องจากสารสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งจะมีโครงสร้างที่สลับซับซ้อนต่างกันและมีอยู่ในพืชทั้งที่อิสระและรวมตัวกับสารอื่นๆ ในสภาพเกลือหรือสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นจึงควรพิจารณาถึงสภาพหรือรูปแบบของสารสำคัญที่ต้องการสกัด นอกจากความมีขี้ของสารสำคัญแล้ว ในการเลือกต้องเลือกสิ่งๆ ที่เหมือนกันยอมละลายในกันและกัน (Like dissolved like) เช่น สมบัติความมีขี้ ควรเลือกตัวทำละลายที่มีขี้
2. ความคงตัวดี และหาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย
3. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
4. สภาพของพืชสมุนไพรที่ทำการสกัด เช่น เมล็ด เป็นส่วนที่มีไขมันอยู่มาก ควรทำการสกัดไขมันออกก่อน โดยสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ขี้ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เป็นต้น แล้วจึงนำพืชไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

### การทำสารสกัดให้เข้มข้น

การสกัดสารอย่างหยาบจะมีปริมาณมากหรือน้อย ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำสารมาทำให้เข้มข้นก่อน โดยมีวิธีการต่างๆ ดังนี้

**การระเหย (Free evaporation)** เป็นการนำตัวอย่างออกจากตัวทำละลาย โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (Water bath) หรือแผ่นความร้อน (Hot plate) วิธีนี้มีข้อเสียคือทำให้สารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป

**การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuo)** รัตนา อินทานุปรณ์ (2550, น.101) พบว่า วิธีนี้ที่นิยมมากที่สุด โดยระเหยเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เหลือเกือบเป็นสุญญากาศซึ่งใช้ปั๊มเป็นสุญญากาศ (Vacuum pump) หรือเรียกว่า เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)

ที่มา : Monstermarketplaceika (2012, ออนไลน์)

**การทำให้แห้ง (Drying)** เป็นการทำให้ตัวทำละลายออกจากสารสกัดจนแห้ง ทำให้ได้สารสกัดออกมาในสภาพที่แข็งและกึ่งแข็ง ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (Freeze dryer)

แอลตราฟิลเทรชัน (Ultrafiltration) เป็นการทำให้สารสกัดด้วยน้ำเข้มข้นโดยใช้แผ่นเยื่อบางๆ (Membrane) มีน้ำหนักมวลโมเลกุล (Molecular mass) สูงกว่า 5,000

## 2. การตรวจสอบสารสำคัญทางพฤษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

เป็นการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดในพืช เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นว่ามีสารเคมีกลุ่มใดบ้างที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น กลุ่มแอลคาลอยด์ กลุ่มไกลโคไซด์ เป็นต้น ทำให้สามารถวางแผนการสกัดแยกตามสมบัติทางเคมีของสารกลุ่มนั้นได้

การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารกลุ่มต่างๆ ในพืชควรเป็นวิธีที่ง่าย เร็ว และค่อนข้างจำเพาะกับกลุ่มสารเคมีที่ต้องการ มี 2 วิธี ดังนี้

### 1. การตรวจสอบโดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

ก่อนทำการตรวจสอบต้องเตรียมสารสกัดให้เหมาะสม ซึ่งมักจะมีปัญหาในเรื่องการเลือกตัวทำละลาย เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิดและมีสมบัติแตกต่างกัน การเลือกตัวทำละลายที่จะให้ได้สารกลุ่มที่ต้องการจึงทำได้ยาก นอกจากนี้อาจมีปัญหาระง่อนที่สารหลายชนิดปนกันอยู่ เกิดการจับกันอย่างหลวมๆ ทำให้การละลายของสารแตกต่างกันออกไปจากสมบัติในการละลายสารแต่ละชนิด ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะหาตัวทำละลายที่สมบูรณ์สามารถสกัดสารได้ทุกชนิด ส่วนใหญ่นิยมใช้แอลกอฮอล์หรือส่วนผสมของแอลกอฮอล์และน้ำความเข้มข้นร้อยละ 80 เนื่องจากสามารถละลายได้ทั้งสารที่มีขี้ และไม่มีขี้ แม้ว่าไม่ใช่ตัวทำละลายที่ดีที่สุดของกลุ่ม แต่ก็สกัดได้มากและมีจำนวนมากพอที่จะตรวจสอบเบื้องต้น

วิธีการสกัดแบบง่ายๆทำได้โดยนำผงยาที่ต้องการตรวจสอบมาเติมสารละลายผสมของ แอลกอฮอล์และน้ำความเข้มข้นร้อยละ 80 จนท่วมผงยา ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-7 วันเขย่าบ่อยๆหรือใน กรณีที่กลุ่มสารนั้นทนต่อความร้อน อาจนำไปทำการควมแน่นซ้ำหลายครั้ง หรือเรียกว่าการทำ รีฟลักซ์ (Reflux) บนหม้ออั้งไอน้ำจนเดือด 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรวจสอบควมน้ำยาสกัดมาผ่าน กระดาษกรองหรือสำลี

## 2. การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาสีหรือการเกิดตะกอน

รัตน อินทานุปกรณ (2550, น.64-64) กล่าวถึงการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีง่ายๆซึ่งจะให้ผล เป็นสีต่างๆ หรือเกิดการขุ่น หรือเกิดตะกอน ซึ่งวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นนี้ จัดเป็นวิธีง่ายรวดเร็ว มีความไว (Sensitivity) สูง แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มสารเคมีที่ต้องการ อาจเกิดผลบวกอำพราง (False- Positive Reaction) เนื่องจากสารประกอบอื่นที่ให้ผลเช่นเดียวกับสารตัวอย่าง หรืออาจ เกิดผลลบอำพราง (False-Negative Reaction) เนื่องจากสารประกอบอื่นที่ไม่ให้ผลเช่นเดียวกับสาร ตัวอย่าง สารสำคัญแต่ละชนิดจะไวต่อน้ำยาตรวจสอบไม่เท่ากัน จึงต้องระมัดระวังเรื่องปริมาณ น้ำยาตรวจสอบที่ใช้

### ตารางที่ 1 การใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีในการตรวจสอบกลุ่มสารต่างๆ

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent system)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection agent)
น้ำมันหอมระเหย	ซิลิกาเจล	โทลูอีน : เอทิลเอซีเตต (Toluene: Ethyl acetate) 93 : 7	วานิลลิน : กรดซัลฟูริก (Vanillin : Sulphuric acid) ให้สีแดง เหลือง น้ำตาล หรือ น้ำเงิน
แอลคาลอยด์	ซิลิกาเจล	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (Methanol: Chloroform) 85 : 15 โทลูอีน : เอทิลเอซีเตต : ไดเอทิลเอไมด์ (Toluene: Ethyl acetate: Diethylamine) 70 : 20 : 10	ดราเจนดอร์ฟรีเอเจนต์ (Dragendroff's reagents) ให้สีส้ม



ตารางที่ 1 (ต่อ) การใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีในการตรวจสอบกลุ่มสารต่างๆ

สารประกอบ (Compound)	ตัวดูดซับ (Adsorbent)	ระบบตัวทำละลาย (Solvent system)	น้ำยาตรวจสอบ (Detection agent)
ฟลาโวนอยด์	ซิลิกาเจล	คลอโรฟอร์ม : แอซี โทน : กรดฟอร์มิก (Chloroform: Acetone: Formic acid) 75 : 16.5 : 8.5 โทลูอีน : คลอโรฟอร์ม (Toluene: Chloroform) 9 : 11	เนเชอรัล โพรดักส์ (ไดฟีนิลบอริ ลอกซีเอทิลลามีน)-พอลิเอทิลีน ไกลคอล Diphenylboryloxyethylamine- polyethylene glycol ส่องด้วย แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) 365 นา โนเมตร เรืองแสงสีเหลือง ส้ม เขียว
แทนนิน	ซิลิกาเจล	คลอโรฟอร์ม : เม ทานอล (Chloroform : Methanol) 95 : 5 เอทิลแอซีเตต : เม ทานอล : น้ำ (Ethyl acetate : Methanol: water) 77 : 15 : 8	กรดฟลูออโรซัลโฟนิก (Fluorosulfonic acid) ให้สีแดง

ที่มา : รัตนา อินทานุภรณ์ (2550, น.77-79)

### 3. เทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography)

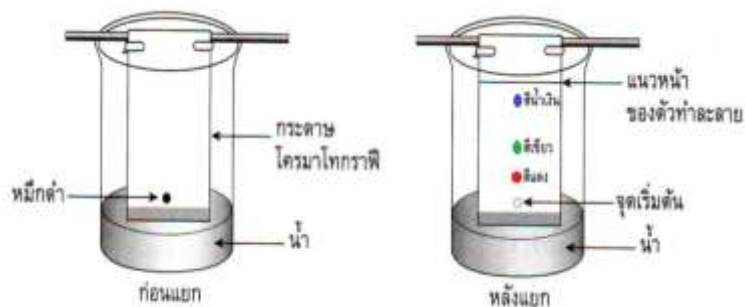
เป็นการแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยใช้สมบัติการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดระหว่างวัฏภาคที่แตกต่างกัน ปัจจุบันเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบที่สำคัญจากพืชสมุนไพร มีดังนี้

## 1. โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography)

รัตนา อินทานุปรกรณ์ (2550,น.128) ได้กล่าวว่าโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ เป็นโครมาโทกราฟีของเหลว (Liquid chromatography) โดยมีกระดาษกรองเป็นตัวดูดซับ กลไกการแยกจะเกิดแบบเป็นส่วน (Partition) มากกว่าการดูดซับ เนื่องจากเส้นใยเซลลูโลสของกระดาษมีความชื้นเป็นแผ่นฟิล์มอยู่รอบๆ ความพรุนของกระดาษจะเป็นตัวกำหนดการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย กระดาษที่มีความพรุนน้อยหรือละเอียดมากจะเคลื่อนที่ช้า ทำให้เกิดการแยกที่ดี ถ้ากระดาษมีความพรุนมาก ความสามารถในการแยกจะลดลง

วิธีการเตรียมโครมาโทกราฟีกระดาษทำได้โดยจัดเตรียมกระดาษกรองเพื่อใช้เป็นดูดซับซึ่งกระดาษกรองจะถูกนำมาเก็บในสถานะที่ควบคุมความชื้น เนื่องจากการแยกด้วยเทคนิคนี้ ส่วนใหญ่ส่วนที่แยกจะอยู่ในกระดาษกรองและวัฏภาคเคลื่อนที่

สารตัวอย่างที่จะทำการแยกองค์ประกอบจะต้องเป็นสารที่ละลายในตัวทำละลายที่ระเหยได้ โดยการนำสารไปจุดหรือสปอต (Spot) ลงบนกระดาษกรองให้เป็นจุดหรือแถบ (Band) โดยใช้หลอดแคปิลลารี (Capillary tube) จากนั้นนำสารที่ทำการจุดแล้วไปใส่ในภาชนะที่ทำด้วยแก้วมีฝาปิด โดยกระดาษจะถูกวางในลักษณะที่สอดคล้องกับการไหลของตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ไปตามแนวของกระดาษ ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 การแยกสีของหมึกดำโดยวิธีโครมาโทกราฟีกระดาษ

ที่มา : Suwannaramwittayakom (2012, ออนไลน์)

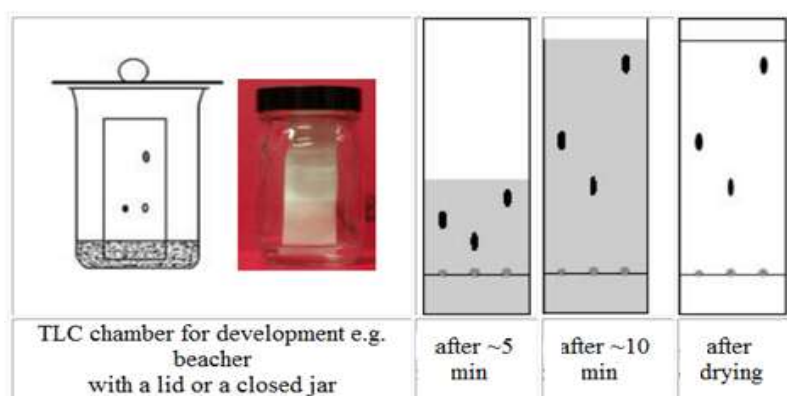
## 2. ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography; TLC)

เป็นการแยกสารโดยการใช่วัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นแผ่นเคลือบบนตัวดูดซับที่อาจจะเป็นแก้วหรืออะลูมิเนียม เมื่อหยดสารผสมลงวัฏภาคคงที่แล้วจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ในแทงก์ ซึ่งมีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมอยู่เพื่อให้เกิดกระบวนการที่สารจะล้างจะเคลื่อนที่ผ่าน ไปบนวัฏภาคเคลื่อนที่ เรียกว่า Development ขณะที่เกิดการ Development สารจะเกิดการแยกออกจากกัน

### ข้อดีของทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography ; TLC)

1. ใช้เวลาในการ Develop น้อย
2. ไม่มีเส้นใย (Fiber) ทำให้ band diffusion หรือ zone boarding น้อยลง ทำให้แยกสารได้ดี
3. มีความไวในการตรวจสอบมากกว่า
4. ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยก็สามารถแยกได้ จึงมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ

การแยกโดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่ได้ผลดีจะต้องให้โครมาโทแกรมที่แต่ละจุดแยกออกจากกันอย่างชัดเจนแสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ตัวอย่างโครมาโทแกรมโดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ที่มา : Chem.ucla.edu (2009, ออนไลน์)

#### การแยกสาร

การแยกสารทำได้โดยใช้บีกเกอร์หรือภาชนะที่มีขนาดพอเหมาะที่มีฝาปิด หรือใช้กระดาษนาฬิกา ผสมตัวทำละลายที่ต้องการใส่ลงไปในระดับที่ตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสารละลายตัวอย่าง จากนั้นทิ้งจนกว่าตัวทำละลายซึมผ่านจุดของสารตัวอย่างจนถึงเส้นที่ขีดบอกระดับตัวทำละลาย นำแผ่น TLC ออกแล้วปล่อยให้แห้ง

#### การตรวจสอบหลังจากการ Developing

ในกรณีสารที่มีสีถูกแยกออกมา เห็นตำแหน่งของสารชัดเจน ถ้ามีความเข้มมากพอและไม่มี การกระจายจุดระหว่างการทำ Developing

กรณีสารที่ไม่มีสีถูกแยกออกมา ตำแหน่งของสารสามารถหาได้ดังนี้

1. การใช้ Ultraviolet lamp ถ้าสารนั้นเป็น UV fluorescent compound สังเกตโดยการเรืองแสงบนแผ่น TLC ในที่มีด
2. ตัวดูดซับที่มี Fluorescent indicate อยู่เคลือบบนแผ่น TLC ตัวดูดซับแบบธรรมดาจะไม่เรืองแสง (Non-fluorescent compound) จะปรากฏเป็นจุดสีดำนที่สว่างเนื่องจาก UV lamp
3. ใช้ detecting agent เป็นตัวตรวจตำแหน่งสาร ได้แก่
4. Iodine vapour นำแผ่น TLC ใส่ในผลึกไอโอดีน จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีน ยกเว้น หมู่แอลคิล (Alkyl group), แฮไลด์ (Halide), แอลคีน (Alkene) เกิดเป็นผลึกสีน้ำตาลหรือม่วงเกิดขึ้น นำออกแล้วล้างจุดด้วยดินสอ
5. ในกรณีตัวดูดซับเป็น Inorganic adsorbents สามารถตรวจตำแหน่งได้โดยการสเปรย์กรดซัลฟิวริกเข้มข้น หรือสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 10 ของสารละลายเมทานอล แล้วนำแผ่น TLC ไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส จนปรากฏจุดสีดำน แล้วล้างตำแหน่งที่มีสารอยู่
6. ใช้ Detecting agent ที่เฉพาะสารแต่ละชนิด เช่น Ninhydrin ตรวจหาสารประกอบจำพวกกรดแอมิโน

การตรวจสอบหลังการ Developing คือ การพิจารณาตำแหน่งสารว่า ภูมิภาคเคลื่อนที่สามารถพาสารไปบนตัวดูดซับได้มากน้อยเพียงใด แล้วนำมาคำนวณหาอัตราเร็วในการไหล (Rate of flow) เป็นค่า  $R_f$

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

### ประโยชน์ของทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

สามารถใช้ได้กับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ แต่จะนิยมนำมาทำการวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพมากกว่า ส่วนการวิเคราะห์ในเชิงปริมาณจะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Preparative TLC นอกจากนี้ยังช่วยในการศึกษาและวิเคราะห์สาร ปฏิกิริยาและความบริสุทธิ์ของสาร ซึ่งใช้ในการศึกษาโครงสร้างของสารอินทรีย์

### 3. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)

การแยกสารโดยอาศัยหลักการละลายที่ต่างกันไปใน 2 ภูมิภาค คือ ภูมิภาคคงที่ (Stationary Phase) กับ ภูมิภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) โดยสารในภูมิภาคคงที่จะทำหน้าที่ดูดซับ (Adsorb)

สารผสมด้วยแรงไฟฟ้าสถิต สารที่ใช้ทำวัฏภาคอยู่กับที่จึงมีลักษณะเป็นผงละเอียดมีพื้นที่ผิวมาก เช่น อะลูมินา (Alumina,  $Al_2O_3$ ) ซิลิกาเจล (Silica gel,  $SiO_2$ ) หรืออาจจะใช้วัสดุที่สามารถดูดซับได้ดี เช่น ซอติก กระดาษ ซึ่งสารที่ทำหน้าที่ดูดซับในวัฏภาคคงที่ เช่น น้ำ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนจะทำหน้าที่ชะ (Elute) เอาสารผสมออกจากวัฏภาคคงที่ให้เคลื่อนที่ไปด้วย การจะเคลื่อนที่ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับแรงดึงดูดระหว่างในสารผสมกับตัวดูดซับในวัฏภาคคงที่ ดังนั้นสารที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่จึงได้แก่ พวกตัวทำละลาย เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เบนซีน เป็นต้น

### ข้อดีของโครมาโทกราฟี

1. สามารถแยกสารที่มีปริมาณน้อยได้
2. สามารถแยกได้ทั้งสารที่มีสี และ ไม่มีสี
3. สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้
4. สารที่มีค่า  $R_f$  เท่ากันอาจแยกออกจากกันได้ จะต้องเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลาย หรืออัตราส่วนผสมของตัวทำละลาย หรือ เพิ่มความยาวกระดาษ

### ตัวดูดซับ

จะต้องเลือกสารให้เหมาะสมกับสารประกอบที่ต้องการแยก โดยสารที่ประกอบนั้นจะต้องมีขั้วมากจะต้องใช้สารที่มีความดูดซับที่มีขั้วน้อย เพื่อเกิดการดูดซับบนสารดูดซับน้อย หรือมีขั้วน้อยจะต้องใช้สารที่มีความดูดซับที่มีขั้วมาก สารที่ใช้นิยมใช้กันโดยทั่วไปคือ อะลูมินา ( $Al_2O_3$ ) ซิลิกาเจล ( $SiO_2$ ) โดยเฉพาะ ซิลิกาเจลจะดีมากกว่าสารทุกชนิด โดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์เป็นกรดหรือเบสที่อ่อนมาก ส่วนอะลูมินาใช้ได้ดีกับสารที่เป็นเบส

### สารชะล้าง

การเลือกสารชะล้างต้องเลือกสารที่ใช้พอเหมาะกับควมมีขั้วของสารที่ต้องการแยก ซึ่งสารแต่ละชนิดมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ออกจากตัวดูดซับไม่เท่ากัน โดยทั่วไปสารที่มีขั้วมากถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า สารที่มีขั้วน้อยถูกดูดซับได้น้อยกว่าจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน สารที่นิยมนำมาชะล้างที่นิยมใช้ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เฮกเซน เพนเทน ไโซโคลเฮกเซน คาร์บอน เททระคลอไรด์ อีเทอร์ปราศจากน้ำ เอทานอล เมทานอล และ น้ำ เป็นต้น

การแยกสารให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อาจใช้สารชะล้างตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปในการแยกสาร ในการเพิ่มขั้วของสารจะต้องค่อยเพิ่มอย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันการเกิดการแตกหรือแยก (Crack) ของคอลัมน์ แล้วจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการแยกลดลง

### อัตราการไหล

อัตราการไหลของสารออกจากคอลัมน์จะมีผลต่อการแยกสาร เวลาที่ใช้ในการแยกสารผสมในคอลัมน์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนสมมูลที่เกิดขึ้นระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ ฉะนั้นสารที่คล้ายกันอยู่ในคอลัมน์นานพอก็สามารถแยกออกจากกันได้ ฉะนั้นสารที่อยู่ในคอลัมน์จึงขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของสารชะล้าง

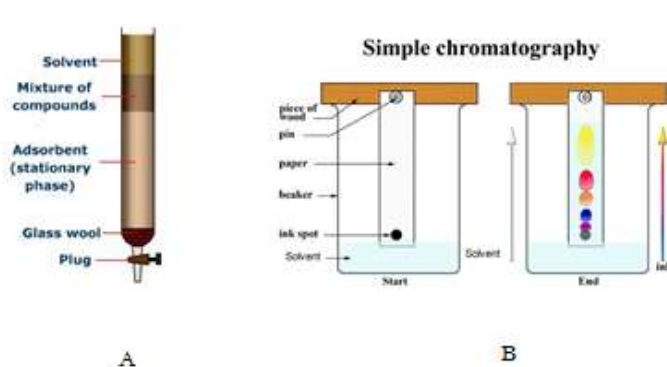
### การเตรียมคอลัมน์

การเตรียมคอลัมน์ เป็นสิ่งสำคัญอย่างมากต่อการแยกสารว่าจะเกิดขึ้นดีหรือไม่ซึ่งมีวิธีการเตรียมคอลัมน์ทำได้ดังนี้

1. ยึดคอลัมน์ที่ต้องการใช้กับขาตั้งให้มั่นคงในแนวตั้ง ปิดปลายด้านล่างเพื่อไม่ให้สารชะล้างไหลออกมาขณะเติมสารลงไป
2. ใส่สารชะล้างลงไปคอลัมน์เพียงเล็กน้อย จากนั้นใส่สำลีหรือใยแก้วลงไปเพื่ออุดปลายต้นด้านล่างของคอลัมน์ ใช้แท่งแก้วคดสำลีหรือใยแก้วเบาๆ เพื่อไล่อากาศที่มีอยู่ในสำลีหรือใยแก้วออกให้หมด
3. บรรจุสารดูดซับที่ต้องการลงในคอลัมน์ โดยเติมสารชะล้างเพิ่มจนมีความสูงพอประมาณ ซึ่งสารดูดซับหรือซิลิกาเจลให้มีน้ำหนักประมาณ 25-50 เท่าของน้ำหนักสารที่ถูกแยกแล้วทำเป็น Slurry โดยนำสารดูดซับมาผสมกับสารชะล้างในอัตราส่วน 1: 10 คนเข้ากันไม่ให้มีฟองอากาศ แล้วเทลงในคอลัมน์ ขณะเทต้องเปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์เพื่อให้สารชะล้างไหลออกมาอย่างช้าๆ และใช้หลอดหยดชะล้างสารดูดซับที่อยู่ติดด้านข้างของคอลัมน์ทิ้งไว้สักครู่
4. เติมสารชะล้างลงไปคอลัมน์เบาๆ และปล่อยให้สารชะล้างไหลต่อไป พร้อมกับเคาะด้านข้างของคอลัมน์ด้วยสายยางเบาๆ เพื่อให้คอลัมน์แน่นขึ้น เรียบ และสม่ำเสมอ

### การลงสารตัวอย่างลงในคอลัมน์

หลังจากการเตรียมคอลัมน์แล้วเรียบร้อยให้ใส่ (Load) สารละลายตัวอย่างซึ่งละลายในสารอินทรีย์ที่มีขั้วน้อยที่สุดที่สามารถละลายสารตัวอย่างได้และต้องมีปริมาณน้อยๆ ปล่อยให้สารตัวอย่างค่อยๆ เคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับ โดยค่อยๆ เปิดก๊อก และเติมตัวทำละลายน้อยเพื่อชะสารตัวอย่าง จากนั้นจึงค่อยเพิ่มปริมาณตัวทำละลายขึ้นเพื่อให้เกิดการแยก เก็บสารละลาย (Eluate) ที่แยกออกจากคอลัมน์เป็นส่วนๆ ในภาชนะที่เหมาะสม และตรวจดูสารในแต่ละส่วนทำได้โดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 A ลักษณะการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

B การตรวจสอบที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ที่มา : Th.wikipedia.org และ Micromountain (2012, ออนไลน์)

#### 4. ไม้กฤษณา

เสริมสกุล พจนการุณ (2551, น. 1) กล่าวว่า ไม้กฤษณาหรือไม้หอม เป็น ไม้ในสกุล เอควิลาเรีย (*Aquilaria*) อยู่ในวงศ์ไทมेलิอี (*Thymelaeaceae*) คำว่า *Aquilaria* มาจากภาษาลาติน และภาษาอิตาลีคือ “Aquila” หรือ “Aquilae” ภาษาลาติน หมายถึง นกอินทรี “eque” ภาษาอิตาลี หมายถึง คำ เข้ม กลางวัน ในภาษาบาลี เรียกว่า อครุ และคร ในภาษาจีน เรียกว่า ต้มเฮียง หมายถึง ไม้หอมที่จมน้ำ ในภาษาอังกฤษมีหลายชื่อเรียก เช่น อีเกิ้ลวูด (Eagle wood) อะการ์วูด (Agar wood) คาร์ลัมบัก หรือกะลัมปัก (Calambac) และมาเลเซีย เรียกว่า Gaharu เป็นต้น ปัจจุบันทั่วโลกมีไม้กฤษณาทั้งหมด 16 สายพันธุ์กระจายอยู่ในแถบเอเชียเขตร้อนตั้งแต่เอเชียเหนือเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ไม้กฤษณาและแหล่งที่พบไม้กฤษณา

ชื่อสายพันธุ์	แหล่งที่พบ
1. เอควิลาเรีย สับอินทกร้า ( <i>Aquilaria Subintegra</i> )	ไทย
2. เอควิลาเรีย คลาสน่า ( <i>Aquilaria crassna</i> )	ไทย กัมพูชา ลาว เวียดนาม

ที่มา : เสริมสกุล พจนการุณ (2551, น. 7)

ตารางที่ 2 (ต่อ) สายพันธุ์ไม้กฤษณาและแหล่งที่พบไม้กฤษณา

ชื่อสายพันธุ์	แหล่งที่พบ
3. เอกวิลาเรีย มาลัคแคนซิส ( <i>Aquilaria malaccensis</i> )	ไทย อินเดี ย อิน โดนีเซีย
4. เอกวิลาเรีย อาปีคูลาตาร์ ( <i>Aquilaria apiculata</i> )	ฟิลิปปินส์
5. เอกวิลาเรีย ไบโลนิล ( <i>Aquilaria baillonil</i> )	ไทย กัมพูชา ลาว เวียดนาม
7. เอกวิลาเรีย เบคคาเรียน ( <i>Aquilaria beccarian</i> )	อินโดนีเซีย
8. เอกวิลาเรีย เบรช ไชยันท้ำ ( <i>Aquilaria brachyantha</i> )	มาเลเซีย
9. เอกวิลาเรีย คัมมิงเจียนนาร์ ( <i>Aquilaria cumingiana</i> )	อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์
10. เอกวิลาเรีย ฟิลาเรีย ( <i>Aquilaria filaria</i> )	นิวกีนิ จีน
11. เอกวิลาเรีย แกรนด์ฟลอร์ร่า ( <i>Aquilaria grandiflora</i> )	จีน
12. เอกวิลาเรีย ฮิลตา ( <i>Aquilaria hilata</i> )	อินโดนีเซีย มาเลเซีย
13. เอกวิลาเรีย คะฮาร์เซียน่า ( <i>Aquilaria khasiana</i> )	อินเดีย
14. เอกวิลาเรีย ไมโครคาร์ป้า ( <i>Aquilaria microcarpa</i> )	อินโดนีเซีย มาเลเซีย
15. เอกวิลาเรีย โรสตราต้า ( <i>Aquilaria rostrata</i> )	มาเลเซีย
16. เอกวิลาเรีย ไชเนนซิส ( <i>Aquilaria sinensis</i> )	จีน



สำหรับประเทศไทยพบสกุลไม้กฤษณาทั้งหมด 7 ชนิด และไม้กฤษณาน้อยอีก 1 ชนิด ดัง  
ตารางที่ 3

### ตารางที่ 3 สกุลไม้กฤษณาและแหล่งที่พบในประเทศไทย

ชื่อสายพันธุ์	แหล่งที่พบ
1. เอควิลาเรีย คลาสน่า ( <i>Aquilaria crassna</i> )	จันทบุรี ตราด นครราชสีมา นครนายก ปราจีนบุรี (เขาใหญ่)
2. เอควิลาเรีย มาลัคเคนซิส ( <i>Aquilaria malaccensis</i> )	ตรัง (เขาช่องและสี่เกา)
3. เอควิลาเรีย เฮอตา ( <i>Aquilaria hirta</i> )	นราธิวาส (สุไหงโกลก เวียงสุคีริน และ ภูเขาทอง)
4. เอควิลาเรีย ไชเนนซิส ( <i>Aquilaria sinensis</i> )	เชียงราย
5. เอควิลาเรีย สับอินทกร้า ( <i>Aquilaria Subintegra</i> )	ปัตตานี (เขาลีเขา) นราธิวาส (เวียงและ สุไหงโกลก)
6. เอควิลาเรีย รโกซา ( <i>Aquilaria rugosa</i> )	ภาคเหนือ
7. เอควิลาเรีย ไบโลนิิน ( <i>Aquilaria baillonil</i> )	รอยต่อระหว่างประเทษพม่า ภาคตะวันออก ออกเฉียงเหนือ
8. กฤษณา ( <i>Gyrinops vidalii</i> P.H.OH)	ประเทศลาว (เวียงจันทร์) เขตรักษาพันธุ์ สัตว์ป่าภูวัว อ.บึงคล้า จ.หนองคาย

ที่มา : เสริมสกุล พจนการุณ (2551, น. 8-14)

นอกจากนี้สายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4

#### ตารางที่ 4 สายพันธุ์ไม้กฤษณาที่ปลูกและแหล่งที่พบในประเทศไทย

ชื่อสายพันธุ์	แหล่งที่พบ
1. เอกวิลาเรีย สับอินทิกร้า ( <i>Aquilaria subintegra</i> )	ภาคตะวันออก คือ จังหวัดตราด และบางพื้นที่ของจังหวัดจันทบุรี
2. เอกวิลาเรีย คลาสน่า ( <i>Aquilaria crassna</i> Pierre ex Lec.)	อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ นครนายก ปราจีนบุรี
3. เอกวิลาเรีย มาลัคเคนซิส ( <i>Aquilaria malaccaensis</i> )	ภาคใต้ ประจวบคีรีขันธ์ พัทลุง ตรัง ระนอง ปัตตานี
4. กฤษณาน้อย ( <i>Gynerium nobile</i> P.H.HO)	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูวัว อ.บุ่งคล้า จ.หนองคาย ทางตอนบนของภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ

ที่มา : เสริมสกุล พจนการุณ (2551, น. 8-14)

#### สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

##### กฤษณา

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Aquilaria crassna pierre ex lecomte</i>
วงศ์	Thymelaeaceae
ชื่อสามัญ	-
ชื่ออื่น	กฤษณา (ภาคตะวันออก) กายูการู กายูกาฮู (มาเลเซีย ปัตตานี) ไม้หอม (ภาคตะวันออก ภาคใต้) (บาลี) อครู, ตคร (จีน) คัมเขียง (ไม้หอมที่จมน้ำ) (อังกฤษ) Eagle Wood, Lignum Aloes, Agarwood, Aloe Wood, Calambac, Aglia, Akyaw.



ภาพที่ 10 ลักษณะใบ ดอก และผลของ *A. Aquilaria crassna pierre ex lecomte*  
ที่มา : Borraikrisana (2012, ออนไลน์)

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เสริมสกุล พจนการุณ (2551, น. 11-12) กล่าวถึง ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไม้กฤษณาว่าเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 5 เมตร ลำต้นมีเปลือกเรียบ หรือค่อนข้างเรียบ สีเทาปนขาว เปลือกลำต้นชั้นในสีเหลืองอ่อน เหนียวใบรูปรียาวแหลมถึงรูปไข่ ฐานใบสอบหรือมน ขนาดแผ่นใบ 19 -27.5 × 7-10.5 แผ่นใบมีเนื้อใบคล้ายแผ่นกระดาษ ท้องใบมีขนประปรายจนถึงเกือบเกลี้ยง ก้านใบยาว 5-10 มิลลิเมตร มีขนประปราย ช่อดอกออกเป็นกระจุก ออกตามซอกใบ กระจุกละ 8-20 ดอก ก้านช่อดอกมีขนประปราย ก้านช่อดอกยาว 1-3 มิลลิเมตร ดอกย่อยสีขาว ก้านดอกย่อยยาว 6-13 มิลลิเมตร มีขนนุ่มประปราย หลอดกลีบเลี้ยงยาว 5-14 มิลลิเมตร ด้านนอกมีขน เล็กน้อยจนถึงเกลี้ยง ด้านในมีขนนุ่ม บริเวณฐานหลอด กลีบเลี้ยงมีขนาด 3.5 × 1.2-2.5 มิลลิเมตร พบมีขนนุ่มบริเวณส่วนบน แต่ด้านนอกเกลี้ยง ขอบกลีบดอกมีขนอุย กลีบดอกเชื่อมติดกันที่ฐาน มีขนอุยปกคลุม ขนาดกลีบดอก 1-1.5 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้ไม่มีก้านชู อับเรณูยาว 1.5-2 มิลลิเมตร รังไข่ไม่มีก้านชูยาว 2-3 มิลลิเมตร มีขนประปราย ก้านชูปลายเกสรตัวเมียยาว 0.5-1 มิลลิเมตรปลายเกสรตัวเมียรูปกลม ขนาด 1 มิลลิเมตร ผลรูปรี เมล็ดรีแคบๆและมีขนประปรายปกคลุม รยางค์เกลี้ยง

#### สรรพคุณ

นันทวัน บุญยะประกัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร (25392) ได้กล่าวถึงสรรพคุณของเนื้อไม้กฤษณา ว่ามีรสขม หอม เป็นยาบำรุงหัวใจ ใช้ปรุงเป็นยาหอมแก้ลมหน้ามีดวงเวียน ใช้ผสมในเครื่องหอม เช่น รูปหอม น้ำมันไทย เป็นยาใช้รักษาโรคปวดข้อ น้ำมันจากเมล็ด รักษาโรคเรื้อน และโรคผิวหนังได้

### การขยายพันธุ์

เพาะเมล็ด

### ถิ่นกระจายพันธุ์

กระจายพันธุ์อยู่ใน คาบมลายู และในกัมพูชา

### การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย

พบในจังหวัดปัตตานี อำเภอเวียงเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฮาลา-บาลา จังหวัดนราธิวาส และพบทางภาคตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะเขาสอยดาวจังหวัดจันทบุรี

### นิเวศวิทยา

ขึ้นกระจายอยู่ทั้งในป่าดิบแล้ง และป่าดิบชื้น ในบริเวณที่ดินร่วน ดินร่วนปนทราย ระบายน้ำดีเป็นสันดอน ที่ระดับความสูง 300 - 500 เมตร จากความสูงของระดับน้ำทะเล

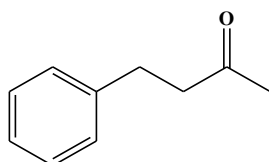
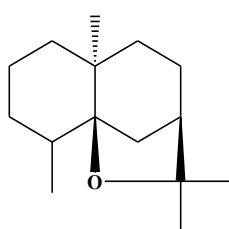
## 5. สารสำคัญที่พบในใบกฤษณา

สำหรับสารสำคัญแต่ละชนิดที่ค้นพบใน ใบกฤษณาแต่ละสายพันธุ์ดังในตารางดังนี้

ตารางที่ 5 โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ *Aquilaria agallocha*

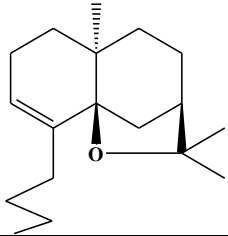
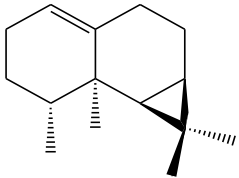
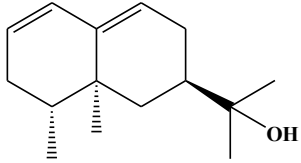
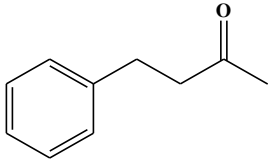
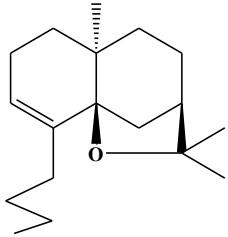
Roxb.(Thymelaeaceae)

สารประกอบ	สายพันธุ์ที่พบ	แหล่งที่มา
$\beta$ -agarofuran	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb. (Thymelaeaceae)	จอร์จบูชี และ ฮานส์ วูคส์ (George Buchi and Hans Wuest, 1979)
benzylacetone	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb. [Agarwood oil] (Thymelaeaceae)	ชิโรอากิ ทาคิโมโตะ และคณะ (Hiroaki Takemoto <i>et al.</i> , 2008)

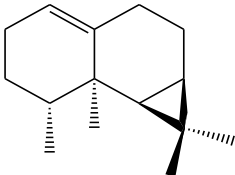


ตารางที่ 5 (ต่อ) โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ *Aquilaria agallocha*

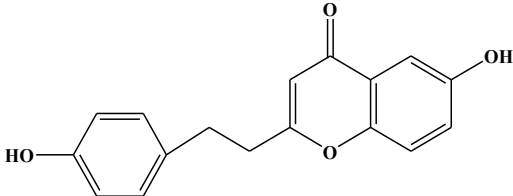
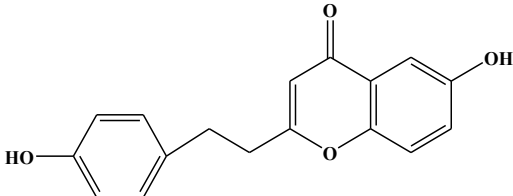
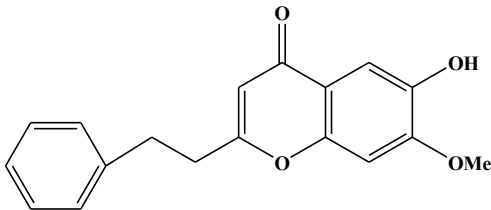
Roxb.(Thymelaeaceae)

สารประกอบ	สายพันธุ์ที่พบ	แหล่งที่มา
4-butyl- $\alpha$ -agarofuran หรือ AF-5 	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb. (Thymelaeaceae)	ยี่าง และคณะ (Yi Zhang <i>et al.</i> , 2004)
calarene 	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb. [Agarwood oil] (Thymelaeaceae)	อิโรากิตาคิโมโต และคณะ (Hiroaki Takemoto <i>et al.</i> , 2008)
dehydrojinkoh-eremol 	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb. (Thymelaeaceae)	มะชะกะซุอิชิฮารา และคณะ (Masakazu Ishihara <i>et al.</i> , 1993)
Benzylacetone 	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb. [Agarwood oil] (Thymelaeaceae)	อิโรากิตาคิโมโต และคณะ (Hiroaki Takemoto <i>et al.</i> , 2008)
4-butyl- $\alpha$ -agarofuran หรือ AF-5 	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb. (Thymelaeaceae)	ยี่าง และคณะ (Yi Zhang <i>et al.</i> , 2004)

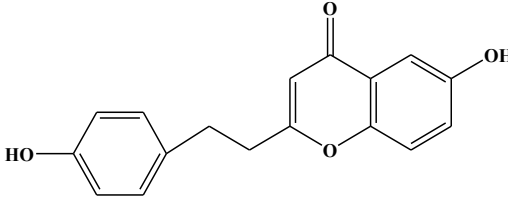
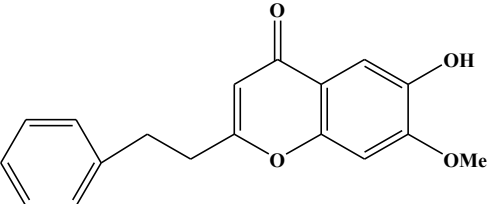
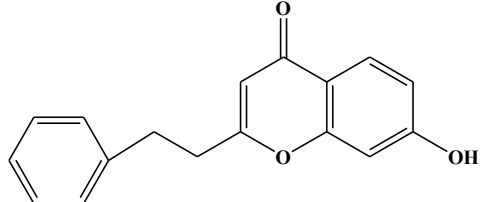
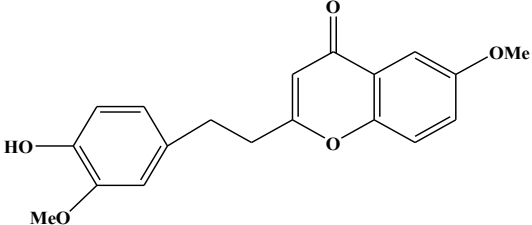
ตารางที่ 5 (ต่อ) โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ *Aquilaria agallocha*

Roxb.(Thymelaeaceae)		
สารประกอบ	สายพันธุ์ที่พบ	แหล่งที่มา
Calarene	<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb. [Agarwood oil] (Thymelaeaceae)	อิโรากิทาเคโม โตะ (Hiroaki Takemoto <i>et al.</i> , 2008)
		

ตารางที่ 6 โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ *Aquilaria malaccensis*

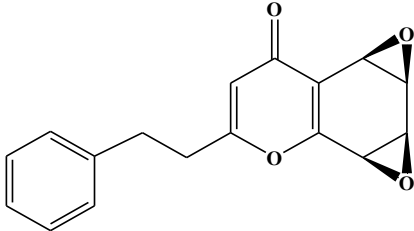
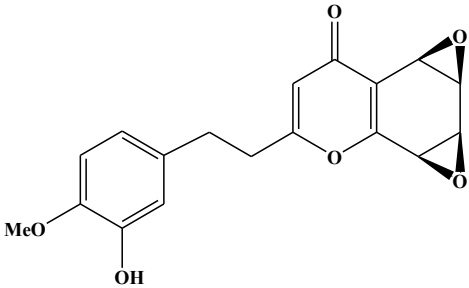
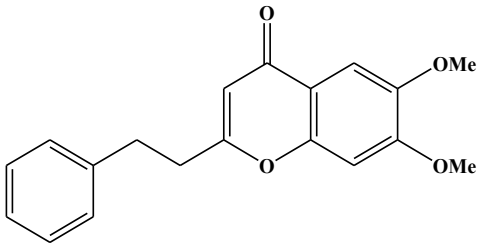
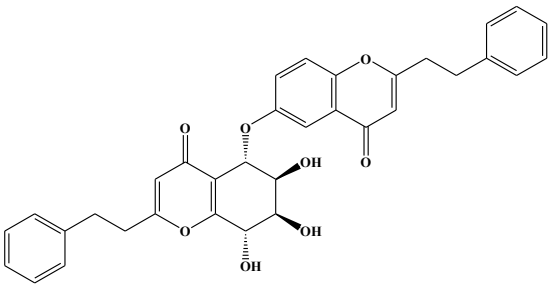
Lamk. (Thymelaeaceae)		
สารประกอบ	สายพันธุ์ที่พบ	แหล่งที่มา
6-hydroxy-2-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl] chromone	<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk. (Thymelaeaceae)	เทนจิโคนิชิ และ คณะ(Tenji Konishi <i>et al.</i> , 2002)
		
6-hydroxy-2-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl] chromone	<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk. (Thymelaeaceae)	เทนจิโคนิชิ และ คณะ(Tenji Konishi <i>et al.</i> , 2002)
		
6-hydroxy-7-methoxy-2-(2-phenylethyl) chromone	<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk. (Thymelaeaceae)	เทนจิโคนิชิ และคณะ (Tenji Konishi <i>et al.</i> , 2002)
		

ตารางที่ 6 (ต่อ) โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ *Aquilaria malaccensis*

Lamk. (Thymelaeaceae)		
สารประกอบ	สายพันธุ์ที่พบ	แหล่งที่มา
6-hydroxy-2-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]chromone	<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk. (Thymelaeaceae)	เทนจิ โคนิชิ และคณะ(Tenji Konishi <i>et al.</i> , 2002)
		
6-hydroxy-7-methoxy-2-(2-phenylethyl)chromone	<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk. (Thymelaeaceae)	เทนจิ โคนิชิ และคณะ(Tenji Konishi <i>et al.</i> , 2002)
		
7-hydroxy-2-(2-phenylethyl)chromone	<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk. (Thymelaeaceae)	เทนจิ โคนิชิ และคณะ(Tenji Konishi <i>et al.</i> , 2002)
		
6-methoxy-2-[2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl) ethyl]chromone	<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk. (Thymelaeaceae)	เทนจิ โคนิชิ และคณะ(Tenji Konishi <i>et al.</i> , 2002)
		

ตารางที่ 6 (ต่อ) โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากกฤษณาในสายพันธุ์ *Aquilaria crassna*

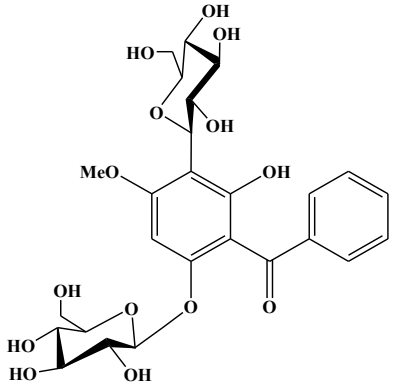
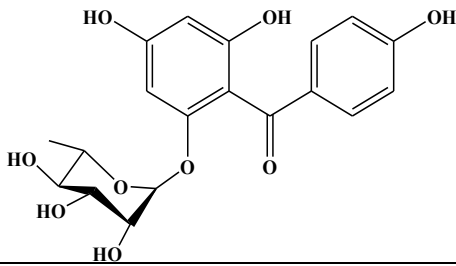
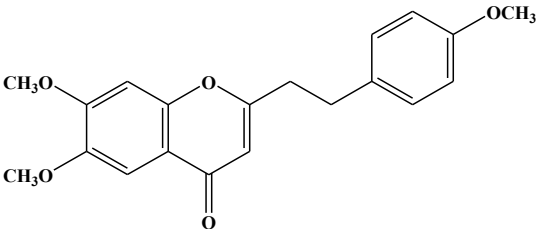
Pierre ex Lec. (Thymelaeaceae)

สารประกอบ	สายพันธุ์ที่พบ	แหล่งที่มา
oxidoagarochromone A	<i>Aquilaria crassna</i> Pierre ex Lec. (Thymelaeaceae)	ตุรียากูระและคณะ (Toru Yagura <i>et al.</i> , 2005)
		
oxidoagarochromone C	<i>Aquilaria crassna</i> Pierre ex Lec. (Thymelaeaceae)	ตุรียากูระและคณะ (Toru Yagura <i>et al.</i> , 2005)
		
AH <sub>6</sub>	<i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Gilg. (Thymelaeaceae)	ตุรียากูระและคณะ (Toru Yagura <i>et al.</i> , 2003),
		
AH <sub>10</sub>	<i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Gilg. (Thymelaeaceae)	ตุรียากูระและคณะ (Toru Yagura <i>et al.</i> , 2003)
		

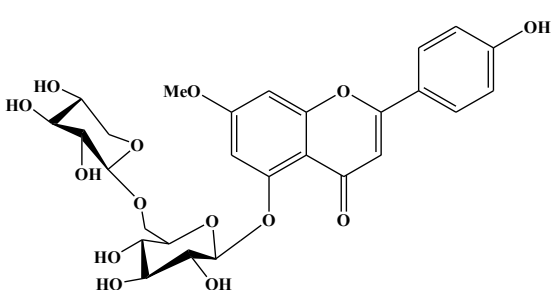


ตารางที่ 7 โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากฤๅษณาในสายพันธุ์ *Aquilaria sinensis* (Lour.)

Gilg. (Thymelaeaceae)

สารประกอบ	สายพันธุ์ที่พบ	แหล่งที่มา
ififlophenone-3,5-c- $\beta$ -diglucoside 	<i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Gilg. (Thymelaeaceae)	อิเดากิ ฮาร่า และ คณะ (Hideaki Hara <i>et al.</i> , 2008)
iriflophenone-2-o- $\alpha$ -rhamnoside 	<i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Gilg. (Thymelaeaceae)	อิเดากิ ฮาร่า และคณะ (Hideaki Hara <i>et al.</i> , 2008)
6,7-dimethoxy-2-[2-(4'-methoxyphenyl) ethyl]chromone 	<i>Aquilaria</i> <i>sinensis</i> (Lour.) Gilg. (Thymelaeaceae)	ชูหยวน ฉี และคณะ (Shu-Yuan Qi <i>et al.</i> , 2005)

ตารางที่ 7 โครงสร้างของสารประกอบที่ค้นพบจากฤๅณาในสายพันธุ์ *Aquilaria sinensis* (Lour.)

Gilg.(Thymelaeaceae)		
สารประกอบ	สายพันธุ์ที่พบ	แหล่งที่มา
genkwantin-5-o-β-primeveroside	<i>Aquilaria</i>	อิเดากิ ฮาร่า
	<i>sinensis</i> (Lour.) Gilg. (Thymelaeaceae)	และคณะ (Hideaki Hara <i>et al.</i> , 2008)

## 6. สารกลุ่มแอลคาลอยด์

บุญชู ศรีตุลารักษ์ (2553, น. 2) ได้กล่าวถึง แอลคาลอยด์ว่ามีรากศัพท์มาจากคำว่า “Alkali” ซึ่งหมายถึงสมบัติของสารที่มีสมบัติคล้ายด่าง (Alkali-like) มีนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความหมายของแตสารกลุ่มนี้จำนวนมาก เริ่มตั้งแต่ในปี พ.ศ. 2362 มีเกสซกรชื่อ W.Meissner ได้ให้ความหมายว่า แอลคาลอยด์เป็นสารที่มีสมบัติคล้ายด่างที่ได้จากพืช โดยในความหมายนี้ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแอลคาลอยด์กับสารกลุ่มอื่นที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบได้ ซึ่งในปี พ.ศ. 2463 อี. วินเทอร์สไตน์ และ จี. ไตร (E. Winterstein and G.Trie) ให้คำนิยามไว้ในหนังสือชื่อ ไค แอลคาลอยด์ “Die Alkaloide” ว่า แอลคาลอยด์เป็นสารที่ได้จากพืช โดยมีไนโตรเจนอยู่ไรดครงสร้างที่ซับซ้อนที่มีลักษณะเป็นวง มีสมบัติคล้ายด่างและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ต่อมาในปี พ.ศ. 2529 S. W. Pelletier ให้คำจำกัดความของแอลคาลอยด์ไว้ว่า แอลคาลอยด์เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนที่อยู่ในสถานะออกซิเดชันเป็นลบในโครงสร้างที่เป็นวง โดยพบการกระจายตัวอย่างจำกัดในสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่า สารแอลคาลอยด์เป็นสารที่มีสมบัติเป็นด่าง ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

แอลคาลอยด์เป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืชชั้นสูง พบบ้างในพืชชั้นต่ำ สัตว์ และจุลินทรีย์ เป็นกลุ่มสารที่ถูกนำมาใช้มากในการเป็นยารักษาโรค แอลคาลอยด์เป็นสารอินทรีย์ที่มีลักษณะโดยรวมคือส่วนใหญ่มีสมบัติเป็นเบสและมีไนโตรเจน (Nitrogen) อยู่ในโมเลกุล มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) เป็นสารที่พบมากในพืชใบเลี้ยงคู่ ที่พบได้บ่อยเช่น วงศ์ อะโปไซนาซีอี (Apocynaceae) พาพาเวอราซีอี (Papaveraceae) พาพิลออนนาซีอี (Papilionaceae) รูเบียซีอี (Rubiaceae) รูทาซีอี (Rutaceae) มีนิสเปอร์มาซีอี (Menispermaceae)

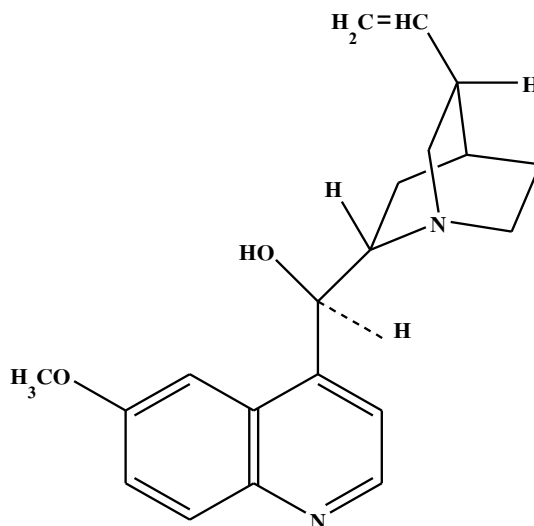
ลอร่าซีอี (Lauraceae) โสทานาซีอี (Solanaceae) โลกานีเอซีอี (Loganiaceae) เบอรับีไรดาซีอี (Berberidaceae) และ คอมโพสิตี (Compositae) พืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่พบแอลคาลอยด์ เช่น วงศ์ลิเลียซีอี (Liliaceae) และ อมาริลลิดาซีอี (Amaryllidaceae)

ปริมาณแอลคาลอยด์ในพืชแต่ละชนิดจะสร้างและสะสมปริมาณแอลคาลอยด์ต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อายุของพืช อุณหภูมิ แสงสว่าง ฤดูกาล ความชื้นในอากาศ ปริมาณน้ำในดิน ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นดิน ปริมาณน้ำฝน เป็นต้น การสะสมจะมีอยู่เกือบทุกส่วนของพืช เช่น ใบ เส้นใบ ขน ดอก ผล เมล็ด ราก เปลือก หัวใต้ดิน ช่องว่างภายในเซลล์ (Vacuole)

หน้าที่ของแอลคาลอยด์ทำหน้าที่ช่วยป้องกันพืชจากสัตว์และแมลงต่างๆ เนื่องจากสารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีรสขมและเป็นพิษ เป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนในพืชเพื่อใช้สร้างโปรตีน ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เป็นต้น (blog.eduzones, ออนไลน์)

**ตัวอย่างของแอลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่**

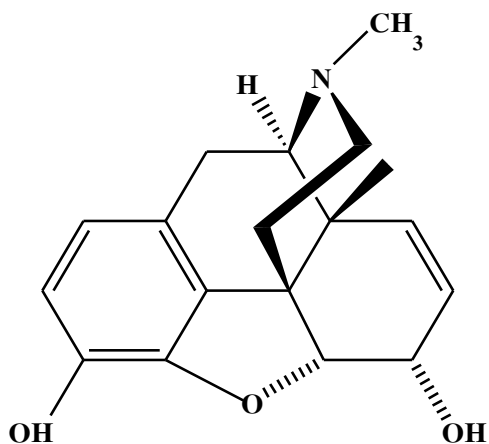
**ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย** เช่น ควินิน (Quinine) ดังภาพที่ 19 จากเปลือกของต้นซิงโคนา (*Cinchona succirubra* Pav.) ในวงศ์รูเบียซีอี (Rubiaceae) ใช้รักษามาลาเลียจากเชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*)



**ภาพที่ 11** โครงสร้างสารควินิน (Quinine)

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2550, น. 30)

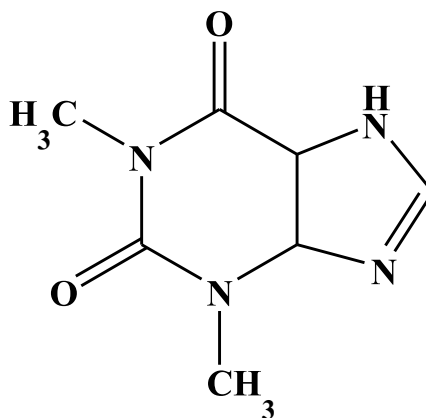
**ฤทธิ์ระงับอาการปวด** เช่น มอร์ฟีน (Morphine) ดังภาพที่ 20 จากยางฝิ่น (*Papaver somniferum* L.) ในวงศ์พัพพาเวอราซีอี (Papaveraceae) ใช้ระงับการปวดในการผ่าตัดต่างๆ และกับผู้ป่วยมะเร็งระยะสุดท้าย



ภาพที่ 12 โครงสร้างสารที่พบในมอร์ฟีน (Morphine)

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2550, น. 31)

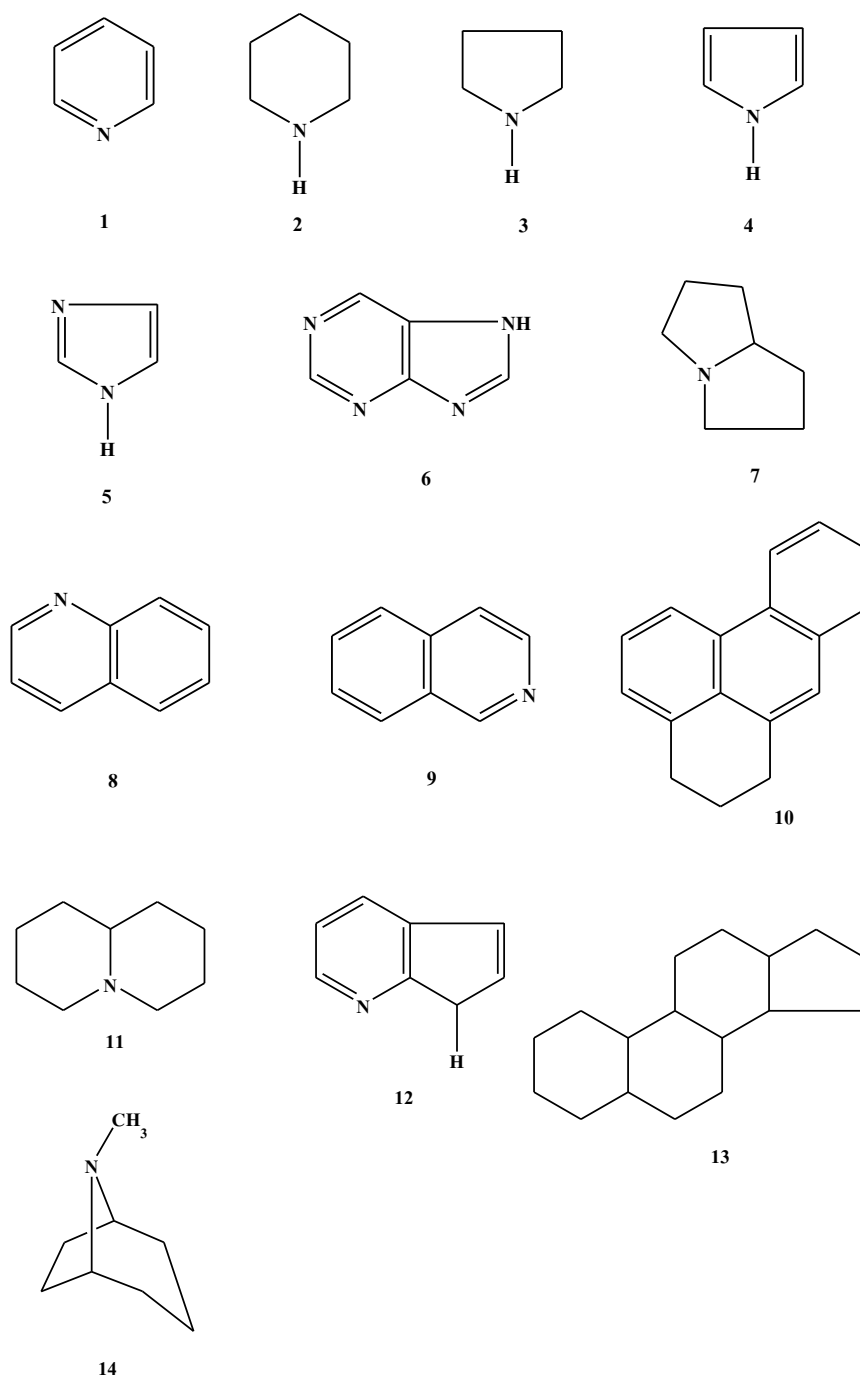
ฤทธิ์ขยายหลอดลม เช่น ทีโอฟิลลีน (Theophylline) ดังภาพที่ 21 จากยอดและใบของชา (*Camellia sinensis* O. Kunze) ในวงศ์ทีอาซีอี (Theaceae) เป็นต้น



ภาพที่ 13 โครงสร้างของทีโอฟิลลีน (Theophylline)

ที่มา : รัตนา อินทรานุปกรณ์ (2550, น. 33)

สารกลุ่มแอลคาลอยด์สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามสูตรโครงสร้างพื้นฐาน ดังภาพที่ 22 ดังนี้



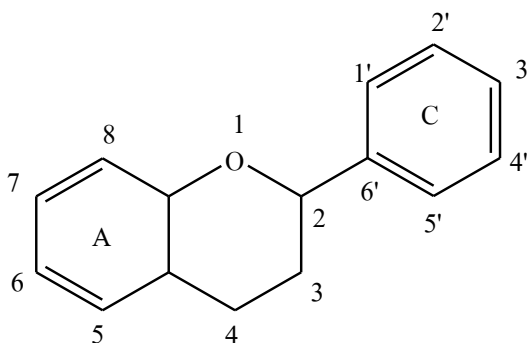
ภาพที่ 14 โครงสร้างพื้นฐานของแอลคาลอยด์ : ไพริดีน (1), พิเพอริดีน (2), เพอโรลิดีน (3), เพอโรล (4), อิมิดาโซล (5), พูรีน (6), เพอโรลิซิดีน (7), ควิโนลีน (8), ไอโซควิโนลีน (9), อะพอร์พีน (10), นอร์-ลูพิเนน (11), อินโดล (12), สเตรียรอยด์ (13), โทรเพน (14)

ที่มา : รัตนา อินทรานุกกรณ์ (2550, น. 35)

## 7. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์

วิภ สุทชนะ (2556, ออนไลน์) ได้กล่าวถึงสารกลุ่มฟลาโวนอยด์(flavonoids) ว่าเป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (phenylbenzopyrones) ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็กและมีโครงสร้างประกอบด้วยการจัดเรียงตัวของคาร์บอน 15 ตัว (C6 - C3 - C6) เป็นวงแหวน 3 วง ได้แก่ วงแหวนเบนซีน (benzene ring) 2 วง (A and B) เชื่อมต่ออยู่กับวงแหวนไพแรน (heterocyclic pyran ring) ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง (C)8 (ดังภาพที่ 15) โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐาน (ตารางที่ 8) ได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่

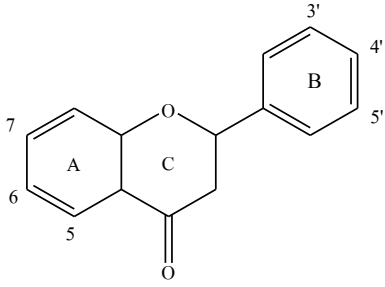
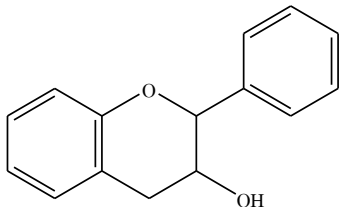
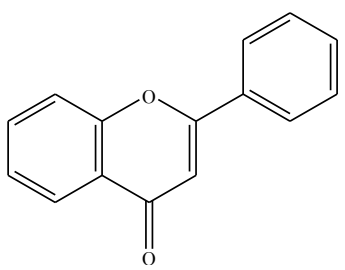
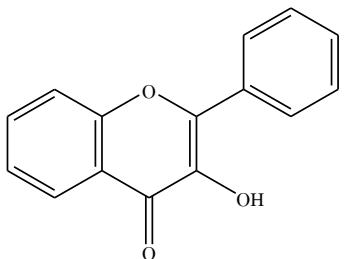
1. ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เควอร์ซีติน (quercetin) แคมป์เฟอร์อล (kaempferol) ไมริซิติน (myricetin)
2. ฟลาโวน (flavones) เช่น ลูติโอลิน (luteolin) อากิเจนิน (apigenin) ไครซิน (chrysin)
3. ฟลาวาโนน (flavanones) เช่น เฮสเพอริติน (hesperetin) นารินจินิน (naringenin) อิริไดคทิออล (eriodictyol)
4. ฟลาวานอล (flavanols) เช่น แคทีชิน (catechin) แกลโลแคทีชิน (gallocatechin) อีพิกะทีชิน (epicatechin) อีพิกัลโลแคทีชิน (epigallocatechin) อีพิกะทีชิน-3-แกลเลต (epicatechin-3-gallate) อีพิกัลโลแคทีชิน-3-แกลเลต (epigallocatechin-3-gallate)
5. ฟลาวาโนนอล (flavanonols) เช่น แทกซิโฟลีน (taxifolin)
6. ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เช่น เดดซีน (daidzein) จินิสเติน (genistein) ไกลซิเติน (glycitein) ฟอร์โมนอนเนติน (formononetin)
7. แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เช่น ไซยานิดิน (cyanidin), เดลฟินิดิน (delphinidin) มาลวิดิดิน (malvidin) พีลาร์โกนินิดิน (pelargonidin) พีโอนินิดิน (peonidin) พีทูนิดีน (petunidin)



ภาพที่ 15 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

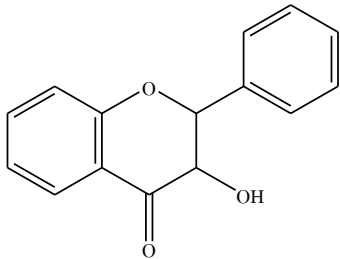
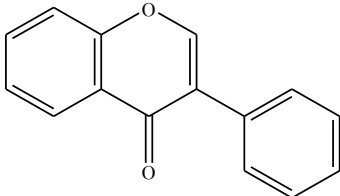
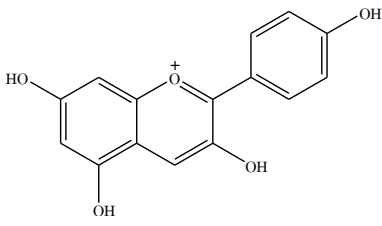
ที่มา : วิภ สุทชนะ (2556น.567-582)

ตารางที่ 8 การจำแนกชนิดของฟลาโวนอยด์โดยขึ้นอยู่กับตำแหน่งของหมู่แทนที่

สูตร โครงสร้าง	ตัวอย่าง ฟลาโวนอยด์	หมู่แทนที่					
		5	6	7	3'	4'	5'
 <p>ฟลาวาโนน</p>	อีริโอดิکتอล	OH	H	OH	OH	OH	H
	เอาเพอริดีน	OH	H	OH	OH	OCH	H
	นารินจินิน	OH	H	OH	H	OH	H
	แคทิซิน	H	H	H	H	H	H
 <p>ฟลาวานอล</p>	แกสโลแคทิซิน	H	H	H	OH	OH	OH
	อาพิจินิน	OH	H	OH	H	OH	H
 <p>ฟลาโวน</p>	ไครซิน	OH	H	OH	H	H	H
	ลูติโอลลิน	OH	H	OH	OH	OH	H
	แคมป์เฟอร์อล	OH	H	OH	H	OH	H
 <p>ฟลาโวนอล</p>	ไมริซิดิน	OH	H	OH	OH	OH	OH
	เออร์ซิดิน	OH	H	OH	OH	OH	H

ที่มา : วิภพ สุทชนะ (2556 น.567-582)

ตารางที่ 8 (ต่อ) การจำแนกชนิดของฟลาโวนอยด์โดยขึ้นอยู่กับตำแหน่งของหมู่แทนที่

สูตรโครงสร้าง	ตัวอย่าง ฟลาโวนอยด์	หมู่แทนที่					
		5	6	7	3'	4'	5'
	แทกซิฟลาวิน	OH	H	OH	OH	OH	H
ฟลาวาโนนอล							
	เดคซิน	H	H	OH	H	OH	H
	จินิสติน	OH	H	OH	H	OH	H
	ไกลซิซิน	OH	OCH	OH	H	OH	H
ไอโซฟลาโวน							
	ฟอร์โมนเนติน	H	H	OH	H	OCH	H
	เดลฟินิดิน	OH	H	OH	OH	OH	OH
	ไซยานิดิน	OH	H	OH	OH	OH	H
	มาลวิดิน	OH	H	OH	OCH	OH	OCH <sub>3</sub>
	ฟิโอนิดิน	OH	H	OH	OCH	OH	H
	ฟิลาโรโกนิน	OH	H	OH	H	OH	H
	ฟิทุนิดิน	OH	H	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>

ที่มา : วิกพ สุทชนะ (2556 น.567-582)



## 8. เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy)

เขียนหทัย แน่นหนา (2549, น. 175, 184-186) ได้กล่าวถึง เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีว่าเป็นเทคนิคที่ใช้เครื่องมือที่เรียกว่า สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ในการวิเคราะห์สารต่างๆ ซึ่งในการวิเคราะห์สารช่วยลดปัญหาต่างๆ เช่น ปริมาณสาร ถ้าสารมีน้อยก็สามารถวิเคราะห์ได้ เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ต้องมีแหล่งกำเนิดรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic radiation) เป็นองค์ประกอบ โดยแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าไปยังสาร เพื่อเกิดการดูดกลืนแสงหรือเปล่งแสงออกมาจากสาร ซึ่งสารแต่ละชนิดจะเปล่งรังสีออกมาขึ้นอยู่กับสูตร โครงสร้างและองค์ประกอบของสาร ในงานวิจัยเล่มนี้จะขอกล่าวถึงเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเพียง 1 ชนิด เท่านั้น คือ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี หรือ MNR (Nuclearmagnetic resonance spectroscopy หรือ MNR spectroscopy)

### นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR)

#### หลักการของ NMR

ในทางฟิสิกส์อนุภาคที่มีประจุ จะหมุนรอบตัวเองทำให้เกิดสนามแม่เหล็กขึ้น ดังนั้นอะตอมประกอบด้วยอิเล็กตรอนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่อยู่รอบๆ นิวเคลียส ส่วนภายในนิวเคลียสประกอบด้วยโปรตอนที่มีประจุบวกกับนิวตรอนที่เป็นกลาง นิวเคลียสที่มีประจุบวกจะเกิดการหมุนรอบตัวเองเกิดสนามแม่เหล็กขึ้นตามแนวแกนของนิวเคลียส ทำให้นิวเคลียสมีสมบัติคล้ายแท่งแม่เหล็กที่แกนอยู่ในระนาบเดียวกับแกนของนิวเคลียส

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์สำหรับวัด NMR แต่ละยี่ห้อแตกต่างกันออกไปในองค์ประกอบย่อย แต่องค์ประกอบของเครื่องโดยหลักจะมีเหมือนกันดังนี้

#### 1. แม่เหล็กที่ให้ความเข้มของสนามแม่เหล็กภายนอก $B_0$

ต้องเป็นแม่เหล็กที่ให้ความเข้มของสนามแม่เหล็กแรงและสม่ำเสมอ เพราะเครื่อง NMR จะแยกสัญญาณได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับความแรงและคุณภาพของแม่เหล็ก แม่เหล็กที่ใช้มีอยู่หลายแบบ คือ แม่เหล็กถาวร แม่เหล็กไฟฟ้า และแม่เหล็กที่ทำจากขดลวดตัวนำยิ่งยวด แม่เหล็กถาวรให้ความเข้มสนามแม่เหล็กน้อยและไวต่ออุณหภูมิ แม่เหล็กถาวรให้ความเข้มสนามแม่เหล็กมากและไม่ไวต่ออุณหภูมิ

#### 2. เครื่องกำเนิดไฟฟ้าสวิตช์ (Sweep generator)

เป็นขดลวดคู่ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนความเข้มของสนามแม่เหล็กภายนอก  $B_0$  ให้เปลี่ยนไปในช่วงแคบๆ

### 3. แล่งกำเนิดคลื่นความถี่วิทยุ (Radio frequency transmitter)

เป็นขดลวดที่อยู่ในแนวตั้งฉากกับเครื่อง Sweep generator ใช้ผลิตสนามแม่เหล็ก  $B_1$  ที่มีความถี่คงที่

### 4. เครื่องรับความถี่วิทยุ (Radio frequency receiver)

เป็นขดลวดที่ล้อมรอบสารตัวอย่างที่ทำหน้าที่รับสัญญาณการดูดกลืนพลังงานของแม่เหล็กไฟฟ้าช่วงคลื่นวิทยุจากสารตัวอย่าง

### 5. เครื่องบันทึกสัญญาณ (Recorder)

จะรับสัญญาณจากเครื่องรับความถี่วิทยุ ซึ่งมีค่าน้อยจึงต้องขยายสัญญาณก่อนบันทึกผล โดยบันทึกสัญญาณความถี่วิทยุให้อยู่ในแนวแกน y ส่วนแกน x เป็นความถี่ที่มาจากเครื่อง Sweep generator

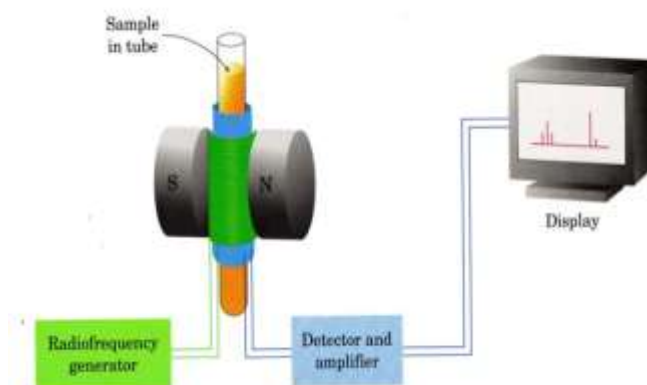
### 6. ที่ใส่สารตัวอย่าง

เป็นหลอดแก้วสำหรับใส่เครื่อง NMR โดยเฉพาะ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร หลอดต้องหมุนตลอดเวลาเพื่อให้สารตัวอย่างได้สัมผัสกับสนามแม่เหล็กอย่างทั่วถึง สารตัวอย่างที่นิยมใช้จะอยู่ในรูปของสารละลาย ดังนั้น ตัวทำละลายต้องไม่มีโปรตอน เช่น  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  และ ดิวเทอเรียม ( $^2\text{H}$ , D) ตัวทำละลายสามารถเกิดสัญญาณเรโซแนนซ์ได้เช่นเดียวกับโปรตอน แต่ปรากฏสัญญาณคนละตำแหน่ง สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ในตัวทำละลายเหล่านี้มี ดิวเทอเรียมเพียงร้อยละ 98-99 ที่เหลืออยู่ในรูปของโปรตอน ดังนั้นสัญญาณที่เกิดขึ้นอาจเป็นโปรตอนของตัวทำละลายก็ได้

NMR สเปกโทรมิเตอร์ส่วนใหญ่แบ่งออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

1. ให้ความถี่แม่เหล็กไฟฟ้าจากเครื่องกำเนิดความถี่วิทยุคงที่แล้วเปลี่ยนความเข้มของสนามแม่เหล็กภายนอก  $B_0$  โดยเครื่องกำเนิดไฟฟ้า Sweep จนนิวเคลียสเกิดเรโซแนนซ์
2. ให้ความเข้มของสนามแม่เหล็กภายนอก  $B_0$  คงที่แล้วเปลี่ยนความถี่แม่เหล็กไฟฟ้าที่มาจากเครื่องกำเนิดความถี่วิทยุจนนิวเคลียสเกิดเรโซแนนซ์

NMR สเปกโทรมิเตอร์ทั้ง 2 แบบให้เปกตรัมของโปรตอนคล้ายกัน ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ส่วนประกอบเครื่อง NMR สเปกโทรมิเตอร์

ที่มา : ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และ วรพรรณ พุนธุมนาวิน (2548, ออนไลน์)

## 9. โรคเบาหวานเบาหวาน (Diabetes Mellitus)

ธีรยุทธ นามสว่าง (2553, ออนไลน์) ได้กล่าวถึง โรคเบาหวาน มาจากคำว่า Diabetes Mellitus (ไดอะบีตีส เมลิตุส) ซึ่งเป็นคำมาจากภาษาละติน มีรากศัพท์มาจาก ภาษากรีกและคำว่า Diabetes หมายถึงน้ำพุ ส่วนคำว่า Mellitus แปลว่า น้ำผึ้ง เมื่อนำสองคำนี้มารวมกันจึงมีความหมายว่าน้ำพุแห่งน้ำผึ้ง หรือโรคเบาหวาน คือ โรคซึ่งผู้ป่วยที่ขาดการดูแลรักษา มักถ่ายปัสสาวะบ่อย และมีปริมาณปัสสาวะมาก

### ความหมายของโรคเบาหวาน

เทพ หิมะทองคำ และคณะ (2543, ออนไลน์) ได้ให้ความหมายของ โรคเบาหวาน หมายถึง ภาวะที่ร่างกายขาดอินซูลินหรือนำอินซูลินไปใช้ไม่ได้ มีผลทำให้เกิดภาวะผิดปกติของการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ทำให้น้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบต่างๆ ของร่างกายคือ เกิดภาวะแทรกซ้อนอย่างเฉียบพลัน เช่น ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำและภาวะกรดจากสารคีโตนคั่งในเลือดและเกิดภาวะแทรกซ้อนเรื้อรัง เช่น ภาวะหลอดเลือดตีบแข็ง ความดันโลหิตสูง จอตาเสื่อม ไตวาย เป็นแผลเรื้อรังและติดเชื้อง่าย เป็นต้น ฉะนั้นถ้าเราสามารถควบคุมโรคเบาหวานได้ด้วยการดูแลตนเองโดยการควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย การใช้อาหารควบคุมและการปฏิบัติตนเองอย่างเหมาะสม สามารถลดภาวะแทรกซ้อนได้

สมาคมโรคเบาหวานสหรัฐอเมริกา (American Diabetes Association (ADA), 2008.) ได้กล่าวว่า โรคเบาหวานเป็นกลุ่มโรคที่เกิดจากความผิดปกติของร่างกายมีภาวะระดับน้ำตาลในเลือด

สูง (hyperglycemia) กว่าปกติ ซึ่งเกิดจากการขาดฮอร์โมนอินซูลิน ทำให้ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลในเลือดไปใช้ได้ตามปกติ จากบทความในหนังสือไดอะเบตส์แคร์ (Diabetes care, 2010) กล่าวว่า น้ำตาลในเลือดที่สูงอยู่เป็นระยะเวลานานทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนของอวัยวะต่างๆ เช่น ตา ไต ระบบประสาท โรคหลอดเลือดหัวใจ

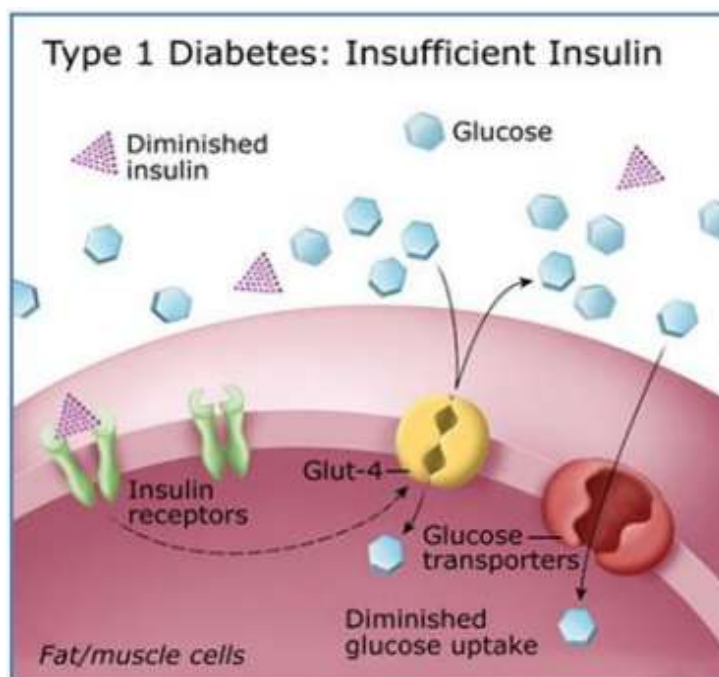
วิชัย เอกพลากร (2543,ออนไลน์) ได้กล่าวถึงข้อมูลการวิจัยสถานการณ์เกี่ยวกับปัญหาโรคเบาหวานและภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงของทุกภาคในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2543 พบว่า มีอัตราการเกิดโรคเบาหวานในประชากรที่มีอายุ 35 ปีขึ้นไป เท่ากับร้อยละ 9.6 หรือ คิดเป็นจำนวน 2.4 ล้านคน

### ประเภทของโรคเบาหวาน

อภิรักษ์ วงศ์รัตนชัย (2547, ออนไลน์) ได้กล่าวถึง ระบบการแบ่งชนิดประเภทของโรคเบาหวานของคณะกรรมการระดับชาติเบาหวานของแพทยสภาฯ (National Diabetes Data Group; NDDG) ได้รับการตีพิมพ์ขึ้นในปีพ.ศ. 2522 ซึ่งได้รับความเห็นชอบจากองค์การอนามัยโลก ในปี พ.ศ. 2523 และถือเป็นเกณฑ์ในการประชุมครั้งต่อมาขององค์การอนามัยโลก (WHO Study Group on Diabetes Mellitus) โดยแบ่งเบาหวานเป็น 2 ชนิดที่สำคัญคือ เบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (IDDM, Type I DM) และ ชนิดไม่ต้องพึ่งอินซูลิน (NIDDM, Type II DM) ซึ่งเป็นการแบ่งชนิดตามสาเหตุและกลุ่มความผิดปกติหลายๆ อย่างทางคลินิกที่มีอาการร่วมกัน (น้ำตาลในเลือดสูง) แต่เป็นการแบ่งชนิดที่มองข้ามหลายประเด็น ทำให้มีการแบ่งเบาหวานออกเป็น 5 ชนิด (เบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (IDDM), ไม่ต้องพึ่งอินซูลิน (NIDDM), เบาหวานขณะตั้งครรภ์ (Gestational DM), เบาหวานชนิดที่เกิดจากภาวะทุพโภชนา (Malnutrition-related DM), และชนิดอื่นๆ) โดยแบ่งตามอาการแสดงทางคลินิก และปัจจัยสาเหตุจากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม

### โรคเบาหวาน แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. บุญทิพย์ สิริขันธ์ (2539, ออนไลน์) ได้กล่าวถึง โรคเบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (Insulin dependent diabetes) หรือโรคเบาหวานในเด็ก โดยผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานชนิดนี้ จะเกิดจากการที่ร่างกายขาดอินซูลิน เนื่องจากตับอ่อนไม่สามารถสร้างอินซูลินได้หรืออาจเนื่องมาจากเบตาเซลล์ในตับอ่อนมีน้อยหรือไม่มีเลย พบในผู้ป่วยอายุไม่เกิน 30 ปี ทั้งชายและหญิง อาการของโรคมักเป็นรุนแรง ส่วนใหญ่มีรูปร่างผอม น้ำหนักตัวลดลงอย่างรวดเร็ว



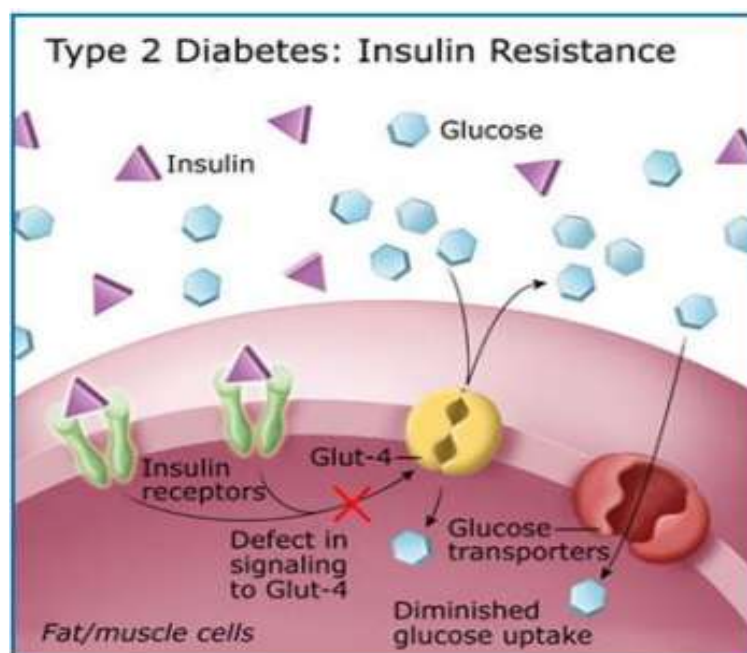
ภาพที่ 17 กลไกการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1  
ที่มา : กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม (ออนไลน์)

2. เทพ หิมะทองคำ และคณะ(2544, ออนไลน์) ได้กล่าวถึง โรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน (Non - insulin dependent diabetes) มักพบในคนอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไป ส่วนมากเพศหญิงเป็นมากกว่าเพศชาย ในคนที่อ้วนมาก นอกจากนี้กรรมพันธุ์ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอย่างมาก ผู้ที่มีประวัติสมาชิกในครอบครัว โดยเฉพาะญาติผู้เป็นเบาหวาน มีแนวโน้มที่จะเป็นเบาหวานชนิดนี้ได้มาก อาการที่เกิดขึ้นมีได้ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ แต่ตรวจพบโดยบังเอิญหรือมีอาการแบบค่อยเป็นค่อยไปจนถึงขั้นแสดงอาการรุนแรง ด้บอ่อนของผู้ป่วยเบาหวานประเภทนี้ ยังสามารถผลิตอินซูลินได้ตามปกติหรืออาจจะน้อยหรืออาจจะมากกว่าปกติได้ แต่อินซูลิน ที่มีอยู่ออกฤทธิ์ได้ไม่ดีจึงไม่ถึงกับขาดอินซูลินไปโดยสิ้นเชิงเหมือนคนที่เป็เบาหวาน ประเภทที่ 1 ผู้ป่วยจึงไม่เกิดภาวะกรดคั่งในเลือดจากสารคีโตน ซึ่งความแตกต่างของเบาหวาน ทั้ง 2 ประเภท แสดงตามตารางที่ 9 ดังนี้

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบความแตกต่างของโรคเบาหวานประเภทที่ 1 และ ประเภทที่ 2

	โรคเบาหวานประเภทที่ 1	โรคเบาหวานประเภทที่ 2
กลุ่มอายุ	มักเกิดกับผู้มีอายุน้อยกว่า 40 ปี	มักเกิดกับผู้มีอายุน้อยกว่า 40 ปี ขึ้นไป
น้ำหนักตัว	ผอม	อ้วน
การทำงานของตับอ่อน	ไม่สามารถผลิตอินซูลินได้	สามารถผลิตอินซูลินได้บ้าง ผลิตได้ปกติแต่อินซูลินไม่มี ประสิทธิภาพ
การแสดงออกของอาการ	เกิดอาการรุนแรง	ไม่มีอาการเลย มีอาการเล็กน้อย อาการรุนแรง จนซื้อหมกดสติ ได้
การรักษา	เพิ่มปริมาณอินซูลินให้ร่างกาย	อาจใช้การควบคุมอาหารได้

ที่มา : เทพ หิมะทองคำ และคณะ (2544, น. 38)



ภาพที่ 18 กลไกการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2

ที่มา : กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม (ออนไลน์)

### พยาธิสภาพของเบาหวาน

เบญจวรรณ เกิดแพร (2555, ออนไลน์) ได้กล่าวว่า การเป็นเบาหวานทำให้เกิดความผิดปกติ โดยมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่หลอดเลือดทั่วร่างกายเนื่องจากระดับน้ำตาลในเลือดสูงทำให้มีน้ำตาลไปเกาะที่เม็ดเลือดแดง ส่งผลให้มีการปลดปล่อยออกซิเจนจากเม็ดเลือดแดงสู่เนื้อเยื่อลดลง เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดแดงตามมาทั้งหลอดเลือดขนาดใหญ่และหลอดเลือดขนาดเล็ก โดยทำให้เยื่อหลอดเลือดชั้นในได้รับอันตรายต่อจากนั้นจะมีการซ่อมแซมเกิดขึ้น คือมีการรวมตัวของเกล็ดเลือดเพื่ออุดรอยที่ได้รับความเสียหายนั้น ทำให้หลอดเลือดเกิดการอุดตัน ไปงพองหรือสร้างหลอดเลือดที่ไม่แข็งแรงขึ้นมาใหม่

### อาการของโรคเบาหวาน

สกุล มหารัตนวงศ์ (2548, น. 14) กล่าวถึง ผู้ป่วยเบาหวานส่วนมากจะไม่ทราบว่าตนเองเป็นเบาหวาน เนื่องจากส่วนใหญ่ไม่มีอาการผิดปกติ บางครั้งจะตรวจพบเพียงระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น จึงจะทราบว่าเป็นโรคเบาหวาน หรือบางครั้งจะตรวจพบอาการของโรคเบาหวานได้เนื่องจากมีโรคแทรกซ้อนของเบาหวานเกิดขึ้นแล้ว ซึ่งอาการสำคัญที่บอกได้ว่าผู้ป่วยมีโอกาสเป็นโรคเบาหวานมีหลายอย่าง เช่น

1. ปัสสาวะบ่อยและมีปริมาณมาก เนื่องจากน้ำตาลในเลือดสูง ไตซึ่งทำหน้าที่กรองของเสียจากร่างกายต้องทำงานหนักโดยการเพิ่มการกรองที่ไตมากขึ้น ทำให้ปัสสาวะบ่อยและความถี่ของปัสสาวะจะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณของน้ำตาลในเลือด
2. คอแห้ง กระหายน้ำ เนื่องจากร่างกายเสียน้ำไปกับปัสสาวะ ร่างกายขาดน้ำ จึงต้องชดเชยด้วยการดื่มน้ำบ่อยๆ
3. หิวบ่อย กินจุ เนื่องจากร่างกายไม่สามารถใช้พลังงานจากกลูโคสได้และต้องปลดปล่อยกลูโคสออกมากับปัสสาวะ ทำให้มีความต้องการอาหารเพิ่มขึ้น ผู้ป่วยจึงรู้สึกหิวบ่อยและกินอาหารได้มากขึ้น
4. อ้วน โรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน พบได้ในคนอ้วนถึงร้อยละ 80 ส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยที่เริ่มเป็นเบาหวานในระยะแรก เมื่อเป็นเบาหวานเรื้อรัง ภาวะอ้วนจะหายไปและจะชubbผอมลง
5. น้ำหนักลด ชubbผอม จากการขาดอินซูลินเรื้อรัง ทำให้ร่างกายเปลี่ยนจากการใช้พลังงานจากกลูโคสมาย่อยโปรตีนและไขมันแทน ทำให้ร่างกายอ่อนเพลียและน้ำหนักลด
6. มีผื่นคัน ฝ้าผื่น คล้ายกับการเป็นเหน็บ หรือมีอาการแสบร้อนจากปลายประสาทอักเสบและเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงประสาทส่วนปลายแข็งตัวและตีบเล็กลง

7. คันอวัยวะเพศ โดยเฉพาะเพศหญิง จะพบอาการคันบริเวณอวัยวะเพศและช่องคลอดเป็นอาการสำคัญที่พบบ่อยในผู้ป่วยเพศหญิงที่เป็นวัยกลางคนและมีโรคอ้วนร่วมด้วย
8. อาการคันมีตุ่มหนองตามตัว อาจคันโดยไม่มีผื่น บางรายผิวหนังอาจเป็นตุ่มหนองหรือเป็นฝีขึ้นบ่อยเป็นๆ หายๆ
9. ตามัวคล้ายกับคนเป็นต้อกระจก แต่ถ้าตรวจโดยละเอียดจะพบว่าเป็นโรคแทรกซ้อนของเบาหวานที่เกิดขึ้นที่ตา

### การควบคุมโรคเบาหวาน

เทพ หิมะทองคำและคณะ(2544, ออนไลน์) กล่าวถึง เป้าหมายของการควบคุมโรคเบาหวาน คือ การรักษาระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยให้ใกล้เคียงกับระดับคนทั่วไป ซึ่งสามารถทำได้ 3 วิธี ดังนี้

1. การควบคุมอาหาร เป็นเรื่องที่สำคัญมากที่สุด เนื่องจากโรคเบาหวานเป็นโรคที่มีความผิดปกติของการเผาผลาญอาหารคาร์โบไฮเดรต ส่งผลให้ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ดังนั้นจึงเป็นเรื่องจำเป็นสำหรับผู้ป่วยเบาหวานทุกคน ทั้งเบาหวานชนิดพึ่งอินซูลินและชนิดไม่พึ่งอินซูลิน ที่จะต้องจัดการหรือควบคุมอาหารด้วยตนเองซึ่งจะช่วยให้การควบคุมระดับน้ำตาลและช่วยให้การทำหน้าที่ของร่างกายเกี่ยวกับการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตกลับคืนสู่ภาวะปกติหรือใกล้เคียงกับปกติมากที่สุด ผู้ป่วยต้องควบคุมอาหารโดยรับประทานอาหารตรงตามเวลา ควบคุมน้ำหนักให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ อาหารที่ผู้ป่วยต้องได้รับคือ คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 50-60 โปรตีนร้อยละ 20 และไขมันร้อยละ 30 ต้องจำกัดน้ำตาลหรืออาหารประเภท แป้ง ผลไม้หวาน หรือผลไม้แห้ง และควรแบ่งอาหารออกเป็นมื้อๆ ตามเวลาหรืออาจแบ่งอาหารออกเป็น อาหารหลักวันละ 3 ครั้ง คือ เช้า กลางวันและเย็น ร่วมกับอาหารเสริมมื้อเล็กๆ ก่อนนอน เพื่อป้องกันภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำในกรณีที่ได้รับยาลดน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้การรับประทานอาหารจำนวนครั้งละมากๆ จะทำให้น้ำตาลในเลือดเพิ่มมากกว่ารับประทานอาหารมื้อเล็กๆ ควรมีการแนะนำให้ผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีเส้นใย ซึ่งสามารถรับประทานได้ไม่จำกัดจำนวน ได้แก่ ผักใบเขียวทุกชนิด อาหารพวกนี้ จะทำให้การดูดซึมน้ำตาลช้าลงและลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารได้ ซึ่งมีการแนะนำให้ผู้ป่วยเบาหวานรับประทานอาหารเส้นใย จำนวน 20-40 กรัมต่อวัน การควบคุมเบาหวานด้วยอาหารนั้น มักจะใช้เกณฑ์ของการควบคุมให้ระดับน้ำตาลในเลือดไม่สูงกว่า 140 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

2. การออกกำลังกาย เป็นสิ่งที่ต้องปฏิบัติอย่างเหมาะสมและสม่ำเสมอ โดยสามารถทำให้ระดับน้ำตาลลดต่ำลงได้ เนื่องจากขณะออกกำลังกายจะต้องใช้พลังงานและแหล่งพลังงานที่สำคัญที่สุดของร่างกายคือ น้ำตาล หากออกกำลังกายเพียงพอร่างกายจะใช้น้ำตาลในเลือดเพื่อเปลี่ยนไปเป็นพลังงานมากพอที่จะลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ นอกจากนี้การออกกำลังกายทำให้น้ำหนักของ



ร่างกายไวต่ออินซูลินมากขึ้น กล่าวคือ อินซูลินปริมาณเท่าเดิมแต่ร่างกายจะสามารถใช้น้ำตาลได้มากขึ้นกว่าเดิม ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง การออกกำลังกายในผู้ป่วยเบาหวานควรเป็นการออกกำลังกายที่ทำให้กล้ามเนื้อหลายๆ ส่วนได้เคลื่อนไหวออกแรงพร้อมๆ กัน และไม่ต้องใช้แรงมาก เช่น การเดินเร็ว การวิ่งเหยาะๆ และการว่ายน้ำ เป็นต้น การออกกำลังกายแต่ละครั้งควรเป็นครั้งละประมาณ 20-45 นาที อย่างน้อยสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

3. เบญจวรรณ เกิดเพชร (2555, ออนไลน์) กล่าวถึง การใช้ยา ซึ่งอาจให้เป็นยารับประทานหรือยาฉีด แล้วแต่อาการของผู้ป่วย โดยรับประทาน จะออกฤทธิ์กระตุ้นให้มีการหลั่งอินซูลินมากขึ้น ทำให้มีการใช้กลูโคสมากขึ้นหรือมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างน้ำตาลจากขบวนการ Gluconeogenesis ลดการดูดซึมของน้ำตาล ในขณะที่ยาฉีดเป็นการให้เพื่อทดแทนอินซูลินที่ขาดไป เนื่องจากตับอ่อนผลิตอินซูลินไม่ได้ โรคเบาหวานที่กล่าวมาทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการรักษาจะแตกต่างกัน ในเบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน การใช้ยารับประทานจะไม่ได้ผลเนื่องจากตับอ่อนไม่สามารถสร้างอินซูลินได้จึงต้องใช้ยาฉีด ในขณะที่เบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินถ้าเป็นในระยะแรก การควบคุมด้วยอาหารอย่างเดียวอาจได้ผลในการรักษา

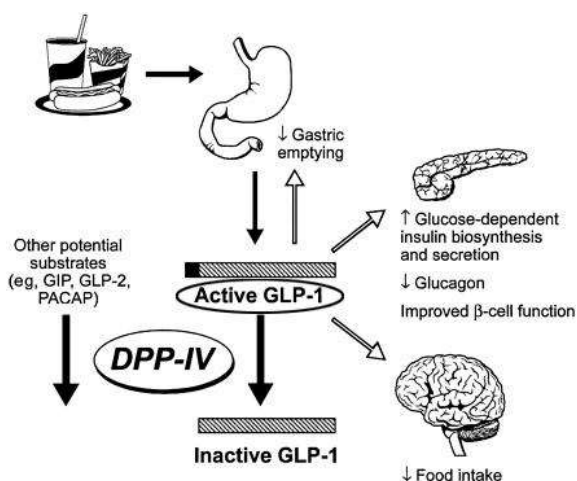
#### หน้าที่ของอินซูลิน

ซันจิ (Sinji, ออนไลน์) ได้กล่าวถึง อินซูลิน (Insulin) มีความหมายมาจากภาษาละตินคำว่า "insula" หรือ "island" ซึ่งแปลว่า "เกาะ" เพราะอินซูลินสร้างขึ้นมาจาก "เกาะแลงเกอร์ฮานส์" (ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ชนิดหนึ่งในตับอ่อน) คือฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ควบคุมการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตของร่างกาย

อินซูลิน หลั่งมาจากเบตาเซลล์ (β-cell) ของตับอ่อน เพื่อเป็นการตอบสนองต่อระดับของกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้น เมื่ออินซูลินจับกับตัวรับอินซูลิน (Insulin receptor) แล้วจะกระตุ้นตัวขนส่งกลูโคส ให้ไปแทรกตัวอยู่ที่เซลล์เมมเบรน ของเซลล์ตับ เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมัน เพื่อช่วยนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โรคเบาหวานเกิดจากการขาดอินซูลิน จะทำให้ระดับของอินซูลินลดลง หรือทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ต่ออินซูลินลดลง เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดจะสูง แต่เซลล์ไม่สามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ต้องใช้พลังงานจากแหล่งสะสม โดยกลัยโคเจนที่ตับจะถูกเปลี่ยนมาเป็นกลูโคส เพื่อนำไปใช้สร้างพลังงานให้แก่เซลล์ทั้งหมดของร่างกาย เมื่อ กลัยโคเจนจากเซลล์ตับหมดไป จะมีการใช้กรดไขมันที่สะสมในเซลล์ไขมันและกรดแอมิโนที่สะสมในเซลล์กล้ามเนื้อมาเป็นพลังงานสร้างกลูโคส แต่ อาจก่อให้เกิดอาการแทรกซ้อน คือ เกิดภาวะเบตาคีโต-แอซิโดซิส (β-ketoacidosis) ที่ทำให้เสียชีวิตได้

### การรักษาแบบใช้อินคริติน (Incretin)

อินคริติน เป็นฮอร์โมนที่ได้มาจากทางเดินอาหาร มีฤทธิ์ Insulinotropic คือสามารถกระตุ้น Insulin secretion ได้จึงมีชื่อว่า อินคริติน ได้แก่ Glucagon-like peptide (GLP-1) และ Glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) GLP-1 ออกฤทธิ์โดยจับกับตัวรับบนผิวเบตาเซลล์ของตับอ่อน มีผลควบคุมระดับน้ำตาล โดยเพิ่มการหลั่งของอินซูลิน ทำให้เบตาเซลล์กลับมาตอบสนองต่อกลูโคส ลดระดับของกลูคากอน ลดอัตราเร็วของการทำให้กระเพาะอาหารว่าง และลดความอยากอาหาร GLP-1 ถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วโดย Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) รายละเอียดดังภาพที่ 19



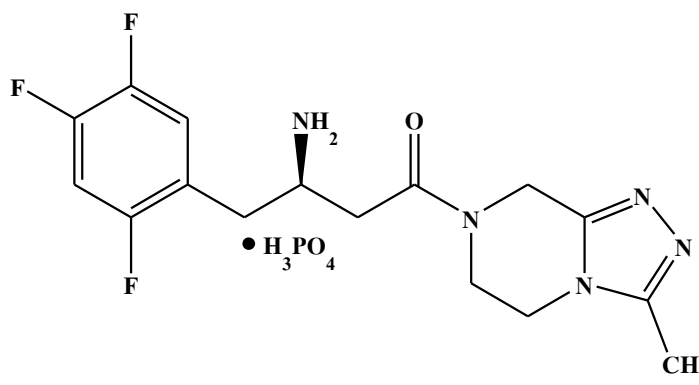
ภาพที่ 19 บทบาทและหน้าที่ GLP-1 และการควบคุมสมดุลของกลูโคส โดย DPP-4 ผ่านทางการทำให้ GLP-1 หมดฤทธิ์

ที่มา : ญานิน ชมะณะรงค์ (2551, ออนไลน์)

### การออกฤทธิ์ของยา sitagliptin phosphate

Sitagliptin phosphate ดังภาพที่ 15 ออกฤทธิ์จำเพาะในการยับยั้ง DPP-4 ที่ใช้สำหรับรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จะทำให้ระดับฮอร์โมนกลุ่มอินคริติน (Incretin) 2 ชนิด คือ Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) และ Glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) เพิ่มขึ้นในเลือด ซึ่งฮอร์โมนอินคริติน มีหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด โดยเพิ่มการหลั่งอินซูลินจากเบตาเซลล์ของตับอ่อน และลดการหลั่งกลูคากอนจากแอลฟาเซลล์ของตับอ่อน Sitagliptin phosphate ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ให้ใช้เป็นยาเดี่ยว (Monotherapy) หรือเป็นยาเสริมในการรักษาร่วมกับยาอื่นอีก 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ Metformin หรือ TZDs เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ยังไม่สามารถควบคุมระดับ

น้ำตาลในเลือดได้ดีพอด้วยการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย ขนาดที่ได้รับการรับรองคือ 100 มิลลิกรัม กินวันละครั้ง ซึ่งมีผลการศึกษาดังนี้



ภาพที่ 20 โครงสร้างของ Sitagliptin phosphate

ที่มา : คูซอบ คิม และคณะ (Dooseop Kim *et al*,2007)

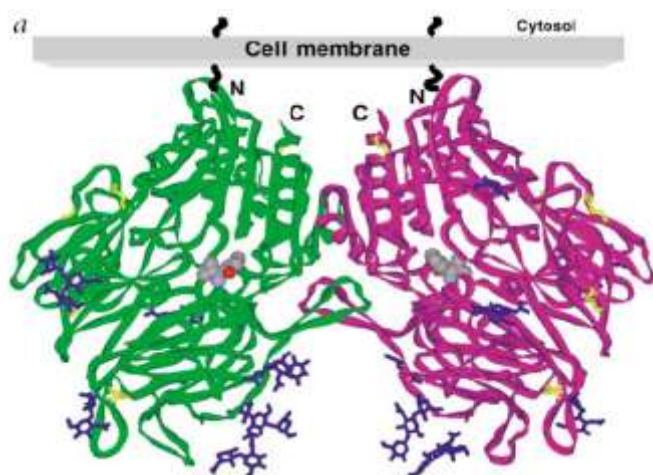
แอสชีเนอร์ ฟีนอมีนอน และคณะ (Aschner phenomenon *et al*, 2006) พบว่าประสิทธิภาพและความปลอดภัยของการใช้ยา Sitagliptin วันละครั้งเป็นยาเดี่ยว พบว่าการใช้ Sitagliptin เดี่ยวๆ ขนาด 100 มิลลิกรัม และ 200 มิลลิกรัม วันละครั้ง เป็นเวลา 24 สัปดาห์ สามารถลด HbA1c, Fasting plasma glucose, Postprandial glucose และน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยาหลอก อีกทั้งยังเพิ่มการทำงานของเบตาเซลล์ แต่การให้ยาในขนาดที่ต่างกัน พบว่าให้ผลการรักษาในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่แตกต่างกันส่วนอัตราการเกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ คล้ายคลึงกับกลุ่มที่ใช้ยาหลอก ผู้ป่วยจึงสามารถทนต่อยาได้ดี

ชาร์บอนเนล และคณะ (Charbonnel *et al*, 2006) เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีพอด้วยการใช้ Metformin (ขนาดมากกว่า 1500 มิลลิกรัมต่อวัน)

โรเซนสโตค (Rosenstock *et al*, 2006) พบว่าเมื่อเสริมยา Sitagliptin (ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อวัน) ร่วมกับยาทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมา แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างที่สำคัญของระดับ HbA1c ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่มที่ได้รับยา Sitagliptin ร่วมกับยา Metformin และ Pioglitazone ซึ่งผู้ป่วยมี Mean baseline HbA1c อยู่ที่ร้อยละ 8 และร้อยละ 8.1 พบว่ามีการลดลงของระดับ HbA1c ร้อยละ 0.65 และร้อยละ 0.78 ในกลุ่มที่รักษาเสริมกับ Metformin และ Pioglitazone ตามลำดับ

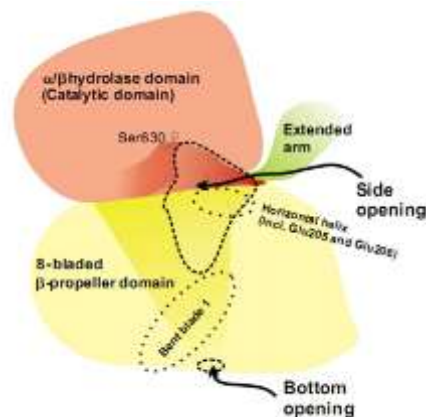
## 10. เอนไซม์ไดเพปติดีลเพปติเดสส์ (Dipeptidyl peptidase 4)

ฮันนี่บี ราสมุเซน (Hanne B. Rasmussen *et al*, 2003) กล่าวถึงการค้นพบเอนไซม์ DPP-4 ถูกในปี พ.ศ. 2503 มีการศึกษาถึงโครงสร้างผลึก (Crystal structure) ของเอนไซม์ DPP-4 มาตั้งแต่ต้นปี พ.ศ. 2546 พบว่าอยู่ในรูปของ 2 โมเลกุลคู่กัน (Dimeric) หรือ 4 โมเลกุล (Tetrameric) ซึ่งจากภาพที่ 21 และภาพที่ 22 จะเห็นว่าที่ปลายด้านแอมีน (Amine) ตรงตำแหน่ง N terminal จะอยู่ด้านเดียวกันและติดกับเซลล์เมมเบรน (Cell membrane) โดยด้านที่อยู่ติดกับ เซลล์เมมเบรน จะมีประจุบวกซึ่งจะทำให้จับกันอย่างแน่นหนากับประจุลบ จากฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ของเซลล์เมมเบรน เอนไซม์จะประกอบไปด้วยโดเมนที่มีลักษณะเป็นเบตาหรือพเพลเลอร์ (Beta-propeller) จำนวน 8 อันและโดเมนของ Alpha, Beta-hydrolase ซึ่งระหว่าง 2 โดเมนนี้ จะพบช่องว่างขนาด 30-45 อังสตรอมอยู่ โดยมีโมเลกุลของ Val-yr อยู่ด้านในติดกับกรดแอมิโนสำคัญ 3 ของเอนไซม์กลุ่ม Serine-protease ซึ่งใช้จับกับซับสเตรท ได้แก่ Ser630, Asp708, และ His740 โดยสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์ จะผ่านเข้าไปและออกทางรูเปิดทั้งสองด้าน ด้านข้างและด้านล่างของเอนไซม์



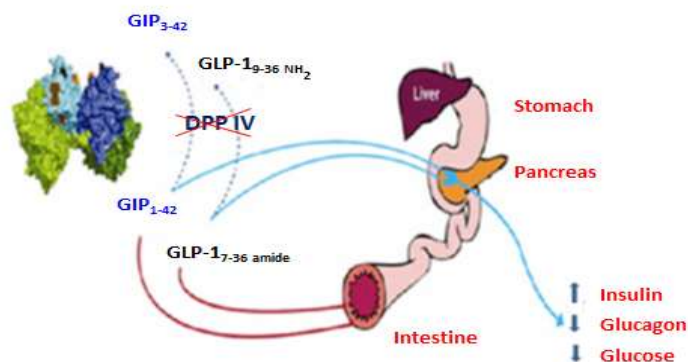
ภาพที่ 21 ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ DPP-4 ซึ่งติดกับ Cell membrane

ที่มา : ฮันนี่บี ราสมุเซน (Hanne B. Rasmussen *et al*, 2003)



ภาพที่ 22 โครงสร้างของเอนไซม์ DPP-4 และ Active site ที่ช่องว่างภายใน  
ที่มา : ฮันนีบี ราสมุสเซิน (Hanne B. Rasmussen *et al*, 2003)

DPP-4 เป็นเอนไซม์ที่มีขนาด 110 KDA โดยจะถูกหลั่ง ออกมาจากร่างกายซึ่งถูกแยก (Differentiate) มาจากเซลล์เยื่อบุผิว หรือเซลล์อีพิโทเลียม (Epithelial cells) เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด หรือเซลล์ เอนโดทีเลียม (Endothelial cell) และเซลล์เม็ดเลือดขาว หรือเซลล์ลิมโฟไซท์ (lymphocyte cell) ในรูปของมอนอเมอร์ (Monomer) ซึ่งสามารถทำงานได้ก็ต่อเมื่อมีการเกิดการ ทำงานร่วมกันเองระหว่างเอนไซม์ 2 โมเลกุล (Dimerization) ตัวเอนไซม์เองนั้นทำหน้าที่ย่อยตัด กรดแอมิโนออกเป็น 2 หน่วย ซึ่งจะทำให้ Glucagon liked peptide-1 (GLP-1) และ Glucose insulinotropic polypeptide (GIP) ทำหน้าที่รักษาสมดุลของระดับน้ำตาลในเลือดโดยการกระตุ้น การหลั่งฮอร์โมนอินซูลินเพื่อทำให้ GLP-1 และ GIP อยู่ในสภาพที่ไม่สามารถออกฤทธิ์หรือทำให้ GLP-1 และ GIP มีค่าครึ่งชีวิตที่ค่อนข้างสั้น ดังภาพที่ 23 ดังนั้นการยับยั้งที่เอนไซม์ DPP-4 ซึ่งทำให้ฮอร์โมนดังกล่าวออกฤทธิ์ได้ดีและนานขึ้น



ภาพที่ 23 กลไกการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ไดเพปทีดิลเพปทีเคสส์ในการลดระดับน้ำตาล  
ที่มา : พาร์เมลา คัสเซอร์ และมาร์ค โกรเรลล์ (Pamela Kushner and Mark Gorrell , 2010)

## 11. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกฤษณานั้นได้มีผู้สนใจทำการวิจัยไว้หลายท่าน อาทิเช่น

เทนจิโคนิชิและคณะ (Tenji Konishi *et al.*, 2002) ได้พบว่าสารประกอบ Chromone ชนิดใหม่ทั้งหมด 6 ชนิดจากสารสกัดอีเทอร์ของกฤษณา ซึ่งได้แก่ 6-methoxy-2-[2-(3-methoxy-4-hydroxy phenyl) ethyl] chromone, 6,8-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)chromone, 6-hydroxy-2-[2-(4-hydroxy phenyl) ethyl] chromone, 6-hydroxy-2-[2-(2-hydroxyphenyl)ethyl] chromone, 7-hydroxy-2-(2-phenyl ethyl) chromone และ 6-hydroxy-7-methoxy-2-(2-phenylethyl) chromone โดยทำการแยกสารประกอบทั้ง 6 ชนิดด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ซึ่งใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น เฮกเซน : เอทิลเอซีเทตกับ เฮกเซน : แอซีโตนและได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างสารทั้ง 6 ชนิดโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปีเช่น UV, IR และ NMR

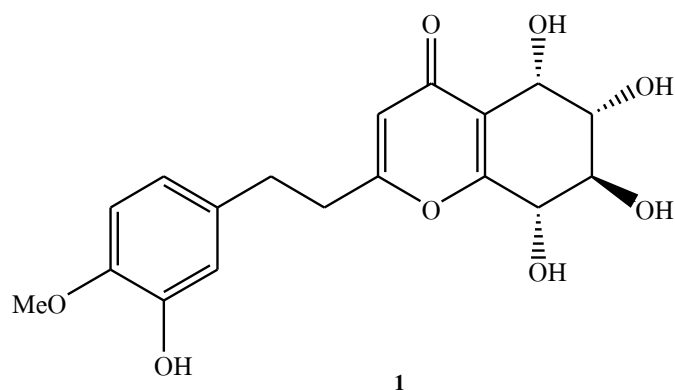
ศูรียากรและคณะ (Toru Yagura *et al.*, 2003) ได้ค้นพบสารประกอบซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารกลุ่ม Chromone ตัวใหม่ 4 ชนิดดังนี้คือ 5-hydroxy-6-methoxy-2-(2-phenylethyl)chromone (1), 6-hydroxy-2-(2-hydroxy-2-phenylethyl)chromone(2), 8-chloro-2-(2-phenylethyl)-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone(3), 6,7-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydro chromone (4) ได้จากไม้กฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria sinensis* โดยทำการสกัดไม้กฤษณาด้วยเมทานอลและนำสารสกัดที่ได้มาทำการสกัดซ้ำด้วยเฮกเซน เอทิลเอซีเทต และบิวทานอล ตามลำดับจากนั้นจึงนำสารสกัดเฮกเซนมาทำการแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ เฮกเซน : เอทิลเอซีเทต ในอัตราส่วน 9 : 1 จนถึง 1 : 1 ให้สารสกัดทั้งหมด 15 ส่วน (Fraction) โดยที่สารประกอบ 5-hydroxy-6-methoxy-2-(2-phenylethyl) chromone แยกได้จากส่วนที่ 9 โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น คลอโรฟอร์ม : เอทิล เอซีเทต ในอัตราส่วน 19 : 1 ส่วนสารสกัดเอทิลเอซีเทตนำมาทำการแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 9 : 1 ให้สารสกัดทั้งหมด 7 ส่วนแล้วจึงนำส่วนที่ 4 มาทำการแยกซ้ำด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งให้สารสกัดทั้งหมด 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 4.1-4.3 ซึ่งสารประกอบ 6-hydroxy-2-(2-hydroxy-2-phenylethyl) chromone แยกจากได้ส่วนที่ 4.2 โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่และอัตราส่วนดังนี้ เฮกเซน : แอซีโตน ในอัตราส่วน 1 : 1 และคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 14 : 1 จากนั้นทำการแยกด้วยคอลัมน์ ODS โดยใช้เมทานอลร้อยละ 60 ส่วนที่ 4.3 เมื่อนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีบน ODS คอลัมน์ ซึ่งใช้ วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นเมทานอลร้อยละ 40-100 ให้สารสกัดทั้งหมด 13 ส่วน คือ ส่วนที่ 4.3.1-4.3.13 จากนั้นจึงนำส่วนที่ 4.3.6 มาทำการแยกต่อด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ด้วย เฮกเซน : แอซีโตน ในอัตราส่วน 1 : 2 แล้วจึงนำส่วนที่ทำการแยกได้มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือคลอโรฟอร์ม : แอซีโตน ในอัตราส่วน 8 : 1 และได้

เอทิล อีเทอร์ : เมทานอล (9:1) ซึ่งจะให้สารประกอบ 8-chloro-2-(2-phenylethyl)-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone และสารประกอบ 6,7-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydrochromone ตามลำดับ จากนั้นจึงได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างสารทั้ง 4 ชนิดที่ได้และที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี

เจน หลิว และคณะ (Jun Liu *et al.*, 2008) ได้พบว่าสารประกอบชนิดใหม่ 8-chloro-5, 6, 7-trihydroxy-2-(3-hydroxy -4-methoxyphenethyl)-5, 6, 7, 8-tetrahydro-4H-chromen-4-one จากสารสกัดเอทานอลของกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยวิธี IR, NMR และ HRESI-MS การทดสอบการออกฤทธิ์แสดงให้เห็นผลในการต่อต้านเซลล์มะเร็งในกระเพาะอาหารของมนุษย์ (SGC-7901) ในหลอดทดลองและให้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แมนซิติ แดช (Manasi Dash *et al.*, 2008) ได้ทำการตรวจสอบหาสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical) ของสารสกัดน้ำและสารสกัดเมทานอลซึ่งได้จากการสกัดใบและเปลือกไม้ของกฤษณาที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดนอกจากนี้ยังทำการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ตัวอย่างเช่น *Shigella flexneri*, *Bacillus brevis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* จากผลการทดสอบพบสารประกอบ Alkaloids, Anthroquinones, Triterpenoids, Tannins, Fixed oils and fats และ Glycosides ในสารสกัดเมทานอล ส่วนสารสกัดน้ำพบสารประกอบ Saponins, Fixed oils and fats, Alkaloids และ Triterpenoids สารประกอบแอลคาลอยด์พบในปริมาณที่สูงในสารสกัดน้ำจากเปลือกไม้กฤษณาปริมาณร้อยละ 0.006 ส่วนสาร Saponin พบในปริมาณสูงที่ร้อยละ 0.169 จากใบที่ทำให้เป็นผงแล้ว สำหรับผงที่ได้จากเปลือกไม้และใบกฤษณาพบสารไกลโคไซด์ ร้อยละ 0.067 และ 0.036 ตามลำดับ และผงที่ได้จากใบกฤษณาพบสารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดแอมิโน ในปริมาณสูงโดยมีปริมาณ 19.42, 24.37 และ 12.1 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับจากผลการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคพบว่าสารสกัดเมทานอลจากเปลือกไม้กฤษณาให้ผลการยับยั้งเชื้อ *B. Subtilis* มากที่สุด โดยวัดพื้นที่โซนการยับยั้งได้ 19 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดชนิดอื่นๆ ทั้งหมดแสดงการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียปานกลางให้พื้นที่โซนการยับยั้งที่ 14-18 มิลลิเมตรซึ่งจากการศึกษาวิจัยโดยทำการตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้นนี้ทำให้ทราบถึงประโยชน์ของต้นกฤษณาซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาวิจัยเกี่ยวกับทางด้านยาต่อไปในอนาคต

หัว ฟู่ ใต้ และคณะ (Hao-Fu Dai *et al.*, 2009) ได้ค้นพบสารใหม่ชื่อ 2-(2-phenylethyl) chromone, 5, 6, 7, 8-tetrahydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenethyl)-5, 6, 7, 8-tetrahydro-4H-chromen-4-one (**1**) ที่แยกได้จากกฤษณา *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg]. ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยเครื่องมือทางสเปกโตรเมตรี ได้แก่ MS และ NMR และทำการเปรียบเทียบข้อมูลได้โครงสร้างของสารดังภาพที่ 24

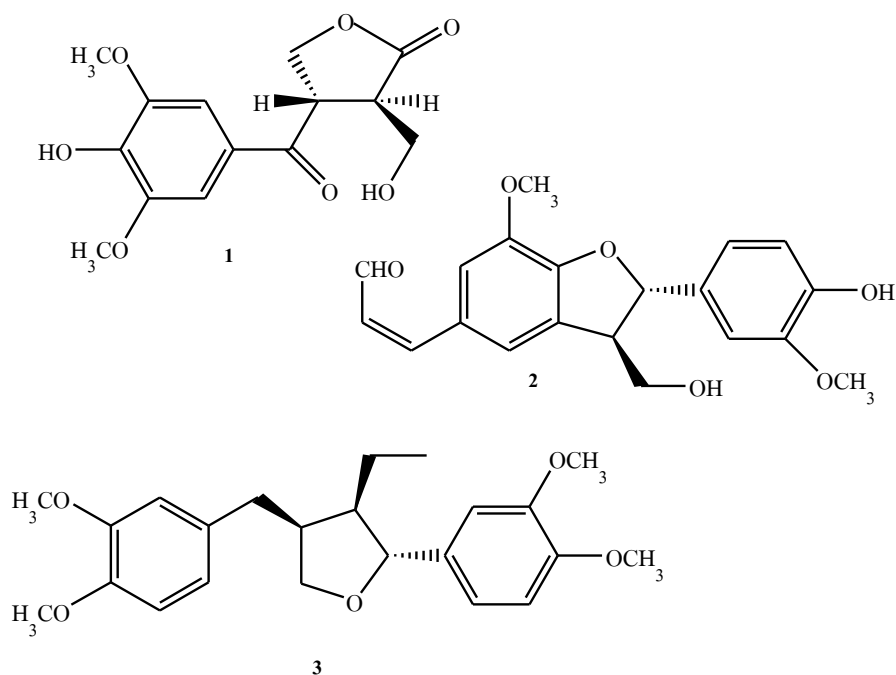


ภาพที่ 24 โครงสร้างของสาร 2-(2-phenylethyl) chromone, 5,6,7, 8-tetrahydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-chromen-4-one (**1**)

ที่มา : หัว ฟู่ ใต้ และคณะ (Hao-Fu Dai *et al.*, 2009)

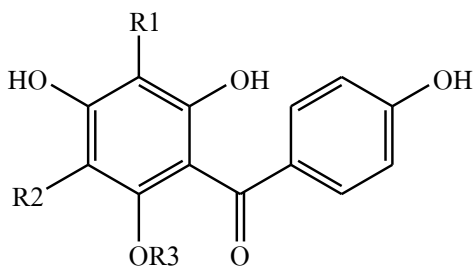
ซ่ง ฮวง ว่าง และคณะ (Qing Huang Wang *et al.*, 2010). ได้ทำการสกัดก้านสดของกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria sinensis* ด้วยสารละลายเอทานอล และนำมาทำการแยกสกัดทำให้พบสารใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของ Benzenoid คือ named aquilarin A (**1**) และยังพบสารที่ทราบโครงสร้างอีก คือ balanophonin (**2**) และ (+)-lariciresinol (**3**) แสดงดังภาพที่ 25 ซึ่งโครงสร้างของสารอธิบายโดยการศึกษาจากข้อมูลทางกายภาพและสเปกตรัมสาร (**2**) และ (**3**) และสารประกอบ (**2**) และ (**3**) ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ SGC-7901 และ SMMC-7721 ได้





ภาพที่ 25 โครงสร้างของสาร named aquilarin A (1), balanophonin (2) และ (+)-lariciresinol (3) ที่มา : ซองส์ หวง วัง และคณะ (Qing-Huang Wang *et al.*, 2010).

จื้อ เฟย และคณะ (Jie Feng *et al.*, 2011) ได้ทำการศึกษาการแยกและวิเคราะห์ทางวิธี Bio-assay guided ของการยับยั้งสาร  $\alpha$ -glycosidase จากการแยกและวิเคราะห์ทำให้พบสารประกอบจำนวน 8 ตัวที่สามารถยับยั้งการทำงานของ  $\alpha$ -glycosidase โดยสาร 4 ตัว ที่สกัดแยกได้จากร้อยละ 70 ของเอทานอล จากใบกฤษณา (*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg) โดยวิธีการแยกส่วน (Fractionation) และการทำให้บริสุทธิ์ (Purification) โดยทำการสกัดเริ่มจากสารละลาย ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิล แอซิเตต เอน-บิวทานอล และส่วนสกัดน้ำ ตามลำดับ นอกจากนี้ในการแยกสารใหม่ยังมีฤทธิ์ยับยั้งอยู่ในระดับปานกลาง aquilarisinin (1), aquilarisin (2), hypolaetin 5-O-b-D-glucuronopyranoside (3) และ aquilarixanthone (4) ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากสารละลาย เอน-บิวทานอล และสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ได้แก่ mangiferin (5), iriflophenone 2-O-a-L-rhamnopyranoside (6), iriflophenone 3-C-b-D-glucoside (7) และ iriflophenone 3,5-C-b-D-digluco-pyranoside (8) จากส่วนสกัดของเอทิลแอซิเตตซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด จากนั้นจึงได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างสารโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ IR, UV, ESIMS, HRESIMS,  $^1\text{D}$  และ  $^2\text{D}$  NMR แสดงโครงสร้างดังภาพ 26



1: R1=R2=H, R3= rha(4-1)glc

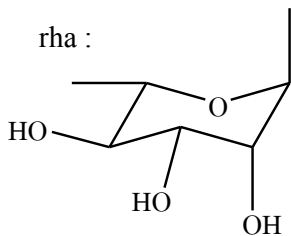
6: R1=R2=H, R3= rha

6a : R1=R2=R3= H

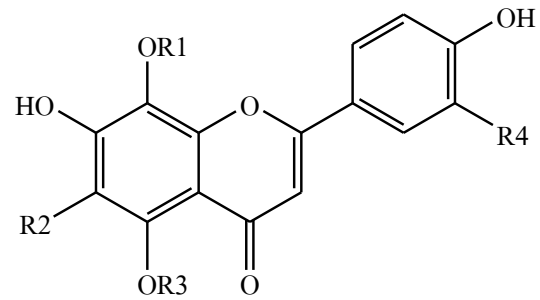
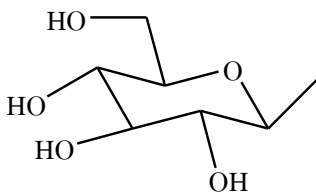
7: R1=R3= H, R2= glc

8: R1=R2= glc, R3= H

rha :



glc :

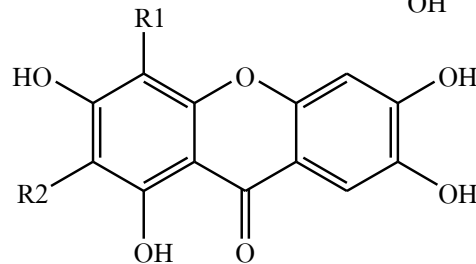
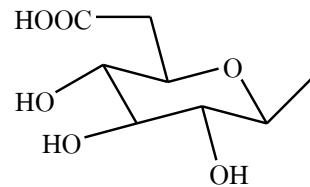


2: R1= glcA, R2=OH, R3= Me, R4=H

2a: R1=glcA, R2=R3=R4=4

3 : R1=R2=H, R3=glcA, R4=H

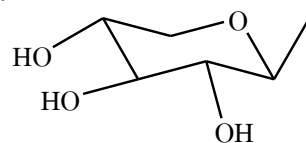
glc A :



4: R1= OH, R2= xyl

5: R1=H, R2= glc

xyl :



**ภาพที่ 26** โครงสร้างของสาร aquilarisin (1), aquilarisin (2), hypolaetin 5-O-b-D-glucuronopyranoside (3) aquilarixanthone (4), mangiferin (5), iriflophenone 2-O-a-L-rhamnopyranoside (6), iriflophenone 3-C-b-D-glucoside (7) และ iriflophenone 3,5-C-b-D-diglucoopyranoside (8)

ที่มา : จู๋ เฟย และคณะ (Jie Feng *et al.*, 2011)

กัญญา แซ่ลี้ และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารในผักแขยง (*Limnophila aromatica* Merr) โดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ สารละลายเฮกเซน เอทิล ออกซิเทต และเมทานอล ตามลำดับ จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบในส่วนของเมทานอลมาทำการแยกหาสารโดยวิธีคอลัมน์

โครมาโทกราฟี และทำการพิสูจน์โครงสร้างสารที่แยกได้จากผักแขยงโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่า ได้สาร Sigmasterol glycoside

สุริสา ศรีสุวรรณ และคณะ (2557) ได้ศึกษาการสกัดผลองุ่นป่าด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือเอทานอล เมธานอลและน้ำ จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator ตรวจสอบสารพฤกษเคมีโดยวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ colorimetric aluminum chloride ตามลำดับ ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในผลองุ่นป่าที่สกัดด้วยเมธานอลมีค่าสูงกว่า ที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ( $IC_{50} = 13.8 \mu\text{g/mL}$ ), ABTS ( $IC_{50} = 6.3 \mu\text{g/mL}$ ), FRAP ( $3.5 \text{ mM FeSO}_4/\text{g}$ ) และ CUPRAC ( $1065 \mu\text{g TE/g}$ ) สรุปได้ว่า สารสกัดผลองุ่นป่าด้วยเมธานอลมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงกว่าที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ โดยพบว่าปริมาณฟีนอลิกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $r$ ) เท่ากับ 0.998 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลองุ่นป่าอาจจะเป็นผลไม้ที่ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

ปิยบุษ เจริญผล และคณะ (2558) ได้ศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของการสกัด เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบดาวเรืองสดซึ่งยังไม่เคยมีรายงาน โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 ระบบ พบว่า สารสกัดของระบบร้อยละ 10 ของ EtOH/EtOAc ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุดคือร้อยละ 54 ซึ่งสูงกว่าระบบอื่นเป็น 13 เท่า และการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric assay, วิธี Aluminium chloride colorimetric assay และวิธี DPPH assay ตามลำดับผลการทดลองพบว่า ระบบร้อยละ 60 ของ H<sub>2</sub>O/EtOH มีปริมาณฟีนอลิก (56.1 mgGAE/g crude extract, ร้อยละ 10) ระบบร้อยละ 50 ของ H<sub>2</sub>O/EtOH ฟลาโวนอยด์ (8.52 mgQGE/g crude extract, ร้อยละ 17) มากที่สุด และร้อยละ 40 ของ H<sub>2</sub>O/EtOH แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ( $IC_{50} = 12.44 \pm 0.01 \text{ ppm}$ ) ดังนั้นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด มี 2 ระบบ คือร้อยละ 10 EtOH:EtOAc (ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด) และระบบร้อยละ 40-60 ของ H<sub>2</sub>O/EtOH (แสดงค่าปริมาณฟีนอลิกฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด) (Gallic acid คือ 5.80 ppm)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้ใช้กลุ่มตัวอย่าง คือ

ใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* และเอนไซม์ไคเพปติดีลเพปทีเอสสี่ (Dipeptidylpeptidas 4)

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารละลาย Tris buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลลาร์

- ชั่ง Tris (MW. 121.14) น้ำหนัก 0.6057 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ปรับ pH 7.5 ด้วยกรด HCl

การเตรียมสารละลายร้อยละ 10 DMSO

- ผสมสารละลาย DMSO จำนวน 10 มิลลิลิตรด้วยปิเปตต์ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Tris buffer จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมเอนไซม์ DPP-IV

- ปิเปตต์เอนไซม์ DPP-IV มา 0.1 ไมโครลิตรจากหลอดเก็บเอนไซม์ ใส่ลงใน Eppendorf แล้วเติมสารละลาย Tris-HCl buffer จำนวน 299 ไมโครลิตรเพื่อปรับปริมาตร 300 ไมโครลิตรเก็บไว้ในกระติกน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพ

การเตรียมซัพสเตรท

- ชั่งซัพสเตรท H-Gly-Pro-AMC (MW. 410.3) มา 0.00021 กรัม ละลายในสารละลาย DMSO ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

- ปิเปตต์สารละลายมา 1 ไมโครลิตร ใส่ใน Eppendorf ปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer ครบปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

- ชั่งสารสกัดมา 1 มิลลิกรัม เติมสารละลาย DMSO 100 ไมโครลิตร  
- ผสมสารละลายมา 5 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DMSO 5 ไมโครลิตร เติม Tris-buffer 90 ไมโครลิตร

- คูกสารละลายที่เตรียมไว้ข้างต้น มาเติมลงในหลุม 96 well plate โดยเติมในแถวที่ 1 (แล้วเปลี่ยนสารแต่ละส่วนสกัดเติมไปจนถึงแถวที่ 10) ตั้งแต่ A-H โดยในแต่ละหลุมจะมีสารสกัดอยู่ 10  $\mu$ l แล้วเติม Tris-buffer จำนวน 25  $\mu$ l (เฉพาะแถว A-D ตั้งแต่แถวที่ 1-10) enzyme DPP 4 จำนวน 15  $\mu$ l (เฉพาะแถว A-D ตั้งแต่แถวที่ 1-10)

\*\*\* แถว E-H ให้เติม สารละลาย Tris-buffer 40  $\mu$ l ตั้งแต่แถวที่ 1-10

- แถวที่ 11 ให้เติมสารละลาย Januvia ความเข้มข้น 200 mM ลงในหลุม 96 well plate โดยในหลุมจะมีสารอยู่ 10  $\mu$ l แล้วเติม enzyme DPP 4 จำนวน 15  $\mu$ l แล้วเติม Tris-buffer จำนวน 25  $\mu$ l (เฉพาะแถว A-D) enzyme DPP 4 จำนวน 15  $\mu$ l (เฉพาะแถว A-D)

\*\*\* แถว E-H ให้เติม สารละลาย Tris-buffer 40  $\mu$ l

- แถวที่ 12 ให้เติมสารละลาย 10% DMSO ลงในหลุม 96 well plate โดยในหลุมจะมีสารอยู่ 10  $\mu$ l แล้วเติม enzyme DPP 4 จำนวน 15  $\mu$ l แล้วเติม Tris-buffer จำนวน 25  $\mu$ l (เฉพาะแถว A-D) enzyme DPP 4 จำนวน 15  $\mu$ l (เฉพาะแถว A-D)

\*\*\* แถว E-H ให้เติม สารละลาย Tris-buffer 40  $\mu$ l

- จากนั้นนำสารที่เตรียมไปวัดค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 380 และ 460 นาโนเมตร แล้วนำมาเติมสารละลาย Substrate จำนวน 50  $\mu$ l ลงในทุกหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการวัดค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 380 และ 460 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณ ร้อยละของการยับยั้งค่า enzyme DPP 4

## วิธีการสกัดสารจากใบของกฤษณา

### การเตรียมพืชสมุนไพรก่อนการสกัด

- เก็บตัวอย่างสมุนไพรใบกฤษณาที่ไร่ฟ้าวารี จังหวัดลพบุรี มาผึ่งลมให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทำการชั่งน้ำหนักของใบกฤษณา ก่อนบด และหลังบดแล้วอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธี ซีควนเชียล (Sequential extraction)

## การสกัดด้วยตัวทำละลาย

### การสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

- นำใบกฤษณาที่บดละเอียดแล้ว 3 กิโลกรัม ใส่ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร เติมตัวทำละลายเฮกเซนจำนวน 10 ลิตร ลงไป แล้วปิดฝาให้สนิทไว้ที่อุณหภูมิห้อง

- กรองของเหลวที่ได้โดยใช้กรวยแก้ว แล้วเก็บของเหลวที่ได้ใส่ขวดสีชาขนาด 2.5 ลิตร (สารสกัดส่วนที่ 1)

- นำกากที่เหลือจากการกรองมาหมักต่อด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจำนวน 8 ลิตร
- กรองของเหลวที่ได้อีกครั้งหนึ่ง (สารสกัดส่วนที่ 2)
- นำของเหลวในส่วนที่ 1 และ 2 มารวมกัน จากนั้นนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน หลังจากนั้นจึงทำสารสกัดตัวอย่างให้แห้งสนิทด้วยการใช้เครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ อีกครั้งหนึ่งจะได้สารสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน
- เก็บสารสกัดที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

#### การสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน

- นำใบกฤษณาที่บดละเอียดแล้ว 10 กิโลกรัม ที่ผ่านการหมักในตัวทำละลายเฮกเซน มาเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 10 ลิตร ลงไป แล้วปิดฝาให้สนิททิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- กรองของเหลวที่ได้โดยใช้กรวยแก้ว แล้วเก็บของเหลวที่ได้ใส่ขวดสีชาขนาด 2.5 ลิตร (สารสกัดส่วนที่ 1)
- นำกากที่เหลือจากการกรองมาหมักต่อด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 8 ลิตร
- กรองของเหลวที่ได้อีกครั้งหนึ่ง (สารสกัดส่วนที่ 2)
- นำของเหลวในส่วนที่ 1 และ 2 มารวมกัน จากนั้นนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบ หลังจากนั้นจึงทำสารสกัดตัวอย่างให้แห้งสนิทด้วยการใช้เครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ อีกครั้งหนึ่งจะได้สารสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน
- เก็บสารสกัดที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

#### การสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล

- นำใบกฤษณาที่บดละเอียดแล้ว 3 กิโลกรัม ที่ผ่านการหมักในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนมาเติมตัวทำละลายเมทานอลจำนวน 10 ลิตร ลงไป แล้วปิดฝาให้สนิททิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- กรองของเหลวที่ได้โดยใช้กรวยแก้ว แล้วเก็บของเหลวที่ได้ใส่ขวดสีชาขนาด 2.5 ลิตร (สารสกัดส่วนที่ 1)
- นำกากที่เหลือจากการกรองมาหมักต่อด้วยตัวทำละลายเมทานอลจำนวน 8 ลิตร
- กรองของเหลวที่ได้อีกครั้งหนึ่ง (สารสกัดส่วนที่ 2)
- นำของเหลวในส่วนที่ 1 และ 2 มารวมกัน จากนั้นนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน หลังจากนั้นจึงทำสารสกัดตัวอย่างให้แห้งสนิทด้วยการใช้เครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ อีกครั้งหนึ่ง จะได้สารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล
- เก็บสารสกัดที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

### การศึกษาการแยกองค์ประกอบจากสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

- เตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยการผสมซิลิกาเจลกับตัวทำละลายซึ่งมีขั้วน้อยกว่า สารสกัดที่จะใช้แล้วเทลงในคอลัมน์ซึ่งปลายคอลัมน์ถูกอุดด้วยสำลีที่บริเวณเหนือก๊อกปิดเปิด จากนั้นทำหน้าซิลิกาเจลให้เรียบและทำการปล่อยระดับของตัวทำละลายให้เหลืออยู่เหนือซิลิกาเจล ประมาณ 1 เซนติเมตร
- นำสารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดที่ได้ จากวิธีการสกัดขั้นต้นมาจำนวน 158.48 กรัม มาละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอล
- ชั่งซิลิกาเจล จำนวน 500 กรัม เทใส่ลงในสารตัวอย่าง เขย่าหรือคนให้เข้ากันกับสาร ตัวอย่าง
- นำไปประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห่งระบบสุญญากาศแบบหมุน จนแห้งเป็นผง
- เทสารตัวอย่างลงในคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่ทำการเตรียมไว้ข้างต้นแล้ว ทำการเกลี่ย สารตัวอย่างให้ผิวเรียบเสมอเป็นหน้าเดียวกัน
- สกัดสารตัวอย่างออกมาโดยให้ตัวทำละลายละลายสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านชั้นซิลิกาเจล โดยค่อยๆ เปิดก๊อกและทำการเก็บส่วนต่างๆ ทุกๆ 100 มิลลิลิตร
- ทำการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของสารในคอลัมน์โดยใช้ส่วนผสมของระบบตัวทำ ละลายแบบเกรเดียนต์อีลูชัน (Gradient elution) สำหรับการเปลี่ยนอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ ควรเป็นไปตามลำดับส่วนจาก 100 : 0 แล้วทำการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของสารขึ้นร้อยละ 5 จนถึง อัตราส่วน 0 : 100 ซึ่งอัตราส่วนที่ใช้เป็น ไคคลอโรมีเทน : เมทานอล
- ทำการไล่ระบบโดยใช้ ร้อยละของสารละลายเมทานอล
- นำส่วนต่างๆ ที่แยกได้มาทำการระเหยตัวทำละลายออกให้เหลือประมาณ 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องระเหยแห่งระบบสุญญากาศแบบหมุน และเก็บในขวดเก็บสารตัวอย่าง (Vial) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

### การตรวจสอบหาสารสำคัญกลุ่มแอลคาลอยด์

- นำแผ่น TLC โครมาโตแกรม ที่ทำการแยกในครั้งที่ 1 มาตรวจสอบหาสารกลุ่ม แอลคาลอยด์ด้วยวิธี Dragendroff's reagents โดยทำการพ่นสารลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้
- ปล่อยให้แผ่น TLC แห้ง แล้วถ้าปรากฏเห็นแถบสีส้มบนแผ่น TLC แสดงว่าเป็นสาร กลุ่มแอลคาลอยด์
- นำส่วนของสารสกัดที่พบสารกลุ่มแอลคาลอยด์มาทำการแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์

โครมาโทกราฟีเพื่อแยกสารให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป

**การตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นของส่วนต่างๆ ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี**

- นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีมาทำการจุดโดยจุดเว้นทีละ 5 ขวด
- จุดสารโดยใช้หลอดอะปิลลารีขนาดเล็ก จุ่มลงในสารละลาย แล้วจุด สารลงแผ่น TLC ที่เตรียมไว้ ทำการจุดสารลงจุดละ 5 ครั้ง ทำเช่นนี้กับสารที่จุดเพื่อให้ได้สารที่มีความเข้มข้นในปริมาณที่เท่ากัน

- นำแผ่น TLC ที่เตรียมได้จากข้อ 2 มาผ่านระบบปิดเทงก์ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่
- นำออกมาจากระบบ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำแผ่น TLC ที่เตรียมได้ไปตรวจดูด้วยแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร

- รวมแต่ละส่วนต่างๆ ที่ให้แถบการแยกเหมือนกันเข้าด้วยกันแล้วระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นจึงทำแต่ละส่วนต่างๆ ให้แห้งสนิทด้วยเครื่องด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสูญญากาศแบบหมุน

- เก็บส่วนต่างๆ ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารต่อไปโดยวิธีทางสเปกโทรสโกปีต่อไป

**การทดสอบคุณภาพวิเคราะห์สมบัติในการต้านเอนไซม์ไดเปปทีดิลเพปทีเดสตี**

**(Dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV)**

- นำสารสกัดส่วนต่างๆ ที่ได้จากการเตรียมข้างต้น เติมลงในหลุม 96 Well plate ของแถว 1-10 (แนวนอน) และแถว A-H (แนวตั้ง) ของแต่ละสารสกัดส่วนต่างๆ ตามลำดับแถวที่ 11 เติมน้ำต้านเบาหวาน (Januvia™ หรือ Sitagliptin phosphate) และแถวที่ 12 เติมสารละลาย DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตรของแต่ละหลุม (แสดงดังภาคผนวก ค)

- เติมสารละลาย Tris-HCl buffer ตามปริมาณที่กำหนดดังตารางที่ (แสดงดังภาคผนวก ค)

- เติมเอนไซม์ DPP-IV ปริมาตร 15 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม

- นำไปบ่ม (Incubated) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำเติม

Substrate ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร จนครบทุกช่องใน 96 Well plate

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่น 380 นาโนเมตร และวัดการเรืองแสงที่ 460 นาโนเมตรทุก ๆ 15 นาทีเป็นเวลาทั้งหมด 1 ชั่วโมง

- นำค่าการเรืองแสงที่ได้ มาทำการคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้ง (%Inhibition) แล้วนำมาเขียนกราฟเพื่อดูค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดกับร้อยละของการยับยั้งของสารสกัด



### การทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

- นำผลึกของสารสกัดลำดับที่ 319 และ 334-2 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี มาละลายด้วยร้อยละ 80 ของสารละลายเอทานอล จำนวน 10 มิลลิลิตร
- จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาแบ่งออกเป็น 3 หลอด โดยหลอดที่ 1 ให้เป็นหลอดควบคุม (Blank control) ส่วนหลอดที่ 2 และ 3 ให้นำมาทำการทดสอบ
- นำสารละลายหลอดที่ 2 และ 3 ที่เตรียมได้จากข้างต้นมาทำการทดสอบโดยเติมสารละลายไฮโครคลอริก เข้มข้น จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และ เดิมแมกนีเซียม จำนวน 1-2 แผ่น และสังเกตสี
- เดิมน้ำกลั่น จำนวน 2 มิลลิลิตรและเติมสารละลาย Octyl alcohol จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ และสังเกตการแยกชั้นและสีของสารละลาย Octyl alcohol กับชั้นน้ำ

\*\*\* สังเกตสี

- สีส้มถึงสีแดง Flavone
- สีแดงถึงแดงเลือดนก Flavonol
- สีแดงเลือดนกถึงแดงม่วง Flavanone
- Chalcone, Aurone ไม่ให้สีกับการทำสอบนี้

\*\*\* สังเกตสีในชั้นของสารละลาย Octyl alcohol กับชั้นน้ำ

- ถ้าเป็น Aglycone จะให้สีในชั้นของสารละลาย Octyl alcohol
- ถ้าเป็น Glycosides จะให้สีในชั้นของน้ำ

### เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

เตาอบ (Oven, ยี่ห้อ Memmert)

เครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator with cooling system, ยี่ห้อ Buchi, รุ่น Rotavapor R-124)

เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance 4 position, ยี่ห้อ Ohaus, รุ่น E02140)

เครื่องฉายยูวี (UV light, ยี่ห้อ Cabinet II, รุ่น CM-10)

เครื่องเขย่าด้วยคลื่นความถี่เหนือเสียง (Ultrasonic bath, ยี่ห้อ Branson, รุ่น B2210

E-DTH)

เครื่องอัลตราไวโอเล็ตและวิสิเบิลสเปกโตรมิเตอร์ (UV-VIS spectrometer, ยี่ห้อ Shimadzu, รุ่น UV-mini 1240)

เครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศ(Freeze dry system, ยี่ห้อ Labconco, รุ่น Free zone 18)

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, ยี่ห้อ Pharmacia, รุ่น PharmaciaLKB. NovaspecII) เครื่องเขย่า (Auto vortex mixer, ยี่ห้อ Chiltern, รุ่น MT19)

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance (NMR))

เครื่องฟลูออเรสเซนซ์ ไมโครเพลทรีดเดอร์ (Fluorescence microplate reader) ยี่ห้อ Gemini EM microplate reader

เบ็กเกอร์ (Beaker)

ขวดรูปกรวย (Erlenmeyer flask)

กระบอกตวง (Measuring cylinder)

ขวดก้นกลม (Round bottom flask)

ช้อนตักสาร (Spatula)

หลอดหยด (Dropper)

เพลท (TLC Aluminium Sheets 20 X 20cm Si 60 F<sub>254</sub>)

แคปิลารี (Capillary tube)

ขวดเก็บสารตัวอย่าง (Vial)

ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)

ขวดน้ำล้าง (Wash bottom)

อะลูมิเนียมฟลอยด์ (Aluminium foil)

สำลี (Cotton)

คีมหนีบ (Forceps)

ปิเปตต์ (Measuring pipette)

กรวยกรอง (Funnel)

กระดาษกรอง (Filter paper)

หลอดทดลอง (Test tube)

ตะแกรงวางหลอดทดลอง (Test tube rack)

แท่งแก้ว (Stirring rod)

หลอดเก็บเลือด (Microhaematocrit tubes)

ไมโครปิเปตต์ (Micro pipette)

คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.25 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร

กรรไกร (Scissors)

## สารเคมี

เฮกเซน (Hexane), Burdick&Jackson, A.R. grade, Chemex

ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane), Burdick&Jackson, A.R. grade, Chemex

เมทานอล (Methanol), Burdick&Jackson, A.R. grade, Chemex

เอทิล แอซิเตต (Ethyl acetate), Burdick&Jackson, A.R. grade, Chemex

เมทานอลดีสี่ (Methanol -D<sub>4</sub>), Merck, Chemex

คลอโรฟอร์มดีหนึ่ง (Chloroform-D<sub>1</sub>), Merck, Chemex

ซิลิกาเจล (Silica gel 60 Particle size 63-200 μM), Merck

ซับสเตรท (Substrate), Aldrich, SM chemicals

เอนไซม์ไดเพปติลเพปติเดสสี่ (DPP-IV), Merck, Chemex

ยาด้านเบาหวาน (Januvia™ หรือ Sitagliptin Phosphate), Merck sharp & Dohme (Italia) S.p.A

## สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

งานวิจัยนี้สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าร้อยละ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 1. สูตรการหาค่าเฉลี่ย

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

เมื่อ  $\bar{X}$  แทน ค่าเฉลี่ย

$\sum x$  แทน ผลรวมทั้งหมดของความถี่ คูณ คะแนน

$n$  แทน ผลรวมทั้งหมดของความถี่ซึ่งมีค่าเท่ากับจำนวนข้อมูล

### 2. สูตรการหาค่าร้อยละ

$$P = \frac{F \times 100}{n}$$

เมื่อ  $P$  แทน ร้อยละ

$F$  แทน ความถี่ที่ต้องการแปลค่าให้เป็นร้อยละ

$n$  แทน จำนวนความถี่ทั้งหมด

### 3. สูตรการหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$S = \sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

เมื่อ S แทน ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

n แทน จำนวนคู่ทั้งหมด

X แทน คะแนนแต่ละตัวในกลุ่มข้อมูล

$\sum x$  แทน ผลรวมของความแตกต่างของคะแนนแต่ละคู่

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแยกสารสำคัญของสารสกัดจากใบกฤษณาด้วยวิธีสีแควนเซียล ซึ่งเป็นการแยกส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์โคเลสเตอรอลดีไฮโดรจีเนส (DPP-4) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ที่ทดสอบส่วนสกัดออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ DPP-4 จากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* โดยแสดงผลการศึกษาดังนี้

#### ผลการศึกษาการสกัดตัวอย่างสมุนไพร

ตัวอย่างใบกฤษณา (*Aquilaria crassna pierre ex lecomte*) ที่เก็บจากไร่ฟ้าวารี จังหวัดลพบุรี มาทำให้แห้งโดยใช้ตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วบดเป็นผงละเอียดจำนวน 3 กิโลกรัม นำมาสกัดแยกโดยใช้สารละลาย เฮกเซนจำนวน 12 ลิตร เป็นเวลา 4 วัน ไคคลอโรมีเทนจำนวน 12 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน และเมทานอลจำนวน 10 ลิตรเป็นเวลา 4 วัน ทำการสกัดโดยใช้วิธีสีแควนเซียล (Sequential extraction) และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสูญญากาศแบบหมุนภายใต้ความดัน 150 – 300 มิลลิบาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำสารสกัดมาทำให้แห้งสนิทด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Freeze dryer) ได้ผลผลิตทดลอง ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณและร้อยละของสารสกัดหยาบและสีของสารละลาย เฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเมทานอล ที่สกัดแยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 3.0 กิโลกรัม

ตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (% Yield)
เฮกเซน	เจียน้ำตาล	19.63	0.65
ไคคลอโรมีเทน	เจียวเข้ม	7.61	0.25
เมทานอล	เจียน้ำตาล	158.48	5.28

จากตารางที่ 10 เมื่อนำสารสกัดหยาบใบกฤษณาที่สกัดได้จากตัวทำละลายเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน และเมทานอล มาคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ พบว่าปริมาณร้อยละของสารสกัดเมทานอล ให้ค่าร้อยละของสารสกัด (%Yield) สูงที่สุดคือร้อยละ 5.282 รองลงมาคือสารสกัดเฮกเซนคือร้อยละ 0.654 และสารสกัดไคคลอโรมีเทนคือร้อยละ 0.253

## ผลการศึกษาการแยกองค์ประกอบจากสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี

จากการศึกษาการแยกองค์ประกอบของใบกฤษณาจำนวน 3 กิโลกรัม โดยนำมาทำการสกัดแยกด้วยวิธีซีเวนเซิลด์ ด้วยสารละลายเฮกเซน จำนวน 10 ลิตร เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นกรองเอาสารละลายออก แล้วนำมาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน จากนั้นจึงทำการสกัดต่อด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล โดยทำเช่นเดียวกันกับวิธีข้างต้น จากนั้นทำการรวมน้ำหนักของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลาย และนำมาทดสอบสมบัติการต้านเบาหวาน โดยใช้เอนไซม์ไคเพปทีลเพปทีเดสตี (DPP-4) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจากใบกฤษณาที่ทำการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จำนวน 3 กิโลกรัม

ตัวทำละลาย	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4
เฮกเซน	9.18
ไดคลอโรมีเทน	12.32
เมทานอล	19.24

หมายเหตุ : ส่วนของสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ppb

สารมาตรฐาน (Januvia) ความเข้มข้น 39.90 ppb

จากตารางที่ 11 พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดแยกด้วยสารละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล เมื่อทดสอบสมบัติการต้านเบาหวานโดยใช้เอนไซม์ไคเพปทีลเพปทีเดสตี ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ไคเพปทีลเพปทีเดสตีที่ร้อยละ 9.18, 12.32 และ 19.24 ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายเมทานอล มีสมบัติในการต้านเบาหวานโดยใช้เอนไซม์ไคเพปทีลเพปทีเดสตีที่ดีที่สุด จึงนำมาทำการศึกษาด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อ

การสกัดแยกด้วยวิธีข้างต้นพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 มากที่สุดจึงนำมาทำการสกัดแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร ใช้ ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมิร์ก (Merck) จำนวน 1200 กรัม เป็นตัวแพ็คเกจในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบจำนวน 158.48 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 500 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ของสารละลาย

ไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 100 ดังตารางที่ 12 โดยเก็บทีละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นทีละ 5 ขวด แล้วนำไปหาวิภาคเคลื่อนที่ของสารโดยใช้ไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 12 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 1 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่าง ไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (900 มิลลิลิตร) ร้อยละ 95 : 5 (1000 มิลลิลิตร) และร้อยละ 90 : 10 (800 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 2 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (2800 มิลลิลิตร) และร้อยละ 80 : 20 (400 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 3 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ ร้อยละ 80 : 20 (2000 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 4 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 80 : 20 (600 มิลลิลิตร) และร้อยละ 75 : 25 (500 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 5 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 75 : 25 (2300 มิลลิลิตร) ร้อยละ 70 : 30 (2800 มิลลิลิตร) และร้อยละ 65 : 35 (810 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 6 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 65 : 35 (2100 มิลลิลิตร) ร้อยละ 60 : 40 (2900 มิลลิลิตร) และร้อยละ 55 : 45 (1100 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 7 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 55 : 45 (1700 มิลลิลิตร) ร้อยละ 50 : 50 (2800 มิลลิลิตร) และร้อยละ 45 : 55 (500 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 8 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 45 : 55 (2300 มิลลิลิตร) และร้อยละ 40 : 60 (1700 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 9 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 40 : 60 (1200 มิลลิลิตร) และร้อยละ 35 : 65 (2800 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 10 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 30 : 70 (2800 มิลลิลิตร) และร้อยละ 25 : 75 (1200 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 11 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 25 : 75 (1600 มิลลิลิตร) และร้อยละ 20 : 80 (2300 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 12 อยู่ในช่วงวิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคโคลโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 20 : 80 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 15 : 85 (2800 มิลลิลิตร) ร้อยละ 10 : 90 (2900 มิลลิลิตร) ร้อยละ 5 : 90 (2890 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 100 (3000 มิลลิลิตร) แสดงดังตารางที่ 13, 14 และภาพที่ 27

ตารางที่ 12 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 158.48 กรัม ใน ส่วนของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (ลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3



ตารางที่ 13 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 158.48 กรัม ในแต่ละส่วนของ  
สารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

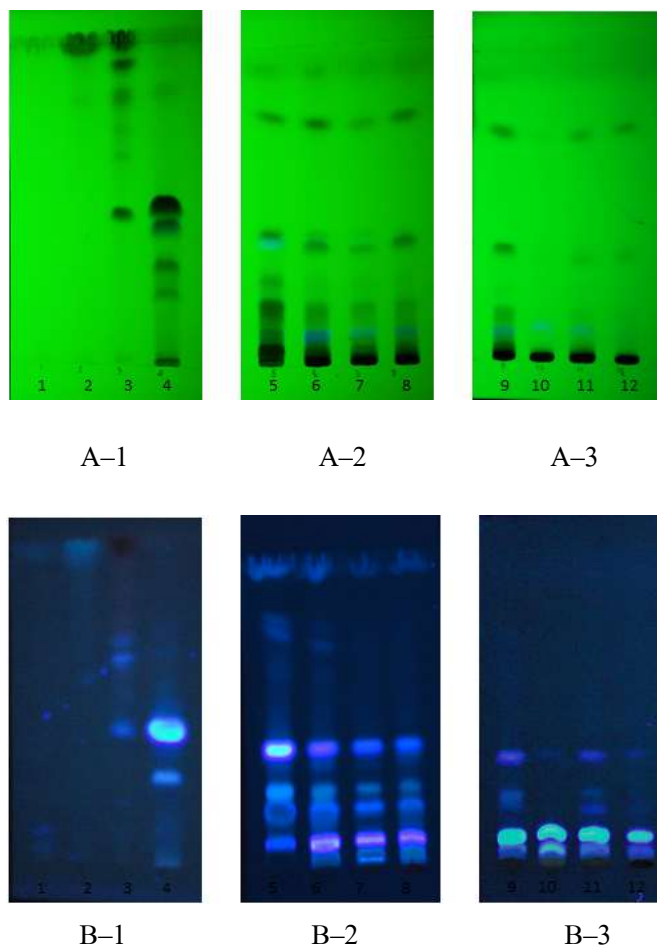
ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM 1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	900
	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	800
ASM 2	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM 3	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2000
ASM 4	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	600
	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
ASM 5	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2300
	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	810
ASM 6	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2100
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2900
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1100
ASM 7	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1700
	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
ASM 8	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2300
	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1700
ASM 8	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2300
	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1700
ASM 9	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1200
	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
ASM 10	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
	75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1200

ตารางที่ 13 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 158.48 ในแต่ละส่วนของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM 11	75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1600
	80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2300
ASM 12	80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
	90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2900
	95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2890
	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3000

ตารางที่ 14 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 1 – ASM 12 ที่แยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 3 กิโลกรัม ในส่วนของเมทานอล 158.48 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

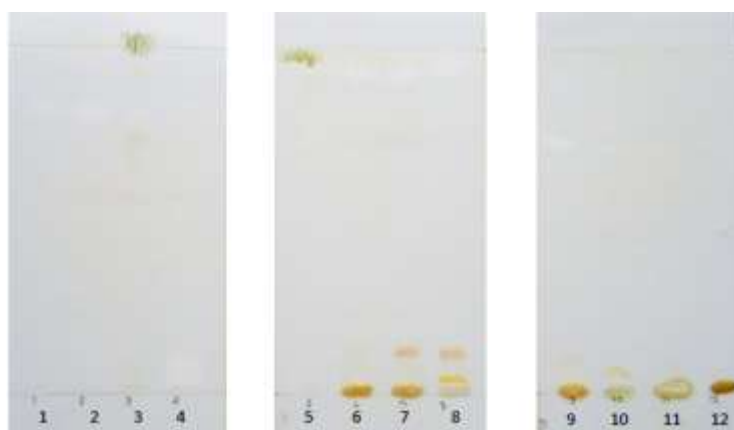
ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM 1	0.118	0.07	เหลืองเข้ม
ASM 2	0.233	0.14	เหลืองอ่อน
ASM 3	7.923	4.99	เขียวเข้ม (เหนียวหนืด)
ASM 4	8.455	5.33	เขียวอ่อน
ASM 5	–	–	น้ำตาลอมแดง (เหนียวหนืด)
ASM 6	6.494	4.09	น้ำตาลเชื่อมอมเหลือง
ASM 7	9.330	5.88	น้ำตาล
ASM 8	2.947	1.85	น้ำตาล
ASM 9	2.355	1.48	น้ำตาล
ASM 11	5.005	3.15	น้ำตาลอ่อน
ASM 12	1.596	1.00	น้ำตาลเข้ม
รวม	–	–	



**ภาพที่ 27** TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 158.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี  
 คอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดในส่วนเมทานอล ลำดับที่ ASM 1 – ASM 12  
 ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub>  
 วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, A-2, A-3 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (90 : 10)  
 B-1, B-2, B-3 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (90 : 10)  
 A-1, A-2, A-3 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร  
 B-1, B-2, B-3 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

### ผลการตรวจสอบหาสารสำคัญกลุ่มแอลคาลอยด์

ผลจากการตรวจสอบหาสารสำคัญกลุ่มแอลคาลอยด์ของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณา จำนวน 158.480 กรัม ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 1 – ASM 12 จากการสกัดแยกโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents ปรากฏผลดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณาจำนวน 159.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1 – ASM 12 หลังจาการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents

จากภาพที่ 27 พบว่าสารสกัดส่วนที่ ASM 7 ASM 8 ASM 9 และ ASM 10 ที่ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมิร์ก (Merck) จำนวน 1200 กรัม เป็นสารที่มีกลุ่มสารแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ จึงนำมาทำการแยกสกัดด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้างต้น โดยใช้คอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมิร์ก (Merck) จำนวน 1000 กรัม เป็นตัวแพ็กกิ้งในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบจำนวน 25.02 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 300 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 4.5 : 5.0 : 0.5 – 0 : 0 : 100 ดังตารางที่ 15 โดยเก็บที่ละ 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นที่ละ 5 ขวด แล้วนำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโน

เมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 11 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 1 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่าง ไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 4.5 : 5.0 : 0.5 (500 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 2 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 4.5 : 5.0 : 0.5 (1000 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 3 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 4.5 : 5.0 : 0.5 (500 มิลลิลิตร) และร้อยละ 4.0 : 5.0 : 1.0 (1500 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 4 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 4.0 : 5.0 : 1.0 (500 มิลลิลิตร) และร้อยละ 4.0 : 4.5 : 1.5 (1500 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 5 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 4.0 : 4.0 : 1.5 (500 มิลลิลิตร) และร้อยละ 4.0 : 4.0 : 2.0 (4000 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 6 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 4.0 : 4.0 : 2.0 (350 มิลลิลิตร) ร้อยละ 3.5 : 4.0 : 2.5 (1950 มิลลิลิตร) และร้อยละ 3.5 : 3.5 : 3.0 (1650 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 7 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 3.5 : 3.5 : 3.0 (1600 มิลลิลิตร) ร้อยละ 3.0 : 3.5 : 3.5 (1650 มิลลิลิตร) ร้อยละ 3.0 : 3.0 : 4.0 (750 มิลลิลิตร) และร้อยละ 2.5 : 3.0 : 4.5 (900 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 8 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 2.5 : 2.5 : 5.0 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 2.0 : 2.5 : 5.5 (900 มิลลิลิตร) ร้อยละ 2.0 : 2.0 : 6.0 (750 มิลลิลิตร) ร้อยละ 1.5 : 2.0 : 6.5 (1650 มิลลิลิตร) และร้อยละ 1.0 : 1.5 : 7.5 (1150 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 9 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 1.0 : 1.5 : 7.5 (250 มิลลิลิตร) ร้อยละ 1.0 : 1.0 : 8.0 (1750 มิลลิลิตร) ร้อยละ 0.5 : 1.0 : 8.5 (1150 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0.5 : 0.5 : 9.0 (1900 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 10 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 0.5 : 0.5 : 9.0 (500 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 0 : 10.0 (4400 มิลลิลิตร) และสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 11 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 0 : 0 : 10.0 (0 : 0 : 3000 มิลลิลิตร) แสดงดังตารางที่ 16, 17 และภาพที่ 29

ตารางที่ 15 ร้อยละและปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารจำนวน 25.02 กรัม ในส่วน  
ของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10

วัฏภาคเคลื่อนที่		ปริมาตร (ลิตร)
5% : 50% : 45%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
10% : 50% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
15% : 45% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
20% : 40% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.5
25% : 40% : 35%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
30% : 35% : 35%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
35% : 35% : 30%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
40% : 30% : 30%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
25% : 30% : 25%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
25% : 25% : 50%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
20% : 25% : 55%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
20% : 20% : 60%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
15% : 20% : 65%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
15% : 20% : 70%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
10% : 15% : 75%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
10% : 10% : 80%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
5% : 10% : 85%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
5% : 5% : 90%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
0% : 0% : 100%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7.5

ตารางที่ 16 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารจำนวน 25.02 กรัม ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 ASM 7 – ASM 10 ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่		ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (7–10) 1	5% : 50% : 45%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
ASM (7–10) 2	5% : 50% : 45%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
ASM (7–10) 3	5% : 50% : 45%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2000
	10% : 50% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1500
ASM (7–10) 4	10% : 50% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	15% : 45% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1500
ASM (7–10) 5	15% : 40% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	450
	20% : 40% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4000
ASM (7–10) 6	20% : 40% : 40%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	350
	25% : 40% : 35%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1950
	30% : 35% : 35%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1650
ASM (7–10) 7	30% : 35% : 35%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1600
	35% : 35% : 30%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1650
	45% : 30% : 25%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	900
ASM (7–10) 8	50% : 25% : 25%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	55% : 25% : 20%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	900
	60% : 20% : 20%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	750
	65% : 20% : 15%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1650
	70% : 20% : 10%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1150
ASM (7–10) 9	70% : 20% : 10%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	250
	75% : 15% : 10%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1600
	80% : 10% : 10%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1750
	85% : 10% : 5%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1150
	90% : 5% : 5%	MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1900

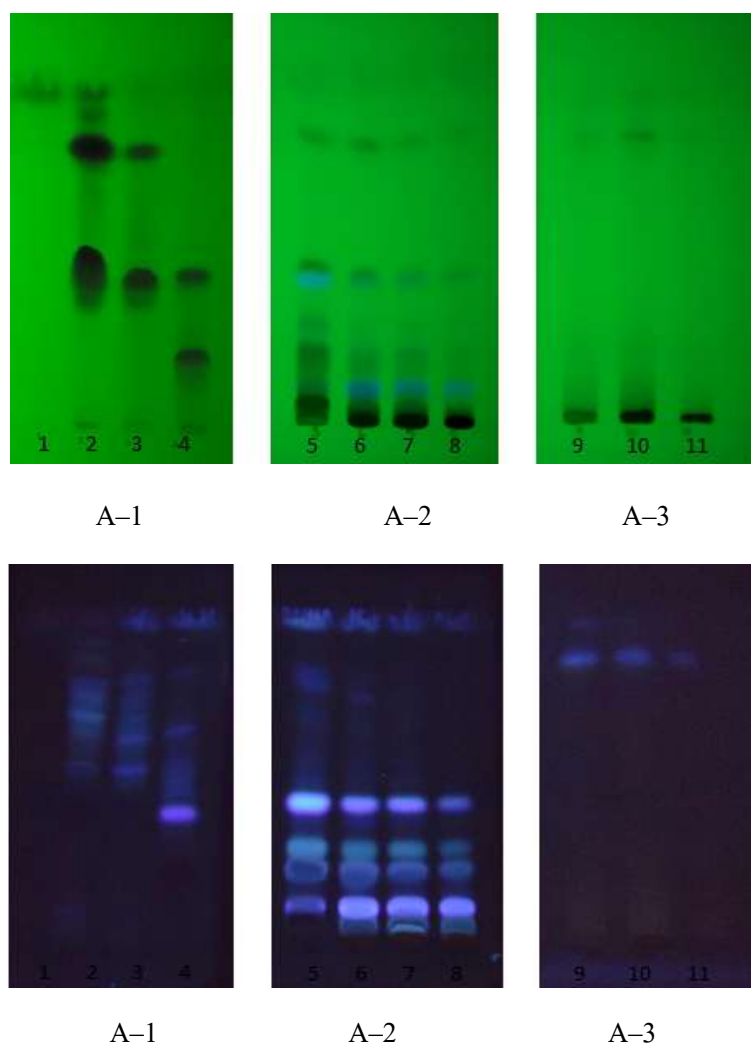
ตารางที่ 16 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารจำนวน 25.02 กรัม ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 ASM 7 – ASM 10 ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (7–10) 10	90% : 5% : 5% MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	100% : 0% : 0% MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4400
ASM (7–10) 11	100% : 0% : 0% MeOH : EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3000

ตารางที่ 17 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 1 – ASM 11 ที่แยกได้จากสารจำนวน 25.02 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (7–10) 1	0.057	0.24	สีขาวอมเหลือง
ASM (7–10) 2	0.105	0.45	เหลืองน้ำตาลเขียว
ASM (7–10) 3	0.027	0.11	เหลืองอมน้ำตาลเข้ม
ASM (7–10) 4	0.327	1.42	น้ำตาลอ่อน
ASM (7–10) 5	0.997	4.33	น้ำตาลอ่อน
ASM (7–10) 6	3.216	13.9	น้ำตาล
ASM (7–10) 7	6.951	30.22	น้ำตาล
ASM (7–10) 8	4.295	18.67	น้ำตาล
ASM (7–10) 9	1.404	6.10	น้ำตาลเข้ม
ASM (7–10) 10	0.544	2.36	น้ำตาลเข้ม
ASM (7–10) 11	0.445	1.93	น้ำตาลเข้ม
รวม	18.368		





ภาพที่ 29 TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 25.02 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดในส่วนเมทานอล ลำดับที่ ASM (7-10) 1 – ASM (7-10) 11 จากส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10

ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub>

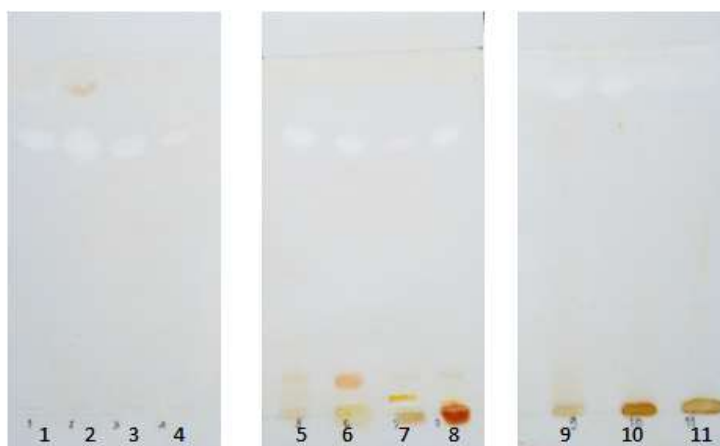
วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, A-2, B-1, B-2 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (90 : 10)

A-3, B-3 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (60 : 40)

A-1, A-2, A-3 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

B-1, B-2, B-3 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

จากภาพที่ 29 เมื่อนำแผ่น TLC ที่ผ่านการจุดสารสกัดลำดับที่ ASM (7-10) 1– ASM (7-10) 11 ที่ได้จากการแยกสกัดโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี มาทดสอบหาสารกลุ่มแอลคาลอยด์ด้วยวิธี Dragendroff's reagents ปรากฏแถบสีส้มบนแผ่น TLC ดังภาพที่ 30



**ภาพที่ 30** TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 25.023 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี  
คอลัมน์โครมาโทกราฟี .ในส่วนของสารสกัดส่วน ASM (7-10) 1- ASM (7-10) 11  
หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents

จากภาพที่ 30 พบว่ามีแถบสีส้มปรากฏในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 5 ASM  
(7-10) 6 ASM (7-10) 7 ASM (7-10) 8 ASM (7-10) 9 และ ASM (7-10) 10 ตามลำดับ แสดงว่า  
สารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 5 ASM (7-10) 6 ASM (7-10) 7 ASM (7-10) 8 ASM (7-10) 9  
และ ASM (7-10) 10 มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

#### **ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์โคเพทิดิลเพปติเดส (DPP-4)**

จากการศึกษาการสกัดแยกสารจากใบกฤษณาจำนวน 3.0 กิโลกรัม ในส่วนของสารสกัด  
เมทานอลจำนวน 158.480 กรัม ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนของสารสกัดทั้งหมด 12  
ส่วน คือ ASM 1 – ASM12 แล้วนำส่วนของสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้จากการแยกมาทำการทดสอบ  
สมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ให้ค่า ดังตารางที่ 18 ภาพที่ 31

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณา  
จำนวน 158.480 กรัม ที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4
ASM 1	–
ASM 2	–
ASM 3	–
ASM 4	72.80
ASM 5	–
ASM 6	–
ASM 7	12.24
ASM 8	2.24
ASM 9	9.36
ASM 10	8.49
ASM 11	–
ASM 12	–
Januvia	67.71

หมายเหตุ : ส่วนของสารสกัดส่วนที่ASM 1 – ASM 12 ที่ความเข้มข้น 100 ppb  
สารมาตรฐาน (Januvia) ความเข้มข้น 39.90 ppb



ภาพที่ 31 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 158.480 กรัมจาก ใบกฤษณา จำนวน 3.0 กิโลกรัม ของส่วนสกัดที่ ASM 1– ASM 12 เมื่อเทียบกับ สารมาตรฐาน (Januvia)

จากภาพที่ 31 พบว่าสารสกัดที่แยกได้จากสารจำนวน 158.480 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 4, ASM 7, ASM 8, ASM 9 และ ASM 10 ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 72.80, 12.24, 2.42, 9.36 และ 8.49 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 500 ppb เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.900 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

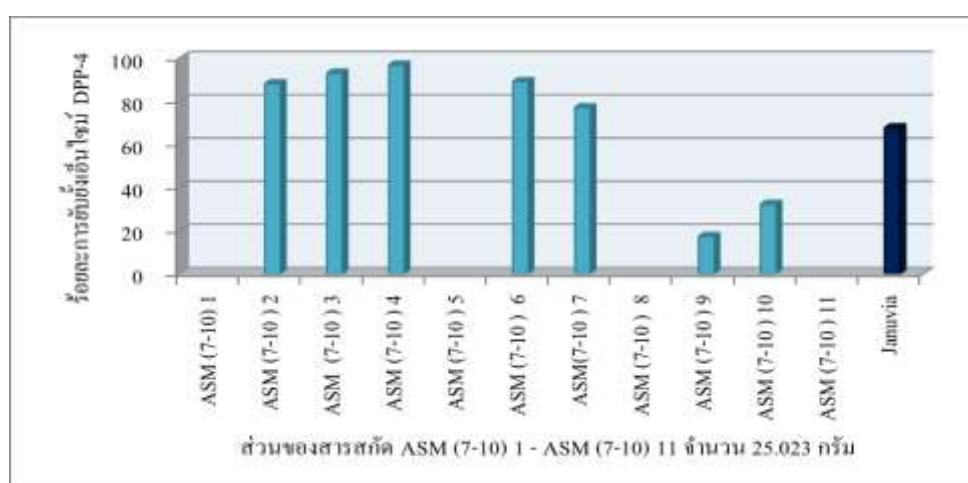
ตารางที่ 19 ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจำนวน 25.023 กรัม ที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10

ส่วนของสารสกัด	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4
ASM (7–10) 1	–
ASM (7–10) 2	88.10
ASM (7–10) 3	92.95
ASM (7–10) 4	96.76
ASM (7–10) 5	–
ASM (7–10) 6	89.11
ASM (7–10) 7	77.01

ตารางที่ 19 (ต่อ) ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจำนวน 25.023 กรัม  
ที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10

ส่วนของสารสกัด	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4
ASM (7-10) 8	–
ASM (7-10) 9	17.35
ASM (7-10) 10	32.27
ASM (7-10) 11	–
Januvia	67.71

หมายเหตุ : ส่วนของสารสกัดส่วนที่ASM 1 – ASM 12 ที่ความเข้มข้น 100 ppb  
สารมาตรฐาน (Januvia) ความเข้มข้น 39.90 ppb



ภาพที่ 32 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดจำนวน 25.02 กรัม ของสารสกัดส่วน  
ที่ ASM (7-10) 1 – ASM (7-10) 11 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia)

จากภาพที่ 32 พบว่าสารสกัดที่แยกได้จากสารจำนวน 25.023 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าในของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 2, ASM (7-10) 3, ASM (7-10) 4, ASM (7-10) 7, ASM (7-10) 9 และ ASM (7-10) 10 ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 92.80, 95.24, 97.78, 80.36, 20.24, 32.27 และ 32.27 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 500 ppb เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

จากการแยกสกัดสารในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 158.48 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมด 12 ส่วน คือ ASM 1 – ASM 12 เมื่อทำการทดสอบหาสารกลุ่มแอลคาลอยด์ด้วยวิธี Dragendoff's reagent พบว่าสารสกัดส่วนที่ ASM 7 – ASM 10 มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบจึงนำมาทำการศึกษาการแยกสารจำนวน 25.02 กรัม ได้สารสกัดทั้งหมด 11 ส่วน คือ ASM (7–10) 1 - ASM (7–10) 11 และทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น จากนั้นจึงทำการสกัดแยกสารในส่วนสกัดแต่ละส่วนที่แยกได้จากสารจำนวน 25.02 กรัม ดังนี้

#### ส่วนของสารสกัด ASM (7–10) 5

การแยกสารสกัดในส่วนที่ ASM (7–10) 5 จำนวน 0.94 กรัม ซึ่งอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตต: เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 4.0 : 4.0 : 1.5 (500 มิลลิลิตร) และร้อยละ 4.0 : 4.0 : 2.0 (4000 มิลลิลิตร) นำมาสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมอร์ค (Merck) จำนวน 100 กรัม เป็นตัวแพ็กกลงในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบจำนวน 0.94 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 15 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 100 ดังตารางที่ 20 โดยเก็บที่ละ 15 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นที่ละ 5 ขวด แล้วนำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 11 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (7–10) 5-1 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (45 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7–10) 5-2 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (30 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7–10) 5-3 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (15 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7–10) 5-4 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (60 มิลลิลิตร) และร้อยละ 85 : 15 (30 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7–10) 5-5 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (45 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7–10) 5-6 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (15 มิลลิลิตร) ร้อยละ 80 : 20 (90 มิลลิลิตร) และร้อยละ 75 : 25 (45

มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 5-7 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 75 : 25 (45 มิลลิลิตร) ร้อยละ 70 : 30 (100 มิลลิลิตร) และร้อยละ 65 : 35 (75 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 5-8 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 65 : 35 (30 มิลลิลิตร) ร้อยละ 60 : 40 (100 มิลลิลิตร) และร้อยละ 55 : 45 (75 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 5-9 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 55 : 45 (15 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 5-10 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 50 : 50 (105 มิลลิลิตร) ร้อยละ 45 : 55 (105 มิลลิลิตร) ร้อยละ 40 : 60 (105 มิลลิลิตร) และร้อยละ 35 : 65 (45 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 5-11 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 35 : 65 (45 มิลลิลิตร) ร้อยละ 30 : 70 (105 มิลลิลิตร) ร้อยละ 25 : 75 (105 มิลลิลิตร) ร้อยละ 20 : 80 (105 มิลลิลิตร) ร้อยละ 15 : 85 (105 มิลลิลิตร) ร้อยละ 10 : 90 (105 มิลลิลิตร) ร้อยละ 5 : 95 (105 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 100 (105 มิลลิลิตร) แสดงดังตารางที่ 21, 22

ตารางที่ 20 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 5 จำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100

ตารางที่ 20 (ต่อ) ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 5 จำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100

ตารางที่ 21 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 5 จำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (7-10) 5-1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
ASM (7-10) 5-2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30
ASM (7-10) 5-3	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15
ASM (7-10) 5-4	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
ASM (7-10) 5-5	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
ASM (7-10) 5-6	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
ASM (7-10) 5-6	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
ASM (7-10) 5-7	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	75



ตารางที่ 21 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 5 จำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (7-10) 5-8	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	75
ASM (7-10) 5-9	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15
ASM (7-10) 5-10	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
ASM (7-10) 11	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
	80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
	85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
	90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
	95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105

ตารางที่ 22 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 5-1 – ASM (7-10) 5-11 ที่แยกได้จากสารสกัดจำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (7-10) 5-1	0.071	7.53	เขียวอมน้ำตาล (หนืด)
ASM (7-10) 5-2	0.012	1.27	น้ำตาล
ASM (7-10) 5-3	0.005	0.53	น้ำตาล
ASM (7-10) 5-4	0.164	17.83	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 5-5	0.230	25.58	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 5-6	0.174	18.47	น้ำตาล
ASM (7-10) 5-7	0.011	1.167	น้ำตาล

ตารางที่ 22 (ต่อ) น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 5-1 – ASM (7-10) 5-11 ที่แยกได้จากสารสกัดจำนวน 0.94 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (7-10) 5-8	0.016	11.69	น้ำตาลเข้ม (หนืด)
ASM (7-10) 5-9	0.000	0.01	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 5-10	0.012	1.27	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 5-11	0.014	1.48	น้ำตาลอมเหลือง
รวม	0.0709		

#### ส่วนของสารสกัด ASM 1(7-10) 6

การแยกสารสกัดในส่วนที่ ASM(7-10) 6 จำนวน 3.05 กรัม ซึ่งอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตด: เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 4.0 : 4.0 : 2.0 (350 มิลลิลิตร) ร้อยละ 3.5 : 4.0 : 2.5 (1950 มิลลิลิตร) และร้อยละ 3.5 : 3.5 : 3.0 (1650 มิลลิลิตร) นำมาสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมอร์ก (Merck) จำนวน 50 กรัม เป็นตัวแพ็คเกจในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบจำนวน 3.05 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 15 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 0 : 100 ดังตารางที่ 23 โดยเก็บทีละ 15 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นทีละ 5 ขวด แล้วนำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 8 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 6-1 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (195 มิลลิลิตร) และร้อยละ 95 : 5 (30 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 6-2 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (120 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 6-3 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (165 มิลลิลิตร) และร้อยละ

ละ 90 : 10 (285 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 6-4 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (75 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 6-5 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (30 มิลลิลิตร) และร้อยละ 85 : 15 (45 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 6-6 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (120 มิลลิลิตร) และร้อยละ 80 : 20 (15 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 6-7 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 80 : 20 (150 มิลลิลิตร) และร้อยละ 75 : 25 (120 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 6-8 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 75 : 25 (60 มิลลิลิตร) ร้อยละ 70 : 30 (195 มิลลิลิตร) ร้อยละ 65 : 35 (195 มิลลิลิตร) ร้อยละ 60 : 40 (165 มิลลิลิตร) ร้อยละ 55 : 45 (195 มิลลิลิตร) ร้อยละ 50 : 50 (180 มิลลิลิตร) ร้อยละ 45 : 55 (195 มิลลิลิตร) ร้อยละ 40 : 60 (105 มิลลิลิตร) ร้อยละ 35 : 65 (90 มิลลิลิตร) ร้อยละ 30 : 70 (90 มิลลิลิตร) ร้อยละ 25 : 75 (120 มิลลิลิตร) ร้อยละ 20 : 80 (90 มิลลิลิตร) ร้อยละ 15 : 85 (90 มิลลิลิตร) ร้อยละ 10 : 90 (90 มิลลิลิตร) ร้อยละ 5 : 95 (90 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 100 (300 มิลลิลิตร) แสดงดังตารางที่ 24 , 25

ตารางที่ 23 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 1(7-10) 6 จำนวน 3.05 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200

ตารางที่ 23 (ต่อ) ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 1(7-10) จำนวน 3.05 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100

ตารางที่ 24 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 6 จำนวน 3.05 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (7-10) 6-1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30
ASM (7-10) 6-2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	120
ASM (7-10) 6-3	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	165
	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	285
ASM (7-10) 6-4	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	75
ASM (7-10) 6-5	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	120
ASM (7-10) 6-6	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15
	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	150
ASM (7-10) 6-7	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	120
	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
ASM (7-10) 6-8	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	165

ตารางที่ 24 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 6 จำนวน 3.05 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
	75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	120
	80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
	85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
	90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
	95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300

ตารางที่ 25 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 6-1 – ASM (7-10) 6-8 ที่แยกได้จากสารจำนวน 3.05 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (7-10) 6-1	0.026	0.84	น้ำตาลอมเขียว
ASM (7-10) 6-2	0.030	0.98	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (7-10) 6-3	0.042	1.37	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 6-4	0.004	0.13	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (7-10) 6-5	0.003	0.09	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (7-10) 6-6	0.016	0.53	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (7-10) 6-7	0.130	4.24	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 6-8	2.369	77.44	น้ำตาลเข้ม
รวม	2.620	-	-

### ส่วนของสารสกัด ASM (7-10) 7

การแยกสารสกัดในส่วนที่ ASM (7-10) 7 จำนวน 6.58 กรัม ซึ่งอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เอทิล แอซิเตต: เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 3.5 : 3.5 : 3.0 (1600 มิลลิลิตร) ร้อยละ 3.0 : 3.5 : 3.5 (1650 มิลลิลิตร) ร้อยละ 3.0 : 3.0 : 4.0 (750 มิลลิลิตร) และร้อยละ 2.5 : 3.0 : 4.5 (900 มิลลิลิตร) นำมาสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมิร์ก (Merck) จำนวน 200 กรัม เป็นตัวแพ็กกิ้งในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบจำนวน 6.58 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 50 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 100 ดังตารางที่ 26 โดยเก็บทีละ 15 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นทีละ 5 ขวด แล้วนำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 10 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 7-1 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (30 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-2 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (45 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-3 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (90 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-4 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (180 มิลลิลิตร) และร้อยละ 90 : 10 (105 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-5 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (90 มิลลิลิตร) และร้อยละ 85 : 15 (135 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-6 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (75 มิลลิลิตร) ร้อยละ 80 : 20 (195 มิลลิลิตร) และร้อยละ 75 : 25 (165 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-7 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 75 : 25 (60 มิลลิลิตร) ร้อยละ 70 : 30 (195 มิลลิลิตร) ร้อยละ 60 : 40 (195 มิลลิลิตร) และร้อยละ 55 : 45 (45 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-8 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 55 : 45 (135 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-9 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล

ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 55 : 45 (15 มิลลิลิตร) ร้อยละ 50 : 50 (195 มิลลิลิตร) และร้อยละ 45 : 55 (120 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (7-10) 7-10 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 45 : 55 (75 มิลลิลิตร) ร้อยละ 40 : 60 (180 มิลลิลิตร) ร้อยละ 35 : 65 (180 มิลลิลิตร) ร้อยละ 30 : 70 (180 มิลลิลิตร) ร้อยละ 25 : 75 (180 มิลลิลิตร) ร้อยละ 20 : 80 (180 มิลลิลิตร) ร้อยละ 15 : 85 (180 มิลลิลิตร) ร้อยละ 10 : 90 (180 มิลลิลิตร) ร้อยละ 5 : 95 (180 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 100 (480 มิลลิลิตร) แสดงผังตารางที่ 27, 28

ตารางที่ 26 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 7 จำนวน 6.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500

ตารางที่ 27 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 7 จำนวน 6.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM 1(7-10) 7-1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30
ASM 1(7-10) 7-2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
ASM 1(7-10) 7-3	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
ASM 1(7-10) 7-4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	105
ASM 1(7-10) 7-5	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	135
ASM 1(7-10) 7-6	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	75
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	165
ASM 1(7-10) 7-7	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60
	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	45
ASM 1(7-10) 7-8	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	132
ASM 1(7-10) 7-9	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15
	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	195
ASM 1(7-10) 7-10	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	75
	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180



ตารางที่ 27 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM (7-10) 7 จำนวน 6.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
	90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	180
	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	480

ตารางที่ 28 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (7-10) 7-1 – ASM (7-10) 7-10 ที่แยกได้จากสารจำนวน 6.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (7-10) 7-1	0.014	0.21	เหลืองอมเขียว
ASM (7-10) 7-2	0.090	1.36	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (7-10) 7-3	0.047	0.71	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (7-10) 7-4	0.123	1.86	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 7-5	0.078	1.12	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 7-6	0.066	1.00	น้ำตาลเข้ม
ASM (7-10) 7-7	0.272	4.13	น้ำตาลเข้ม (หนืด)
ASM (7-10) 7-8	0.290	4.40	น้ำตาลเข้ม (หนืด)
ASM (7-10) 7-9	0.766	11.64	น้ำตาลเข้ม (หนืด)
ASM (7-10) 7-10	3.250	49.39	น้ำตาลเข้ม (หนืด)
รวม	4.996		

จากการสกัดสารใหม่โดยใช้ใบกฤษณาจำนวน 10.50 กิโลกรัม โดยนำมาทำการสกัดแยกด้วยวิธีซีเวนเฮลล์ ด้วยสารละลายเฮกเซน จำนวน 26 ลิตร เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นกรองเอาสารละลายออก แล้วนำมาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน จากนั้นจึงทำการสกัดต่อด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล โดยทำเช่นเดียวกันกับวิธีข้างต้น จากนั้นทำการรวมน้ำหนักของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลาย เลือกสารสกัดหยาบเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม มาทำการสกัดแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาด

ของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมอร์ก (Merck) จำนวน 1200 กรัม เป็นตัวแพ็กลงในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบจำนวน 169.58 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 350 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่าง ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 100 ดังตารางที่ 29 โดยเก็บที่ละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นที่ละ 5 ขวด แล้วนำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 12 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 1 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (700 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 2 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (400 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 3 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ ร้อยละ 100 : 0 (400 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 4 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (700 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 5 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (2300 มิลลิลิตร) และร้อยละ 95 : 5 (4200 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 6 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (3800 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ 7 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (1000 มิลลิลิตร) และร้อยละ 90 : 10 (3000 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 2–8 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (1900 มิลลิลิตร) และร้อยละ 85 : 15 (2200 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 9 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (2800 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 10 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (5490 มิลลิลิตร) และร้อยละ 80 : 20 (2800 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 11 อยู่ในช่วง วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 80 : 20 (5650 มิลลิลิตร) ร้อยละ 75 : 25 (6200 มิลลิลิตร) ร้อยละ 70 : 30 (6400 มิลลิลิตร) ร้อยละ 65 : 35 (8000 มิลลิลิตร) ร้อยละ 60 : 40 (6000 มิลลิลิตร) ร้อยละ 55 : 45 (7000 มิลลิลิตร) ร้อยละ 50 : 50 (11800 มิลลิลิตร) ร้อยละ 45 : 55 (16700 มิลลิลิตร) ร้อยละ 40 : 60 (10000 มิลลิลิตร) และร้อยละ 35 : 65

(100 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 12 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 35 : 65 (4800 มิลลิลิตร) ร้อยละ 30 : 70 (5700 มิลลิลิตร) ร้อยละ 25 : 75 (5000 มิลลิลิตร) ร้อยละ 15 : 85 (3100 มิลลิลิตร) ) ร้อยละ 10 : 90 (2000 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 100 (4300 มิลลิลิตร) แสดงดังตารางที่ 30, 31 และภาพที่ 33

ตารางที่ 29 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 169.58 กรัม ในส่วนสกัดเมทานอลจากใบกฤษณา โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (ลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6
5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	11
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	14
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	12
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	16
60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	11
65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5
70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6
75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6
80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4
85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5
90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.5
95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.5
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.3

ตารางที่ 30 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์  
โครมาโทกราฟีของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณา ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM 1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	700
ASM 2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM 3	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM 4	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	700
ASM 5	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2300
	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4200
ASM 6	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3800
ASM 7	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3000
ASM 8	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1900
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2000
ASM 9	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
ASM 9	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
ASM 10	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5490
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
ASM 11	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5650
	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6200
	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6400
	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8000
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6000
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7000
	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	118000
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	16700
	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10000
	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100

ตารางที่ 30 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 169.58 กรัม โดยวิธี  
คอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดเมทานอลจากใบกฤษณา ในแต่ละส่วนของสาร  
สกัด

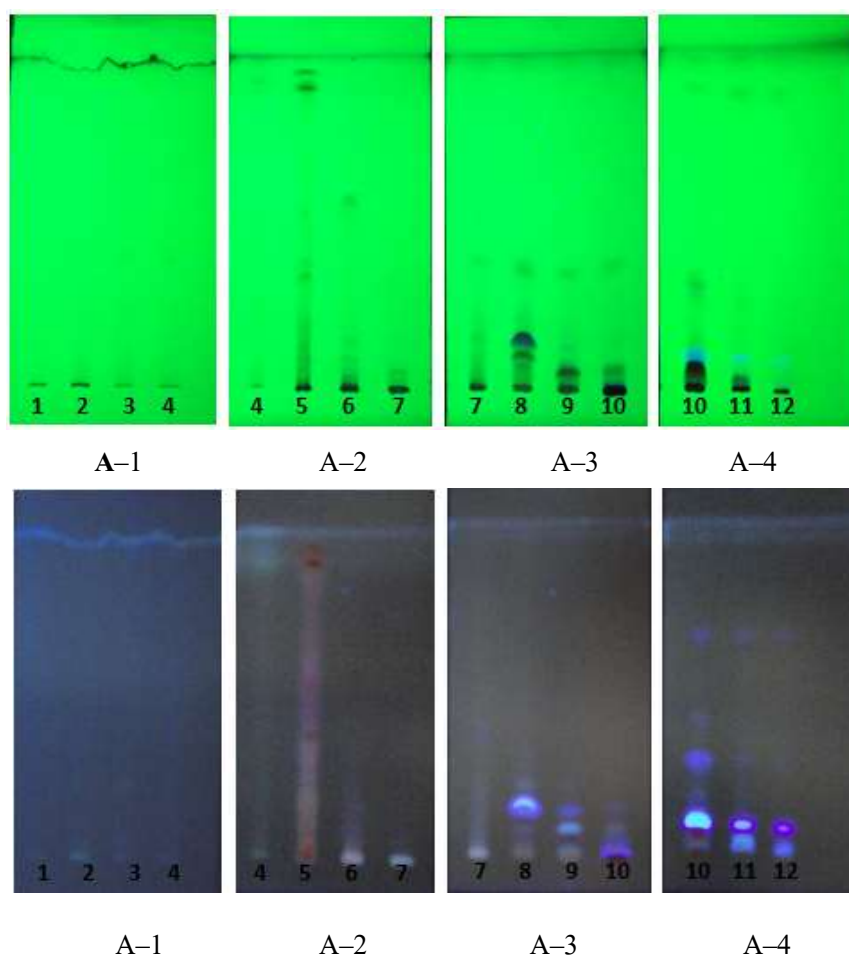
ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM 12	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4800
	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5700
	75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5000
	80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3100
	85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
	90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1500
	95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1500
	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1300

ตารางที่ 31 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 2-1 – ASM 2-12 ที่แยกได้  
จากใบ กฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัมในส่วนของเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม  
โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM 1	0.035	0.02	น้ำตาลอ่อน
ASM 2	0.114	0.06	เหลืองอ่อน
ASM 3	1.188	0.70	น้ำตาลเข้ม
ASM 4	0.337	0.19	ส้มเข้ม
ASM 5	19.787	11.69	เขียวเข้ม
ASM 6	9.034	5.33	เขียวอมเหลือง
ASM 7	2.987	1.76	เขียวเข้มอมเหลือง
ASM 8	6.614	6.64	เขียวเข้ม
ASM 9	7.699	4.54	เขียวอมเหลือง
ASM 10	23.412	13.83	น้ำตาลเข้มอมส้ม

ตารางที่ 31 (ต่อ) น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 2-1 – ASM 2-12 ที่แยกได้จากใบ กฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัมในส่วนของเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM 11	38.832	22.94	น้ำตาลแข็ง
ASM 12	1.9420	1.147	เจียวมน้ำตาล
รวม	111.9863		



ภาพที่ 33 TLC โครมาโตแกรม ของสาร จำนวน 169.58 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1 – ASM 12

ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub>

วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, B-1 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Hexane (9.5:0.5)

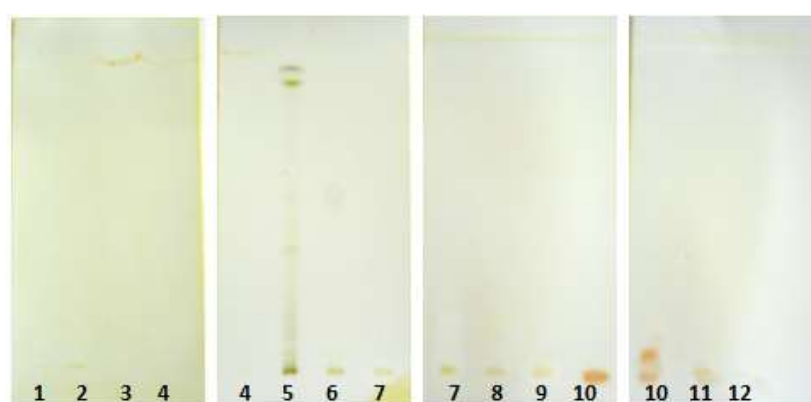
A-2, B-2 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9.9:0.1)

A-3, B-3 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9.3:0.7)

A-4, B-4 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9.25:0.75)

A-1, A-2, A-3, A-4 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

B-1, B-2, B-3, B-4 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



ภาพที่ 34 TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 169.48 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี  
คอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารส่วนที่ ASM 1 – ASM 12 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี  
Dragendroff's reagents

จากภาพที่ 34 พบว่ามีแถบสีส้มปรากฏในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (11) 10 และ ASM (11) 11 ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดส่วนที่ ASM 2 (11) 10 และ ASM 2 (11) 11 มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ จากนั้นจึงเลือกสารสกัดส่วนที่ ASM 11 ที่ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 16.5 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมิร์ก (Merck) จำนวน 1200 กรัม เป็นสารที่มีกลุ่มสารแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ จึงนำมาทำการสกัดแยกด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้างต้น โดยใช้คอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 เซนติเมตร สูง 75 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมิร์ก (Merck) จำนวน 800 กรัม เป็นตัวแพ็คเกจในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบจำนวน 35 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 150 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์ โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่าง ไดคลอโร

มีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 100 ดังตารางที่ 32 โดยเก็บที่ละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นที่ละ 5 ขวด แล้วนำไปหาภูมิภาคเคลื่อนที่ของสารโดยใช้ไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 12 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (11) 1 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (7 00 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 2 อยู่ในช่วง ภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (1300 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 3 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ ร้อยละ 100 : 0 (1400 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 4 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (5300 มิลลิลิตร) ร้อยละ 95 : 5 (600 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 5 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (3400 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 6 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (700 มิลลิลิตร) และร้อยละ 90 : 10 (3300 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 7 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (3800 มิลลิลิตร) และร้อยละ 85 : 15 (1000 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 8 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (1400 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 9 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 80 : 20 (8400 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 10 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 80 : 20 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 75 : 25 (2600 มิลลิลิตร) ร้อยละ 70: 30 (2900 มิลลิลิตร) ร้อยละ 65: 35 (4450 มิลลิลิตร) ร้อยละ 60 : 40 (5800 มิลลิลิตร) ร้อยละ 55: 45 (3200 มิลลิลิตร) ร้อยละ 50: 50 (2600 มิลลิลิตร) ร้อยละ 45 : 55 (1950 มิลลิลิตร) และร้อยละ 40: 60 (300 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM 2 (11) 11 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่าง ไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 40 : 60 (1300 มิลลิลิตร) ร้อยละ 35 : 65 (4500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 30 : 70 (2600 มิลลิลิตร) ร้อยละ 25 : 75 (1900 มิลลิลิตร) ร้อยละ 20 : 80 (2700 มิลลิลิตร) ร้อยละ 15 : 85 (2400 มิลลิลิตร) และร้อยละ 10 : 90 (1900 มิลลิลิตร) สารสกัดส่วนที่ ASM (11) 12 อยู่ในช่วงภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างไคคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 10 : 90 (700 มิลลิลิตร) ร้อยละ 5 : 90 (5900 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 100 (53200 มิลลิลิตร) แสดงดังตารางที่ 33, 34 และภาพที่ 35



ตารางที่ 32 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสาร จำนวน 35 กรัม โดยวิธี  
คอลัมน์โครมาโท กราฟิของสารสกัดเมทานอลในส่วนสกัดที่ ASM 2 –11

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (ลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3
95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3

ตารางที่ 33 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สกัดแยกสารจำนวน 35 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 2 -11

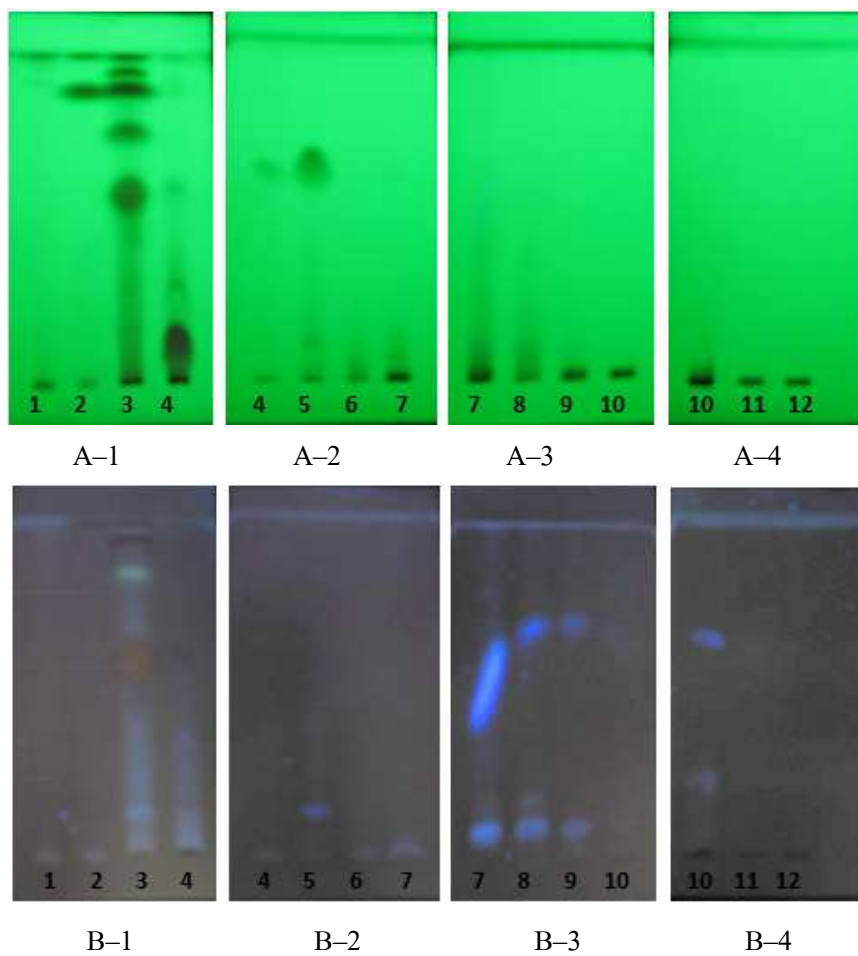
ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (11) 1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	700
ASM (11) 2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM (11) 3	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM (11) 4	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	700
ASM (11) 5	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2300
	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4200
ASM (11) 6	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3800
ASM (11) 7	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3000
ASM (11) 8	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1900
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2000
ASM (11) 9	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
ASM (11) 10	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5490
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2800
ASM (11) 11	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5650
	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6200
	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6400
	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8000
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6000
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7000
	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	118000
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	16700
	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10000
	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100

ตารางที่ 33 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารจำนวน 35 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 2 -11

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (11) 12	65% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4800
	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5700
	75% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5000
	80% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3100
	85% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
	90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4300
	95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2000
	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3000

ตารางที่ 34 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM 2 (11) 1 – ASM 2 (11) 12 ที่แยกได้จากสารจำนวน 35 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 2 (11)

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (11) 1	0.122	0.34	เหลือง
ASM (11) 2	0.014	0.41	ขาวผสมเหลือง
ASM (11) 3	0.468	1.33	เขียวอมเหลือง
ASM (11) 4	0.149	0.42	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (11) 5	0.418	1.37	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (11) 6	0.580	1.65	น้ำตาลอมเหลืองเข้ม
ASM (11) 7	2.237	6.39	น้ำตาลเข้ม
ASM (11) 8	0.433	1.23	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (11) 9	2.662	7.60	น้ำตาลเข้มอมแดง
ASM (11) 10	22.959	65.59	น้ำตาลอมแดง
ASM (11) 11	2.665	7.614	น้ำตาลเข้มอมแดง
ASM (11) 12	1.035	2.95	น้ำตาลอมแดง
รวม	111.986		



ภาพที่ 35 TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัด จำนวน 35 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอตัมน์ โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11  
ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub>

วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, B-1 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9.9 : 0.1)

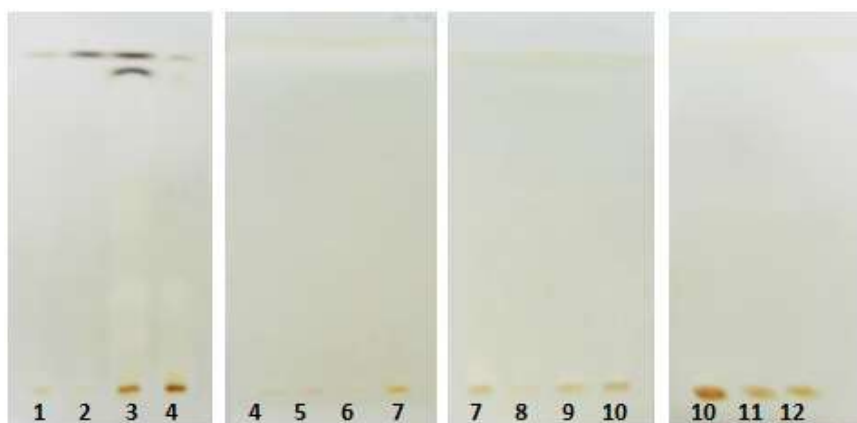
A-2, B-2 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9.7 : 0.3)

A-3, B-3 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9.2 : 0.8)

A-4, B-4 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (8.9 : 1.1)

A-1, A-2, A-3, A-4 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

B-1, B-2, B-3, B-4 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



**ภาพที่ 36** TLC โครมาโตแกรม ของสารสกัดจำนวน 35 กรัมได้จากการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังจากการทดสอบด้วยวิธี Dragendroff's reagents

จากภาพที่ 36 พบว่าว่ามีแถบสีส้มปรากฏในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (11) 5 ASM (11) 6 ASM (11) 7 ASM (11) 8 ASM (11) 9 ASM (11) 10 และ ASM (11) 11 ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดส่วนที่ ASM (11) 5 ASM (11) 6 ASM (11) 7 ASM (11) 8 ASM (11) 9 ASM (11) 10 และ ASM (11) 11 มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

จากการศึกษาการสกัดแยกสารจากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม โดยทำเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น และนำสารในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 169.480 กรัม มาทำการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนของสารสกัดทั้งหมด จำนวน 12 ส่วน คือ ASM 1 – ASM 12 และทำการตรวจสอบหาสารกลุ่มแอลคาลอยด์โดยใช้วิธีเดียวกับวิธีข้างต้น พบว่าสารสกัดในส่วนที่ ASM 11 มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ จึงนำส่วนของสารสกัดจำนวน 35 กรัม มาทำการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารสกัดทั้งหมด จำนวน 12 ส่วน คือ ASM (11) 1 – ASM (11) 12 จากนั้นจึงนำสารสกัดที่แยกได้จากสาร จำนวน 169.580 และ 35 กรัม มาทำการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 โดยทำเช่นเดียวกับสารที่สกัดได้จากใบกฤษณาจำนวน 3.0 กิโลกรัม ให้ค่า ดังตารางที่ 35 แสดงดังภาพที่ 36

ตารางที่ 35 ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจากใบกฤษณาจำนวน 169.580 กรัม ที่แยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4
ASM 1	27.96
ASM 2	23.12
ASM 3	27.96
ASM 4	31.77
ASM 5	54.14
ASM 6	24.11
ASM 7	12.020
ASM 8	–
ASM 9	–
ASM 10	–
ASM 11	–
ASM 12	–
Januvia	67.71

หมายเหตุ : ส่วนของสารสกัดส่วนที่ASM 1 – ASM 12 ที่ความเข้มข้น 100 ppb  
 สารมาตรฐาน (Januvia) ความเข้มข้น 39.90 ppb



ภาพที่ 37 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 ของสารสกัดส่วนที่ ASM 1– ASM 12 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia)

จากภาพที่ 37 พบว่าสารสกัดที่แยกได้จากสารจำนวน 169.580 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 1, ASM 2, ASM 3, ASM 4, ASM 5, ASM 6 และ ASM 7 ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 27.960, 23.120, 27.960, 31.770, 54.140, 24.110 และ 12.020 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 500 ppb เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

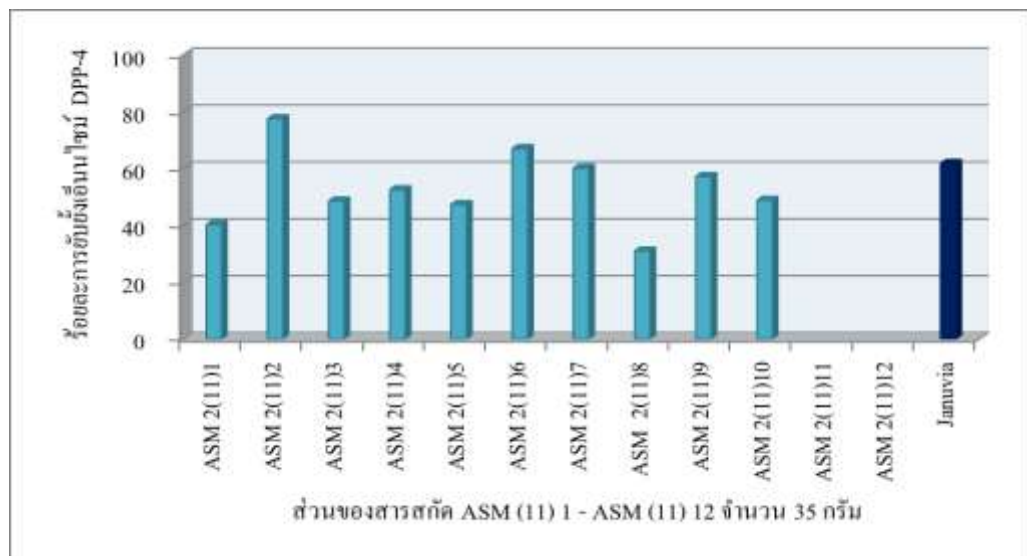
ตารางที่ 36 ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจำนวน 35 กรัม จากใบกฤษณาที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4
ASM (11) 1	40.26
ASM (11) 2	77.46
ASM (11) 3	48.50
ASM (11) 4	52.52
ASM (11) 5	47.29
ASM (11) 6	66.96
ASM (11) 7	60.96

ตารางที่ 36 (ต่อ) ผลการทดสอบสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ของสารสกัดจำนวน 35 กรัม จากใบกฤษณาที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4
ASM (11) 8	30.97
ASM (11) 9	57.13
ASM (11) 10	48.76
ASM (11) 11	–
ASM (11) 12	–
Januvia	67.71

หมายเหตุ : ส่วนของสารสกัดส่วนที่ASM 1 – ASM 12 ที่ความเข้มข้น 100 ppb สารมาตรฐาน (Januvia) ความเข้มข้น 39.90 ppb



ภาพที่ 38 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดเมทาอนลจำนวน 35 กรัม จากใบกฤษณา จำนวน 11.50 ของสารสกัดส่วนที่ กASM (11) 1 – ASM (11) 12 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia)



จากภาพที่ 38 สารสกัดแยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2 ในของสารสกัดส่วนที่ ASM (11) 1, ASM (11) 2, ASM (11) 3, ASM (11) 4, ASM (11) 5, ASM (11) 6, ASM (11) 7, ASM (11) 8, ASM (11) 9 และ ASM (11) 10 ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 40.260, 77.460, 48.500, 52.520, 47.290, 66.960, 60.100, 30.970, 57.130 และ 48.760 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 500 ppb เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.710

จากการแยกสกัดสารในส่วนสกัดเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมด 12 ส่วน คือ ASM 1 – ASM 12 เมื่อทำการทดสอบหาสารกลุ่มแอลคาลอยด์โดยวิธี Dragendoff's reagent พบว่าสารสกัดส่วนที่ ASM 11 มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ จากนั้นจึงนำมาทำการศึกษาการแยกสารสกัดในส่วนของเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม ได้สารสกัดทั้งหมด 12 ส่วน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี มาทำการแยกสกัดสารในแต่ละส่วนของสารสกัด ดังนี้

#### ส่วนของสารสกัด ASM 5

การแยกสารสกัดในส่วนที่ ASM 2-5 จำนวน 19.78 กรัม ซึ่งอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (2300 มิลลิลิตร) และร้อยละ 95 : 5 (4200 มิลลิลิตร) นำมาสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 72 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมอร์ค (Merck) จำนวน 150 กรัม เป็นตัวแพ็คเกจในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาดจำนวน 19.78 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 10 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาดลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเอทิล แอซิเตด และเมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 0 : 100 ดังตารางที่ 37 โดยเก็บที่ละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นที่ละ 5 ขวด แล้วนำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสง ยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัดสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 19 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM ( ) 1 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (100 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (5) 2 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (100



ตารางที่ 37 ร้อยละและปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 2-5 จำนวน 19.78 กรัมโดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาณ (มิลลิลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3000
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500

ตารางที่ 38 ปริมาณของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 2-5 โดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี จำนวน 19.78 กรัม ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาณ (มิลลิลิตร)
ASM (5) 1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
ASM (5) 2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
ASM (5) 3	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
ASM (5) 4	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
ASM (5) 5	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
ASM (5) 6	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
ASM (5) 7	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
ASM (5) 8	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100

ตารางที่ 38 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 2-5 โดยวิธี  
คอลัมน์โครมาโทกราฟี จำนวน 19.78 กรัม ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
	95% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
ASM (5) 9	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
ASM (5) 10	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
ASM (5) 11	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
ASM (5) 12	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
ASM (5) 13	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM (5) 14	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	600
ASM (5) 15	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
ASM (5) 16	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
ASM (5) 17	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
ASM (5) 18	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
ASM (5) 19	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300

ตารางที่ 39 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (5) 1 – ASM (5) 19 ที่แยกได้  
จากสารจำนวน 19.780 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (5) 1	0.636	3.22	ไม่มีสี
ASM (5) 2	0.849	4.30	เหลืองอมส้ม
ASM (5) 3	0.355	4.09	เหลือง
ASM (5) 4	0.808	1.80	เหลืองอมเขียว
ASM (5) 5	0.366	1.85	เขียวอ่อน
ASM (5) 6	0.722	3.66	เขียวอ่อน
ASM (5) 7	0.228	1.57	เขียวอ่อน
ASM (5) 8	0.285	1.44	เขียวอ่อน
ASM (5) 10	0.643	3.26	เขียวเข้ม (หนืด)
ASM (5) 11	0.075	3.57	เขียวเข้ม (หนืด)
ASM (5) 12	9.563	48.42	เขียวเข้ม (หนืด)
ASM (5) 13	3.243	16.42	เขียวเข้ม (หนืด)
ASM (5) 14	0.299	1.51	เขียวเข้ม (หนืด)
ASM (5) 15	0.060	0.30	เขียวอมน้ำตาล
ASM (5) 16	0.062	0.31	เขียวอมน้ำตาล
ASM (5) 16	0.062	0.31	เขียวอมน้ำตาล
ASM (5) 17	0.063	0.31	เขียวอมน้ำตาล
ASM (5) 18	0.120	0.60	เขียวอมน้ำตาล
ASM (5) 19	0.333	1.68	เขียวอมน้ำตาล
รวม	18.844		

### ส่วนของสารสกัด ASM 8

การแยกสารสกัดในส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.50 กรัม ซึ่งอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่าง ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (1900 มิลลิลิตร) และร้อยละ 85 : 15 (2200 มิลลิลิตร) นำมาสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 72 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของ เมิร์ก (Merck) จำนวน 150 กรัม เป็นตัวแพ็คเกจในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัว ทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบจำนวน 2.50 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับ ซิลิกาเจลจำนวน 5 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสาร ออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล โดยใช้วัฏภาค เคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเอทิล แอซิเตต และเมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 0 : 100 ดังตารางที่ 40 โดยเก็บทีละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นทีละ 5 ขวด แล้วนำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ใน อัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้นไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสง ยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโน เมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ ด้วยกัน จากการแยกสกัดสาร โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 12 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM (8) 1 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (300 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (8) 2 อยู่ในช่วงวัฏภาค เคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (100 มิลลิลิตร) และร้อย ละ 95 : 5 (300 มิลลิลิตร ส่วนที่ ASM (8) 3 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (200 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (8) 4 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (500 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (8) 5 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (500 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (8) 6 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ใน อัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 5 (500 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (8) 7 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างได คลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 5 (100 มิลลิลิตร) ร้อยละ 90 : 10 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 85 : 15 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 80 : 20 (1000 มิลลิลิตร) และร้อยละ 80 : 25 (500 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (8) 8 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ใน อัตราส่วนที่ร้อยละ 70 : 30 (500 มิลลิลิตร) และร้อยละ 65 : 35 (300 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (8) 9 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 65 : 35 (200 มิลลิลิตร) ร้อยละ 60 : 40 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 55 : 45 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 50 : 45 (500

มิลลิลิตร) และร้อยละ 45 : 55 (400 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (8) 10 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 45 : 55 (100 มิลลิลิตร) และร้อยละ 40 : 60 (500 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 100 (500 มิลลิลิตร) แสดงดังตารางที่ 41, 42

ตารางที่ 40 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.50 กรัมโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2500
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1100
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500

ตารางที่ 41 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.50 กรัมโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (8) 1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
ASM (8) 2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
	5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
ASM (8) 3	5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
ASM (8) 4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500

ตารางที่ 41 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.50 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (8) 5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
ASM (8) 6	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
ASM (8) 8	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
ASM (8) 9	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM (8) 10	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100
	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500

ตารางที่ 42 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (8) 1 – ASM (8) 10 ในส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.50 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

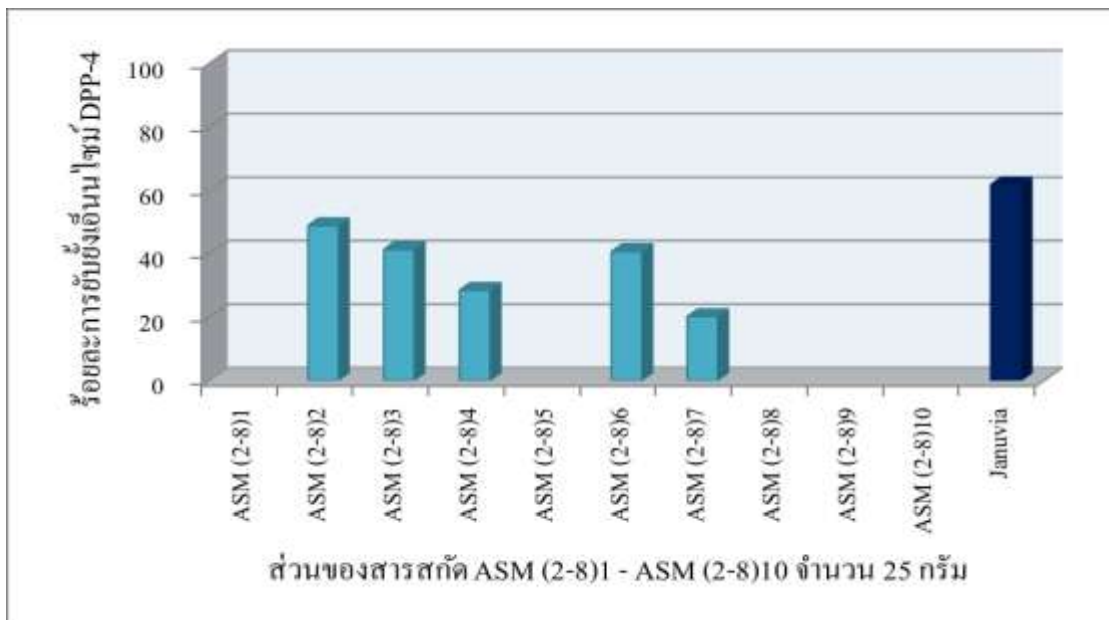
ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (8) 1	0.013	0.54	เขียวอมเหลือง
ASM (8) 2	0.071	2.87	เขียวอมเหลือง
ASM (8) 3	0.081	3.23	เขียวเข้ม
ASM (8) 4	0.155	6.20	เขียวอ่อน
ASM (8) 5	1.244	49.78	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (8) 6	0.514	20.56	เขียวเข้ม
ASM (8) 7	0.090	3.60	เขียวอมเหลือง



ตารางที่ 42 (ต่อ) น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (8) 1 – ASM (8) 10 ใน ส่วนที่ ASM 8 จำนวน 2.50 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (8) 7	0.090	3.60	เขียวอมเหลือง
ASM (8) 8	0.056	2.26	เขียวอ่อน
ASM (8) 9	0.028	1.14	เขียวอ่อน
ASM (8) 10	0.077	3.10	เหลืองอ่อน
รวม	2.332		

จากตารางที่ 41 เมื่อนำส่วนสกัดที่แยกได้จากข้างต้นไปทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ DDD-4 พบว่า สารสกัดในส่วนที่ ASM (8) 2, ASM (8) 3, ASM (8) 4, ASM (8) 6 และ ASM (8) 7 ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 48.813, 41.326, 28.490, 40.680 และ 20.173 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 500 ppb เมื่อเทียบกับยาต้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71 ซึ่งแสดงได้ดังภาพที่ 39



ภาพที่ 39 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ในส่วนสกัดจำนวน 2.5 กรัม ของสารสกัดส่วนที่ ASM (8) 1 – ASM (8) 10 เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน (Januvia)

### ส่วนของสารสกัด ASM 9

การแยกสารสกัดในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.96 กรัม ซึ่งอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่าง ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (2800 มิลลิลิตร) นำมาสกัดแยกด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ขนาดของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร สูง 72 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063–0.200 มิลลิเมตร ของเมอร์ก (Merck) จำนวน 150 กรัม เป็น ตัวแห้งลงในคอลัมน์ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบ จำนวน 7.96 กรัม มาผสมให้เข้ากันกับซิลิกาเจลจำนวน 5 กรัม แล้วค่อยเทสารสกัดหยาบลงใน คอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วเกลี่ยสารสกัดให้เรียบ จากนั้นทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้วัฏภาค เคลื่อนที่ ที่ของสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่าง ไดคลอโร มีเทนกับเอทิล แอซิเตด และเมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 100 : 0 – 0 : 0 : 100 ดังตารางที่ 43 โดยเก็บที่ละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาทำการจุดลงบนแผ่น TLC โดยเว้นที่ละ 5 ขวด แล้ว นำไปหาวัฏภาคเคลื่อนที่ ของสารโดยใช้ไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 1.0 : 0 เป็นต้น ไป นำมาตรวจสอบภายใต้แสง ยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดที่มีลักษณะเหมือนกันไว้ด้วยกัน จากการแยกสกัด สารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีทำให้ได้สารทั้งหมดจำนวน 12 ส่วน ดังนี้ ส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM (9) 1 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 100 : 0 (1600 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 2 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโร มีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 100 : 0 (800 มิลลิลิตร) และร้อยละ 95 : 5 (300 มิลลิลิตร ส่วนที่ ASM (9) 3 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ ร้อยละ 95 : 5 (900 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 4 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (700 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 5 อยู่ในช่วงวัฏภาค เคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 95 : 5 (600 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 6 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (400 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 7 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 90 : 10 (300 มิลลิลิตร) และร้อยละ 85 : 15 (300 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 8 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (700 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 9 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (1000 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 10 อยู่ในช่วงวัฏภาค เคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 85 : 15 (200 มิลลิลิตร) และร้อย ละ 80 : 20 (800 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 11 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน :

เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 75 : 25 (1000 มิลลิลิตร) ส่วนที่ ASM (9) 12 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วนที่ร้อยละ 70 : 30 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 65 : 35 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 60 : 540 (500 มิลลิลิตร) ร้อยละ 55 : 45 (300 มิลลิลิตร) ร้อยละ 50 : 50 (400 มิลลิลิตร) ร้อยละ 45 : 55 (500 มิลลิลิตร) และร้อยละ 0 : 100 (500 มิลลิลิตร) แสดงดังตารางที่ 4 4, 45

ตารางที่ 43 ร้อยละและปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.69 กรัมโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2500
10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3000
15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1500
20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2500
25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500

ตารางที่ 44 ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.96 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (9) 1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1600
ASM (9) 2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	800
	5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
ASM (9) 3	5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	900

ตารางที่ 44 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.96 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (9) 4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	700
ASM (9) 5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	600
ASM (9) 6	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM (9) 7	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl	300
ASM (9) 8	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	700
ASM (9) 9	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
ASM (9) 10	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	800
ASM (9) 11	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
ASM (9) 1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1600
ASM (9) 2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	800
	5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
ASM (9) 3	5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	900
ASM (9) 4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	700
ASM (9) 5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	600
ASM (9) 6	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
ASM (9) 7	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl	300
ASM (9) 8	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	700
ASM (9) 9	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000
ASM (9) 10	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	200
	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	800
ASM (9) 11	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1000

ตารางที่ 44 (ต่อ) ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้สกัดแยกสารในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.96 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ในแต่ละส่วนของสารสกัด

ส่วนของสารสกัด	วัฏภาคเคลื่อนที่	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
ASM (9) 12	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	45% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	300
	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	400
	55% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500
	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	500

ตารางที่ 45 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของสารสกัดส่วนที่ ASM (9) 1 – ASM (9) 12 ในส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.69 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

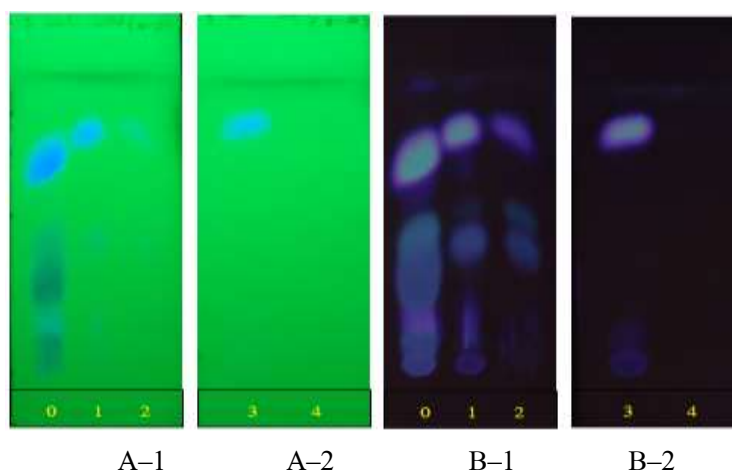
ส่วนของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (%Yield)	ลักษณะของสารสกัด
ASM (9) 1	0.078	0.01	เหลือง
ASM (9) 2	1.298	16.88	เขียวเข้ม
ASM (9) 3	2.495	33.45	เขียวอมเหลือง
ASM (9) 4	0.424	5.51	น้ำตาลเข้ม
ASM (9) 5	0.073	0.96	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (9) 6	0.224	2.91	น้ำตาลอมเหลือง (หนืด)
ASM (9) 7	0.032	0.42	น้ำตาลอมเหลือง (หนืด)
ASM (9) 8	0.065	0.84	เหลือง
ASM (9) 9	0.070	0.92	เหลือง
ASM (9) 10	0.082	1.07	น้ำตาลอมเหลือง
ASM (9) 11	0.407	5.30	เหลือง
ASM (9) 12	0.785	10.21	เหลือง
รวม	6.039		

จากการแยกสกัดสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดเมทานอลจำนวน 169.580 กรัม จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม พบส่วนของสารสกัดที่เกิดผลึก และนำมาทำการแยกต่อเพื่อหาสารบริสุทธิ์โดยใช้วิธี Preparative thin-layer chromatography (PLC) ดังนี้

### ผลึกผสม ASM ลำดับที่ 301–306

ผลึกผสม ASM ลำดับที่ 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม ได้การสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยวิธีข้างต้น มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว แยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม ซึ่งอยู่ในส่วนของสารสกัดลำดับที่ ASM 10 โดยอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 85 ของสารละลายไดคลอโรมีเทน กับร้อยละ 15 ของสารละลายเมทานอล วัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วงนี้ใช้สารละลายทั้งหมด 5300 มิลลิลิตร แบ่งเป็นสารละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 4,505 มิลลิลิตร และเมทานอล 795 มิลลิลิตร และในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 80 ของสารละลายไดคลอโรมีเทน กับร้อยละ 20 ของสารละลายเมทานอล วัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วงนี้ใช้สารละลายทั้งหมด 2600 มิลลิลิตร แบ่งเป็นสารละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 2080 มิลลิลิตร และเมทานอล 520 มิลลิลิตร ผลึกผสม ASM ลำดับที่ 301–306 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 80 ของสารละลายไดคลอโรมีเทนกับร้อยละ 20 ของสารละลายเมทานอล จากนั้นจึงนำผลึกผสม ASM ลำดับที่ 301–306 นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมผลึกของสารสกัดมาทำการแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์โดยใช้วิธี Preparative Thin-layer Chromatography (PLC) โดยทำการหาวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารระหว่างสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 8.2 : 1.8 บนแผ่น TLC จากนั้นนำผลึกผสม ASM ลำดับที่ 301–306 มาละลายด้วยสารละลายเมทานอลเพียงเล็กน้อย แล้วนำมาโหลดสารลงในแผ่น PLC ที่เตรียมไว้ ดังภาพที่ 40 ร่อนสารละลายแห้งพอประมาณจึงนำแผ่น PLC ไปลงในอ่างที่มีอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 8.2 : 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น PLC ดังภาพที่ 41 ผลจากการทำ PLC จะได้ส่วนของสารสกัดทั้งหมด 4 ส่วน คือ ASM F 1 (301–306) – ASM F 4 (301–306) และชุดแต่ละส่วนออกมาแล้วละลายด้วยสารละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร กรองแล้วนำไปประเหยเอาสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน แล้วนำมาตรวจสอบด้วยแผ่น TLC ดังภาพที่ 42 ตารางที่ 45





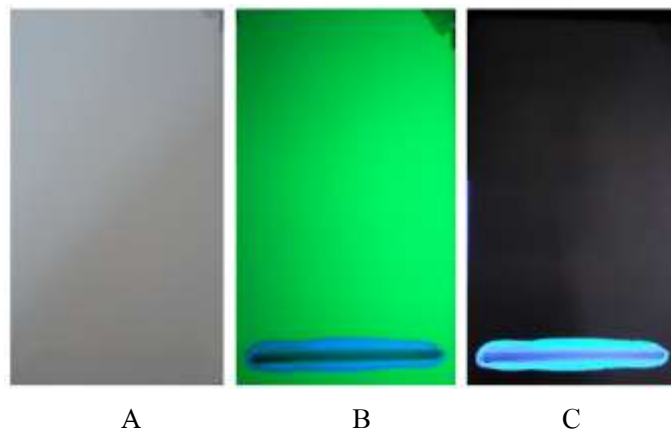
**ภาพที่ 42** PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม จากสารสกัดเมทานอล จำนวน 169.580 กรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี ในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub> วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, A-2, B-1, B-2 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (8.2 : 1.8) A-1, A-2 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร B-1, B-2 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

**ตารางที่ 46** น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ ASM ลำดับที่ 301–306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม ที่แยกสารสกัดเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และแยกต่อด้วยวิธี PLC

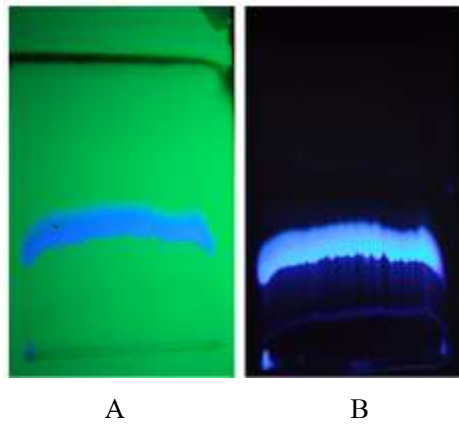
ผลิตภัณฑ์ของสารสกัด	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ร้อยละของสารสกัด (% Yield)	ลักษณะของสารสกัด
F (301–306) เริ่มต้น	0.022	17.51	เหลือง
F 1 (301–306)	0.008	6.54	ขาว
F 2 (301–306)	0.007	57.80	ขาว
F 3 (301–306)	0.075	57.80	ขาว
F 4 (301–306)	0.004	3.50	ขาว
รวม	0.1288		



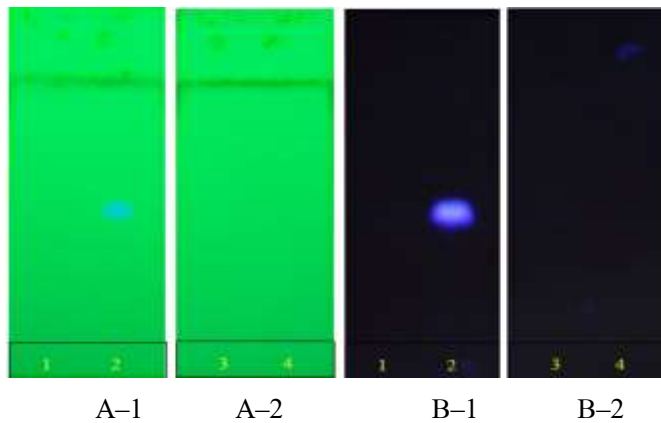
จากภาพที่ 42 พบว่าสาร ASM F 3 (301–306) จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม เป็นสารที่น่าสนใจ จึงนำไปแยกต่อด้วยวิธี PLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 85 : 15 มิลลิลิตร ดังภาพที่ 43 จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น PLC ดังภาพที่ 44 ผลจากการทำ PLC จะได้ส่วนของสารสกัดทั้งหมด 4 ส่วน คือ ASM F 3–1 (301–306)–3–1 – ASM F 3–4 (301–306) แล้วนำมาตรวจสอบด้วยแผ่น TLC ดังภาพที่ 45 ตารางที่ 46



**ภาพที่ 43** PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารส่วนที่ ASM 10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่  
 A : แสงขาว  
 B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร  
 C : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



**ภาพที่ 44** PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวดูดซับ PLC วัฏภาคเคลื่อนที่ A, B คือ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (85 : 15) มิลลิลิตร  
A : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร      B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



**ภาพที่ 45** TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ลำดับที่ ASM (301–306)–3 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัด ส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub> วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, A-2, B-1, B-2 คือ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (8.5 : 1.5)  
A-1, A-2 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร  
B-1, B-2 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

ตารางที่ 47 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ผสม F 3 (301–306) จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม  
ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี PLC

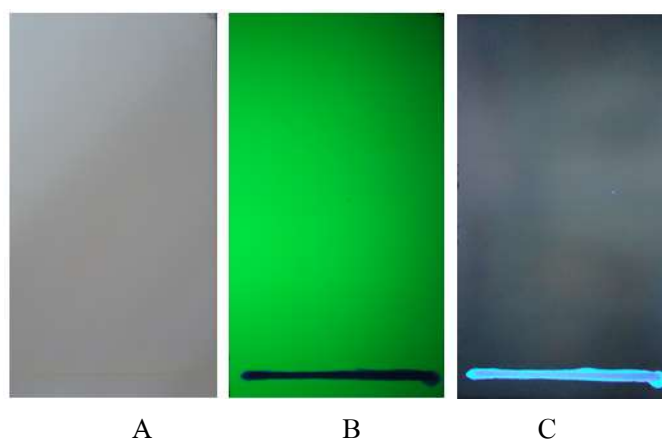
ผลิตภัณฑ์ของสารสกัด	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ร้อยละของสารสกัด (% Yield)	ลักษณะของสารสกัด
F 3 (301–306) เริ่มต้น	0.0042	5.53	เหลือง
F 3-1 (301–306)	0.0130	17.12	ขาว
F 3-2 (301–306)	0.0276	36.36	ขาว
F 3-3 (301–306)	0.0152	20.02	รูปเข็มขาว
F 3-4 (301–306)	0.0036	4.74	ขาว
รวม	0.0636		

จากภาพที่ 45 พบว่าสาร ASM F 3- 2 (301–306) จำนวน 0.0152 มิลลิกรัม เป็นสารที่น่าสนใจ จึงนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค NMR

#### ผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 308—311

ผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ที่ได้รับการสกัดแยกด้วยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยวิธีข้างต้น มีลักษณะเป็นผลิตภัณฑ์สีขาว แยกได้จากใบกษฤตนาจำนวน 10.50 กิโลกรัม ซึ่งอยู่ในส่วนของสารสกัดลำดับที่ ASM 10 โดยอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 85 ของสารละลายไดคลอโรมีเทน กับร้อยละ 15 ของสารละลายเมทานอล วัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วงนี้ใช้สารละลายทั้งหมด 5300 มิลลิลิตร แบ่งเป็นสารละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 4505 มิลลิลิตร และเมทานอล 795 มิลลิลิตร และในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 80 ของสารละลายไดคลอโรมีเทน กับร้อยละ 20 ของสารละลายเมทานอล วัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วงนี้ใช้สารละลายทั้งหมด 2600 มิลลิลิตร แบ่งเป็นสารละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 2080 มิลลิลิตร และเมทานอล 520 มิลลิลิตร ผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 308–311 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 80 ของสารละลายไดคลอโรมีเทน กับร้อยละ 20 ของสารละลายเมทานอล จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 308–311 มาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมสารสกัดมาทำการแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์โดยใช้วิธี PLC โดยทำการหาวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 8.5 : 1.5 บนแผ่น TLC จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 308–311 มาละลายด้วยสารละลายเมทานอลเพียงเล็กน้อย แล้ว

นำมาโหลดสารลงในแผ่น PLC ที่เตรียมไว้ ดังภาพที่ 46 รองนสารละลายแห้งพอประมาณจึงนำแผ่น PLC ไปลงในแท่งที่มีอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายไดโครอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 85 : 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น PLC ดังภาพที่ 47 ผลจากการทำ PLC จะได้ส่วนของสารสกัดทั้งหมด 3 ส่วน คือ ASM F 1(308–311) – ASM F 3 (308–311) และชุดแต่ละส่วนออกมาแล้วละลายด้วยสารละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร กรองแล้วนำไปประเหยเอาสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน แล้วนำมาตรวจสอบด้วยแผ่น TLC ดังภาพที่ 48 ตารางที่ 48

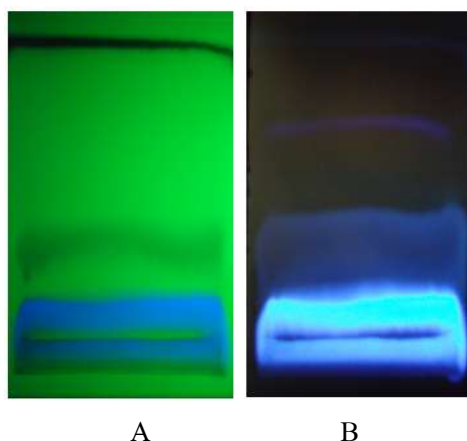


ภาพที่ 46 PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ผสม ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 2–10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่

A : แสงขาว

B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

C : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



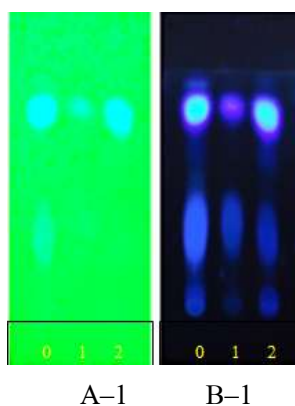
**ภาพที่ 47** PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ผสม ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่

ตัวดูดซับ PLC

วัฏภาคเคลื่อนที่ A, B คือ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (85 : 15) มิลลิลิตร

A : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



**ภาพที่ 48** TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ผสม ASM 308–311 จำนวน 0.0730 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่

ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub>

วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, A-2, B-1, B-2 คือ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (8.5 : 1.5)

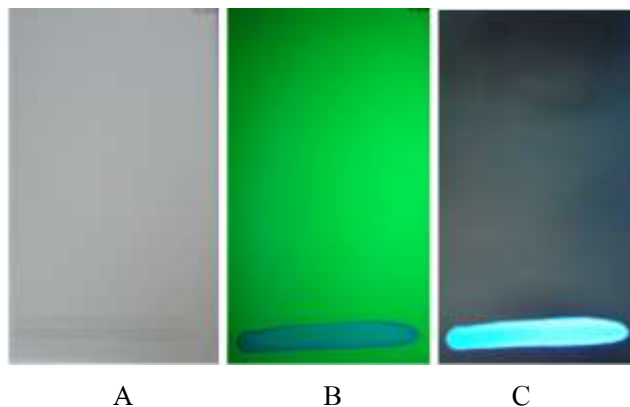
A-1 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

B-1 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

ตารางที่ 48 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ผสม ASM ลำดับที่ 308–311 จำนวน 0.730 มิลลิกรัม ที่แยกได้จากสารสกัดเมทานอลจำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี และแยกต่อด้วยวิธี PLC

ผลิตภัณฑ์ของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (% Yield)	ลักษณะของสารสกัด
F (308–311) เริ่มต้น	0.0050	6.84	เหลือง
F 1 (308–311)	0.0240	57.53	ขาว
F 2 (308–311)	0.0430	58.90	ขาว
รวม	0.0720		

จากภาพที่ 43 พบว่า ASM F 2 (308–311) จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม เป็นสารที่น่าสนใจในแต่สารยังไม่สะอาดจึงนำไปแยกต่อด้วยวิธี PLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายไดโครอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 80 : 20 มิลลิลิตร ดังภาพที่ 49 จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น PLC ดังภาพที่ 50 ผลจากการทำ PLC จะได้ส่วนของสารสกัดทั้งหมด 6 ส่วน คือ ASMF 2–1 (308–311) – ASMF 2–6 (308–311) แล้วนำมาตรวจสอบด้วยแผ่น TLC ดังภาพที่ 51 ตารางที่ 48 ปรากฏว่าจุดที่ 4 คือส่วนของสารสกัด ASMF 2–4 (308–311) จำนวน 0.0055 มิลลิกรัม เป็นสารที่น่าสนใจ จึงนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค NMR

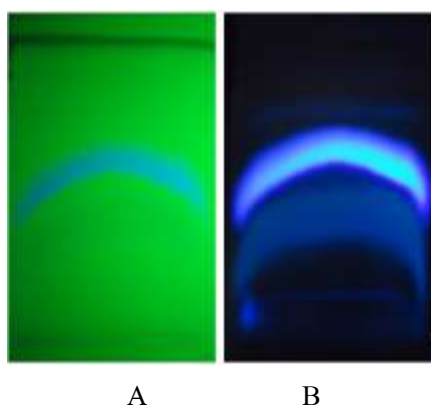


ภาพที่ 49 PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ผสม ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 ก่อนดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่

A : แสงขาว

B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

C : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



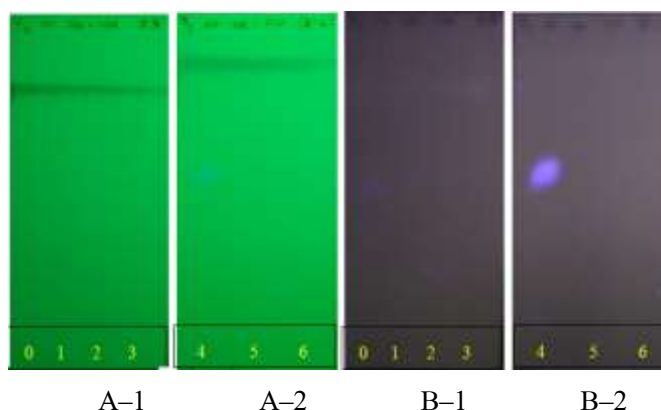
ภาพที่ 50 PLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ผสม ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่

ตัวดูดซับ PLC

วัฏภาคเคลื่อนที่ A, B คือ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (85 : 15) มิลลิลิตร

A : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



ภาพที่ 51 TLC โครมาโตแกรม ของผลิตภัณฑ์ ASM (308–311)–3 จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 10 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่ ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub> วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, A-2, B-1, B-2 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (8.5 : 1.5) A-1, A-2 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร B-1, B-2 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

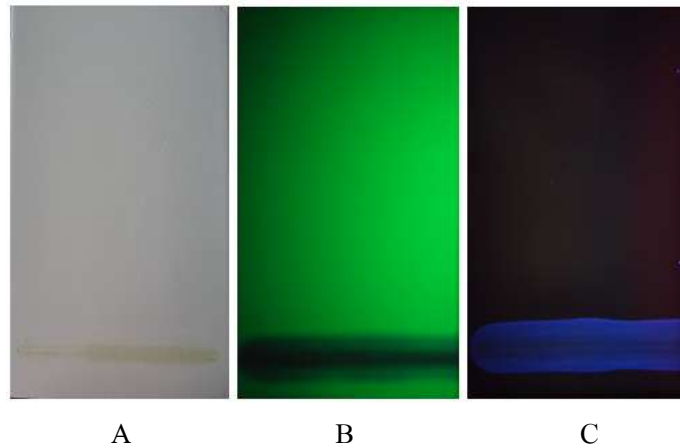
ตารางที่ 49 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ F 2 (308–311) จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม ที่ได้จากการแยกด้วยวิธี PLC

ผลิตภัณฑ์ของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (% Yield)	ลักษณะของสารสกัด
F (308–311) เริ่มต้น	0.0044	10.23	เหลือง
F 2–1 (308–311)	0.0043	10.00	ขาว
F 2–2 (308–311)	0.0034	5.58	ขาว
F 2–3 (308–311)	0.0023	3.02	ขาว
F 2–4 (308–311)	0.0055	12.79	ขาว
F 2–5 (308–311)	0.0023	5.34	ขาว
F 2–6 (308–311)	0.0027	6.27	ขาว
รวม	0.0249		



### ผลึก ASM ลำดับที่ 334-2

ผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ที่ได้รับการสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีดังวิธีข้างต้น มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว แยกได้จากโภกษฤดาจำนวน 10.50 กิโลกรัม ซึ่งอยู่ในส่วนของสารสกัดลำดับที่ ASM 11 โดยอยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 80 ของสารละลายไดคลอโรมีเทน กับร้อยละ 20 ของสารละลายเมทานอล วัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วงนี้ใช้สารละลายทั้งหมด 5100 มิลลิลิตร แบ่งเป็นสารละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 4080 มิลลิลิตร และเมทานอล 1020 มิลลิลิตร ผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 อยู่ในช่วงวัฏภาคเคลื่อนที่ร้อยละ 80 ของสารละลายไดคลอโรมีเทน กับร้อยละ 20 ของสารละลายเมทานอล จากนั้นจึงนำผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 นำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น TLC และค่า  $R_f$  เพื่อรวมผลึกของสารสกัดมาทำการแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์โดยใช้วิธี PLC โดยทำการหาวัฏภาคเคลื่อนที่ของสารระหว่างสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 8.5 : 1.5 บนแผ่น TLC จากนั้นนำผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 มาละลายด้วยสารละลายเมทานอล เพียงเล็กน้อย แล้วนำมาโหลดสารลงในแผ่น PLC ที่เตรียมไว้ ดังภาพที่ 52 ร่อนสารละลายแห้งพอประมาณจึงนำแผ่น PLC ไปลงในแท่งที่มีอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 8.5 : 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น PLC ดังภาพที่ 53 ผลจากการทำ PLC จะได้ส่วนของสารสกัดทั้งหมด 3 ส่วน คือ ASM F 1 (334-2) – ASM F 3 (334-2) และชุดแต่ละส่วนออกมาแล้วละลายด้วยสารละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร กรองแล้วนำไปประเหยเอาสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน แล้วนำมาตรวจสอบด้วยแผ่น TLC ดังภาพที่ 54 ตารางที่ 49 ปรากฏว่าจุดที่ 2 คือส่วนของสารสกัด ASM F 2 (334-2) จำนวน 0.0168 มิลลิกรัม เป็นสารที่น่าสนใจ จึงนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค NMR

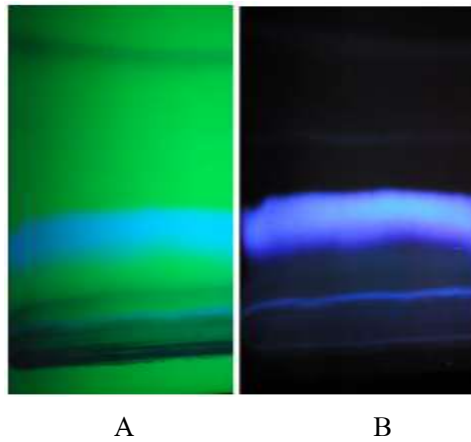


ภาพที่ 52 PLC โครมาโตแกรม ของผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 ก่อนดูดซับไว้ภูภาคเคลื่อนที่

A : แสงขาว

B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

C : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



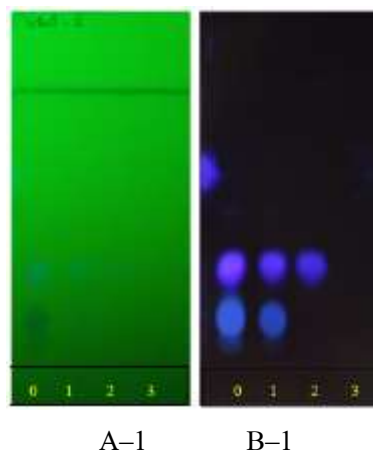
ภาพที่ 53 PLC โครมาโตแกรม ของผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับไว้ภูภาคเคลื่อนที่

ตัวดูดซับ PLC

วัฏภาคเคลื่อนที่ A, B คือ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (85 : 15) มิลลิลิตร

A : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

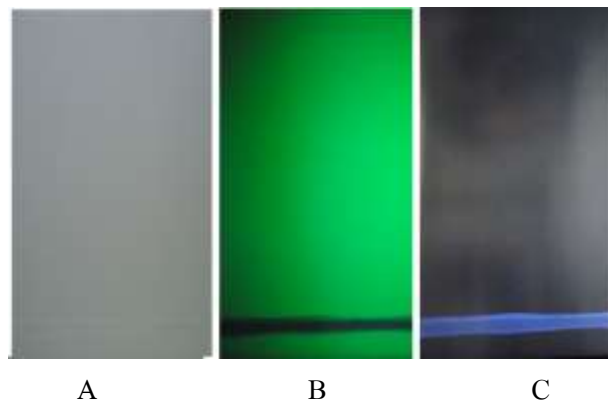


**ภาพที่ 54** TLC โครมาโตแกรม ของผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่  
ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub>  
วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, A-2, B-1, B-2 คือ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (8.5 : 1.5)  
A-1 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร B-1 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

**ตารางที่ 50** น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลึกผสม ASM ลำดับที่ 334-2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม ที่แยกได้จากสารสกัดเมทาอนล จำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และแยกต่อด้วยวิธี PLC

ผลึกของสารสกัด	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละของสารสกัด (% Yield)	ลักษณะของสารสกัด
F (334-2) เริ่มต้น	0.0180	35.15	เหลือง
F 1 (334-2)	0.0136	26.56	ขาว
F 2 (334-2)	0.0168	32.81	ขาว
F 3 (334-2)	0.0025	4.88	ขาว
รวม	0.0509		

จากการแยกสารด้วยวิธี PLC ในครั้งแรกของ ผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 เริ่มต้น จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ในส่วนเริ่มต้นหลังจากละลายสารออกมาแล้ว ปรากฏว่าสารเกิดผลึกรูปเข็มสีขาว ขึ้นอีกครั้ง จึงนำสารมาทำการแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์โดยใช้วิธี PLC โดยทำการหาภูมิภาคเคลื่อนที่ของสารระหว่างสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 8.5 : 1.5 บนแผ่น TLC จากนั้นนำผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 มาละลายด้วยสารละลายเมทานอล เพียงเล็กน้อย แล้วนำมาไหลคสารลงในแผ่น PLC ที่เตรียมไว้ ดังภาพที่ 55 รอจนสารละลายแห้งพอประมาณจึงนำแผ่น PLC ไปส่งไปในแท่งที่มีอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ระหว่างสารละลายไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในอัตราส่วน 85 : 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร แล้วพิจารณาแถบที่ปรากฏบนแผ่น PLC ดังภาพที่ 56 ผลจากการทำ PLC จะมีส่วนของสารสกัดทั้งหมด 4 ส่วน คือ ASM F 1 (334-2) เริ่มต้น – ASM F 2 (334-2) เริ่มต้น และชุดแต่ละส่วนออกมาแล้วละลายด้วยสารละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร กรองแล้วนำไประเหยเอาสารละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน แล้วนำมาตรวจสอบด้วยแผ่น TLC ดังภาพที่ 57 ตารางที่ 51 จากภาพที่ 57 ปรากฏว่าจุดที่ 4 คือส่วนของสารสกัด ASM F 4 (334-2) เริ่มต้น จำนวน 0.0052 มิลลิกรัม เป็นสารที่น่าสนใจ จึงนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค NMR

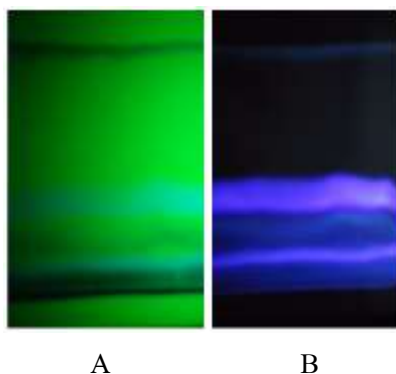


ภาพที่ 55 PLC โครมาโตแกรม ของผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 ก่อนดูดซับภูมิภาคเคลื่อนที่

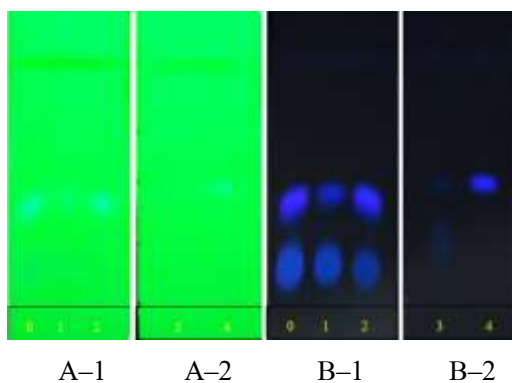
A : แสงขาว

B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร

C : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



ภาพที่ 56 PLC โครมาโตแกรม ของผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่  
ตัวดูดซับ PLC  
วัฏภาคเคลื่อนที่ A, B คือ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (85 : 15) มิลลิลิตร  
A : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร      B : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร



ภาพที่ 57 TLC โครมาโตแกรม ของผลึก ASM ลำดับที่ 334-2 จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ได้จากการสกัดแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนของสารสกัดส่วนที่ ASM 11 หลังดูดซับวัฏภาคเคลื่อนที่  
ตัวดูดซับ Silica gel F<sub>254</sub>  
วัฏภาคเคลื่อนที่ A-1, A-2, B-1, B-2 คือ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (8.2 : 1.8)  
A-1 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 254 นาโนเมตร      B-1 : ส่องดูภายใต้ ยูวี 365 นาโนเมตร

ตารางที่ 51 น้ำหนักและลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ผสม ASM F (334-2) เริ่มต้น จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม ที่แยกได้จากสารสกัดเมทาอนล จำนวน 169.58 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และแยกต่อด้วยวิธี PLC

ผลิตภัณฑ์ของสารสกัด	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ร้อยละของสารสกัด (% Yield)	ลักษณะของสารสกัด
F (334-2) เริ่มต้น	0.0025	13.88	เหลือง
F 1 (334-2) เริ่มต้น	0.0057	31.66	รูปเข็มขาว
F 2 (334-2) เริ่มต้น	0.0025	19.44	ขาว
F 3 (334-2) เริ่มต้น	0.0016	8.88	ขาว
F 3 (334-2) เริ่มต้น	0.0052	28.88	เหลือง
รวม	0.0175		

#### ผลการทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

จากการศึกษาการทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์ โดยวิธีของ Aluminum Chloride Colorimetric Method ในผลิตภัณฑ์ของสารสกัดลำดับที่ 319-1 และ 334-2 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม พบว่าให้ผลดังตารางที่ 52 จะเห็นได้ว่า เมื่อนำสารในหลอดที่ 1 และ 2 มาเติมด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก เข้มข้น จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติมแมกนีเซียม จำนวน 1-2 แผ่น ปรากฏว่าสารละลายเกิดการเปลี่ยนสีจากขาวขุ่น เป็น สีเหลืองใส ดังภาพที่ 57 และ 58 จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่น จำนวน 2 มิลลิลิตร และสารละลาย Octyl alcohol จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปล่อยให้เกิดการแยกชั้น พบว่าสารละลายมีการแยกชั้นระหว่างชั้นสารละลาย Octyl alcohol กับชั้นน้ำ ปรากฏว่าในชั้นของสารละลาย Octyl alcohol ที่อยู่ชั้นบนสุด ให้สีส้ม ในผลิตภัณฑ์ของสารสกัดลำดับที่ 319-1 และ 334-2 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม ดังภาพที่ 58 ง และ 59 ง ตามลำดับ

ตารางที่ 52 ผลการทดสอบหาสารฟลาโวนในผลึกของสารสกัดลำดับที่ 319 และ 334-2 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม

ลำดับ	การเกิดสี		
	ชั้น Octyl alcohol	ชั้นน้ำ	
ผลึก 319-1	1	สีส้ม	ใส
	2	สีส้ม	ใส
	Blank control		ขาวขุ่น
ผลึก 334-2	1	สีส้ม	ใส
	2	สีส้ม	ใส
	Blank control		ขาวขุ่น

ก



ข



ผลึก 319-1 ที่ละลายด้วย 80% ethanol

Conc.HCl 0.5 mL + Mn 1-2แผ่น

ค



ง

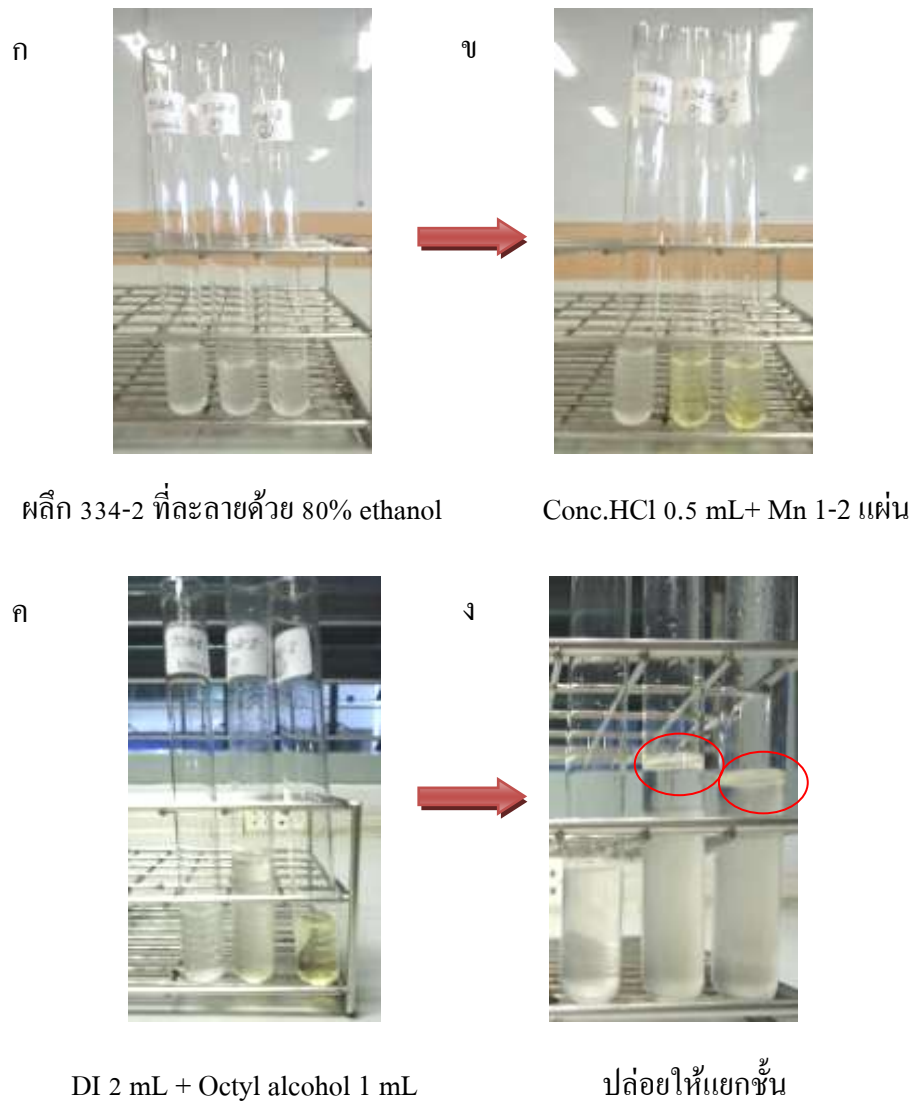


DI 2 mL + Octyl alcohol 1 mL

ปล่อยให้แยกชั้น

ภาพที่ 58 ผลการทดสอบหาสารฟลาโวน ในผลึกของสารสกัดลำดับที่ 319 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม





ภาพที่ 59 ผลการทดสอบหาสารฟลาโวน ในผลึกของสารสกัดลำดับที่ 334-2 ที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม

จากภาพที่ 58 ง และ 59 ง ของผลึก 319-1 และ 334-2 ในชั้นของสารละลาย Octyl alcohol ที่อยู่ชั้นบนสุดให้สีส้มของสารละลาย จะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าผลึกของสารสกัดลำดับที่ 319-1 และ 334-2 ที่สกัดแยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัมโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เป็นสารในกลุ่ม Flavone ชนิด Aglycone

## บทที่ 5

### สรุปอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการแยกสารสำคัญของสารสกัดจากใบกฤษณาด้วยวิธีซีเควนเชียล ซึ่งเป็น การแยกส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ด้านเอนไซม์ไคเพปติลเพปติเดสสี่ (DPP-4) โดยวิธีคอลัมน์โครมา โทกราฟี ที่ทดสอบส่วนสกัดออกฤทธิ์ด้านเอนไซม์ DPP-4 จากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* โดยแสดงผลการศึกษาดังนี้

1. จากการศึกษากัดใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* จำนวน 3 กิโลกรัม ที่สกัดด้วยวิธีซีเควนเชียล (Sequential extraction) ด้วยสารละลาย เฮกเซน ไคคลอโร มีเทน และ เมทานอล ตามลำดับ พบว่าสารสกัดใบกฤษณาในตัวทำละลายเมทานอลให้ร้อยละของ สารสกัด สูงที่สุดคือร้อยละ 5.65 และเมื่อนำมาทดสอบสมบัติการยับยั้งเบาหวานด้วยเอนไซม์ DPP-4 พบว่าในสารสกัดเมทานอลให้ค่าการยับยั้งมากที่สุดร้อยละ 19.24

2. จากการเลือกสารสกัดในส่วนของสารสกัดเมทานอล ที่มีสมบัติการยับยั้งเบาหวานด้วย เอนไซม์ DPP-4 มาทำการศึกษากัดสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อศึกษาส่วนสกัด ออกฤทธิ์ด้านเอนไซม์ DPP-4 จากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* พบว่า

ส่วนสกัด ASM 4 ถึง ASM 10 ที่แยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 3.0 กิโลกรัม จากส่วนสกัด เมทานอล จำนวน 158.48 กรัม จำนวน 0.00121 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการยับยั้ง เอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 72.80 เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

ส่วนสกัด ASM (7-10) 3 ถึง ASM (7-10) 10 จากส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 158.48 กรัม ในส่วนสกัดผสมลำดับที่ ASM 7-10 จำนวน 25.02 กรัม จำนวน 0.00129 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 96.76 เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

ส่วนสกัด ASM 2-1 ถึง ASM 2-7 ที่แยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม ในส่วน สกัดเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม จำนวน 0.00127 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการ ยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 54.14 เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

ส่วนสกัด ASM 2 (11) 1 ถึง ASM 2 (11) 10 จากส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม ในส่วนสกัดลำดับที่ ASM 2-11 จำนวน 35 กรัม จำนวน 0.00121 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 77.46 เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

ส่วนสกัด ASM 2 (8) ถึง ASM 2 (8) 7 ที่จากส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม ในส่วนสกัดลำดับที่ ASM 2-8 จำนวน 2.50 กรัม จำนวน 0.00121 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 48.81 เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71 และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี NMR พบว่าเป็นสารในกลุ่ม แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Alkaloid Flavonoid glycosides)

3. จากการแยกสารสกัดโดยใช้เทคนิค Preparative Thin-layer Chromatography (PLC) เพื่อหาสารบริสุทธิ์มาศึกษาสูตรโครงสร้างของสารโดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าผลิตภัณฑ์ F 3-2 (301-306), F 2-4 (308-311) และผลิตภัณฑ์ F 3 (334-2) เมื่อผ่านการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) พบว่าสารสกัดที่ได้น่าจะเป็นสารบริสุทธิ์และเมื่อทดสอบสมบัติการยับยั้งเบาหวานด้วยเอนไซม์ DPP-4 ของผลิตภัณฑ์ F 3-2 (301-306) และผลิตภัณฑ์ F 3 (334-2) จากส่วนเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 21.31 และ 38.46 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี NMR พบว่าเป็นสารในกลุ่ม แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Alkaloid flavonoid glycosides) และผลการทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์โดยวิธีของสารอลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride colorimetric method) ของผลิตภัณฑ์ 319-1 และ 334-2 ในชั้นของสารละลาย Octyl alcohol ที่อยู่ชั้นบนสุดให้สีส้มของสารละลาย ฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ของสารสกัดลำดับที่ 319-1 และ 334-2 ที่สกัดแยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เป็นสารในกลุ่ม Flavone ชนิด Aglycone

### อภิปรายผลการวิจัย

1. จากการศึกษาการสกัดใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* จำนวน 3 กิโลกรัม ที่สกัดด้วยวิธีซีเวนเชียล (Sequential extraction) ด้วยสารละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เมทานอล ตามลำดับ พบว่าสารสกัดใบกฤษณาในตัวทำละลายเมทานอลให้ร้อยละของสารสกัด สูงที่สุดคือร้อยละ 5.65 รองลงมาคือสารสกัดเฮกเซนคือร้อยละ 0.98 และพบว่าสารสกัด

ไดคลอโรมีเทนคือร้อยละ 0.25 และเมื่อนำมาทดสอบสมบัติการยับยั้งเบาหวานด้วยเอนไซม์ DPP-4 พบว่าในสารสกัดเมทานอลให้ค่าการยับยั้งมากที่สุดร้อยละ 19.24 รองลงมาคือสารสกัดไดคลอโรมีเทน ที่ร้อยละ 12.32 และสารสกัดเฮกเซน ที่ร้อยละ 9.18 ตามลำดับ

2. จากการเลือกสารสกัดในส่วนของสารสกัดเมทานอล ที่มีสมบัติการยับยั้งเบาหวานด้วยเอนไซม์ DPP-4 มาทำการศึกษาการแยกสกัดสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อศึกษาส่วนสกัดออกฤทธิ์ด้านเอนไซม์ DPP-4 จากใบกฤษณาสายพันธุ์ *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* พบว่า

ส่วนสกัด ASM 4, ASM 7, ASM 8, ASM 9, ASM 10 ที่แยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 3.0 กิโลกรัม จากการแยกในส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 158.48 กรัม จำนวน 0.00121, 0.00184, 0.0157, 0.00122 , 0.00139 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 72.80, 12.24, 2.24, 9.36 และ 8.49 เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

ส่วนสกัด ASM (7-10) 2 ASM (7-10) 3, ASM (7-10) 4, ASM (7-10) 6, ASM (7-10) 6, ASM (7-10) 7, ASM (7-10) 9, ASM (7-10) 10 ที่ได้จากการแยกในส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 158.48 กรัม ในส่วนสกัดผสมลำดับที่ ASM 7-10 จำนวน 25.02 กรัม จำนวน 0.0124, 0.00129, 0.00140, 0.00153, 0.00153, 0.00129, 0.00164 , 0.00159 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 88.10, 96.76, 89.11, 77.01, 17.35 และ 32.27 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

ส่วนสกัด ASM 2-1, ASM 2-2, ASM 2-3, ASM 2-4, ASM 2-5, ASM 2-6, ASM 2-7 ที่แยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม ในส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม จำนวน 0.00112, 0.00134, 0.00157, 0.00131, 0.00127, 0.00163, 0.00152 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 27.96, 23.12, 27.96, 31.77, 54.14, 24.11 และ 12.02 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

ส่วนสกัด ASM 2 (11) 1, ASM 2 (11) 2 , ASM 2 (11) 3, ASM 2 (11) 4, ASM 2 (11) 5, ASM 2 (11) 6, ASM 2 (11) 7, ASM 2 (11) 8, ASM 2 (11) 9, ASM 2 (11) 10 ที่ได้จากการแยกในส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม ในส่วนสกัดลำดับที่ ASM 2-11 จำนวน 35 กรัม จำนวน 0.00139, 0.00121 , 0.00136, 0.00147, 0.00156, 0.00157, 0.00169, 0.00123, 0.00146, 0.00139 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 40.26, 77.46, 48.56,

52.52, 47.29, 66.96, 60.69, 30.97, 57.13 และ 48.76 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71

ส่วนสกัด ASM 2 (8) 2, ASM 2 (8) 3, ASM 2 (8) 4, ASM 2 (8) 6, ASM 2 (8) 7 ที่ได้จากการแยกในส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม ในส่วนสกัดลำดับที่ ASM 2-8 จำนวน 2.50 กรัม จำนวน 0.00121, 0.00125, 0.00132, 0.00142, 0.00127 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 48.81, 41.32, 28.49, 40.68 และ 20.17 เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71 และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง สเปกโทสโกปี NMR พบว่าเป็นสารในกลุ่ม แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Alkaloid Flavonoid glycosides)

3. จากการแยกสารสกัดโดยใช้เทคนิค Preparative Thin-layer Chromatography (PLC) เพื่อหาสารบริสุทธิ์มาศึกษาสูตรโครงสร้างของสารโดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี พบว่าผลิตภัณฑ์ลำดับที่ F 3-2 (301-306) จำนวน 0.0276 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ลำดับที่ F 2-4 (308-311) จำนวน 0.0055 มิลลิกรัม และผลิตภัณฑ์ F 3 (334-2) เริ่มต้น จำนวน 0.0052 มิลลิกรัม เมื่อผ่านการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) พบว่าสารสกัดที่ได้ น่าจะเป็นสารบริสุทธิ์และเมื่อทดสอบสมบัติการยับยั้งเบาหวานด้วยเอนไซม์ DPP-4 ของผลิตภัณฑ์ลำดับที่ F 3-2 (301-306) จำนวน 0.00068 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ที่แยกได้จากใบกฤษณาในส่วนเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 21.31 และผลิตภัณฑ์ F 3 (334-2) เริ่มต้น จำนวน 0.00032 มิลลิกรัม ที่ความเข้มข้น 500 ppb ที่แยกได้จากใบกฤษณาในส่วนเมทานอล จำนวน 169.58 กรัม ซึ่งให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 38.46 เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวาน (Januvia) ที่ความเข้มข้น 39.90 ppb ให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ DPP-4 ที่ร้อยละ 67.71 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทสโกปี NMR พบว่าเป็นสารในกลุ่ม แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Alkaloid flavonoid glycosides) และผลการทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์โดยวิธีของสารอลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride colorimetric method) ของผลิตภัณฑ์ 319-1 และ 334-2 ในชั้นของสารละลาย Octyl alcohol ที่อยู่ชั้นบนสุดให้สีส้มของสารละลาย ฉะนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ลำดับที่ 319-1 และ 334-2 ที่สกัดแยกได้จากใบกฤษณาจำนวน 11.50 กิโลกรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เป็นสารในกลุ่ม Flavone ชนิด Aglycone

### ข้อเสนอแนะในการวิจัย

จากการศึกษาถึงการแยกและสกัดสารในตัวทำละลายต่างๆ เพื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติในการต้านเบาหวานโดยใช้เอนไซม์ DPP-4 และเลือกสารสกัดเมทานอลที่แยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแต่ละส่วนนั้น สามารถที่จะนำไปศึกษาหาลักษณะประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์ต่อไปด้วยเครื่องมืออื่นๆ อาทิ เช่น NMR, IR และ MS เป็นต้น เพื่อให้ทราบว่าเป็นโครงสร้างสารประกอบชนิดใด ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากกฤษฎณาต่อไปได้อีก เนื่องจากในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด ทั้งยังมีสมุนไพรจำนวนมากที่ยังไม่ได้มีการศึกษาและวิจัยเพื่อหาสารประกอบเคมีที่มีสมบัติต่างๆ อีกมากมาย

## บรรณานุกรม

- กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม. (2552) รู้ทันเบาหวาน ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์  
<http://www.allied.tu.ac.th> ค้นเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2555
- เทพ หิมะทองคำและคณะ. (2543). ความรู้เรื่องเบาหวาน ฉบับสมบูรณ์. บริษัท วิทย์พัฒน์ จำกัด.  
กรุงเทพมหานคร.
- ธีราวุธ นามสว่าง. สารานุกรมเกี่ยวกับโรคเบาหวาน <http://teerawut-4111.blogspot.com> ค้นเมื่อวันที่ 14  
กันยายน พ.ศ. 2553
- บุญชู ศรีตุลาภักย์ (2553). แอลคาลอยด์ เคมีและการใช้ประโยชน์ทางยา. ภาควิชาเภสัชเวทและ  
เภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 2.
- บุญทิพย์ สิริธรรังสี (2539). ผู้ป่วยเบาหวาน: การดูแลตนเองแบบองค์รวม. ฝ่ายการพิมพ์ ศูนย์อาเยน  
มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เบญจวรรณ เกิดแพร่. งานวิจัย – งานวิชาการ การพยาบาลผู้ป่วยโรคเบาหวาน (กรณีศึกษา) ศูนย์  
อนามัยที่ 9 พิษณุโลก <http://hpc9.anamai.moph.go.th>. สืบค้นเมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม 2555
- ปิยนุช เจริญผล และ กาญจนา วงศ์กระจ่าง. (2553) การศึกษาระบบตัวทาละลายที่เหมาะสมของการ  
สกัดและปริมาณฟีนอลิกฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบดาวเรือง.  
รายงานสืบเนื่องจากการประชุมสัมมนาวิชาการนำเสนองานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ  
(Proceeding) เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 15 หน้า 77-86.
- นันทวัน บุญยะประภัสร์ และ อรณัฐ โชคชัยเจริญพร. (2539). สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (1). บริษัทประชาชน  
จำกัด. กรุงเทพมหานคร.
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. สำนักพิมพ์  
แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- โรคเบาหวาน สมุนไพรรักษาเบาหวาน (หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ วันที่ 9 สิงหาคม 2547 หน้า 10)  
<http://www.alternativecomplete.com>. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2555
- วันดี กฤษณพันธ์. (2536). ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์  
มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร.
- วิชัย เอกพลากร. (2547). บทที่ 1 บทนำ ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา  
[www.thapra.lib.su.ac.th](http://www.thapra.lib.su.ac.th). สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2555
- วิภพ สุทชนะ. (2556). ฤทธิ์ต้านมะเร็งของฟลาโวนอยด์: กลไกการออกฤทธิ์. ศรีนครินทร์เวชสาร  
หน้า 567-582.

- สมคิด สันวิจิตร. (2548). การสร้างการบริการสุขภาพสำหรับผู้ป่วยเบาหวานโดยการมีส่วนร่วมของชุมชน. วิทยานิพนธ์ปริญญาพยาบาลศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการพยาบาลชุมชน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุกัญญา แซ่ลี สุมาลี บุญศรี จินตนา ชัยสุโรจน์ และอรุณ จันทรคำ. (2555). ส่วนประกอบทางเคมีจากผักแขยง (*Limnophila aromatica* Merr). รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หน้า 72-79.
- สุริสา ศรีสุวรรณ อ้นศยา ท่อนโพธิ์ ประสงค์ สีหานาม. (2557) สารสกัดจากผลองุ่นป่า: พฤษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Wild Grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) Fruit Extracts: Phytochemical and Antioxidant Activities). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การประชุมวิชาการ มหาสารคามวิจัย ครั้งที่ 10 หน้า 373-382.
- อภิรักษ์ วงศ์ตันชัย. (2549) เภสัชภัณฑ์ใหม่ในการวินิจฉัยและแบ่งชนิดเบาหวาน (ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ ม.นเรศวร. <http://www.pha.nu.ac.th>. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2555
- อรัญญา มโนสร้อย ชลดา คำโน เพ็ญพรรณ ชันรินทร์ กาญจนา เรือนโต และ จีระเดช มโนสร้อย. (2554). การเตรียมสารสกัดและน้ำมันจากสมุนไพรไทยโดยใช้ Supercritical carbon dioxide fluid และการกลั่น. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หน้า 302-309.
- อารยา ทองผิว และคณะ. (2549) โครงการอบรมผู้ให้ความรู้โรคเบาหวานหลักสูตรพื้นฐาน พ.ศ. 2549 = ASEAN DIABETES EDUCATORS บรรณาธิการโดย วัลลา ตันตโยทัย และ สุนทรี นาคะเสถียร
- American Diabetes Association (2008). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. V. 31, pp. 55-60). <http://www.ncbi.nlm.nih>. สืบค้นเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2555
- American Diabetes Association. (2010). **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**, *Diabetes Care*. V. 33:1, pp. 6269. <http://www.care.diabetesjournals.org>. สืบค้นเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2555
- Aschner P, Kipnes MS, Lunceford JK, Sanchez M. (2006). **Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes**. *Diabetes Care*. V. 29, pp. 2692-2697

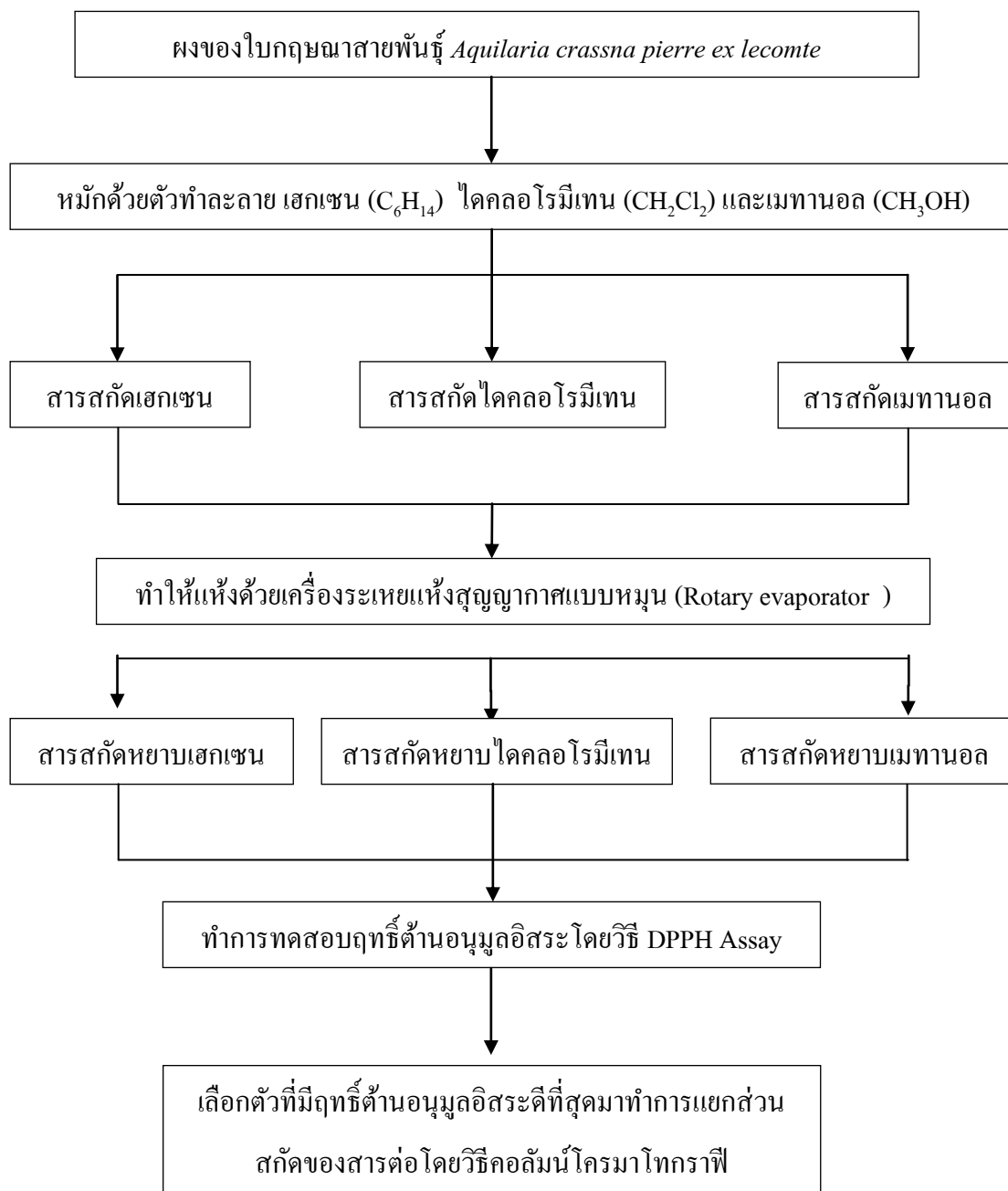


- Charbonnel B, Karasik A, Liu J. (2006). **Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone.** *Diabetes Care*. V. 29. pp. 2638-2643.
- Dooseop Kim, Jennifer E. Kowalchick, Scott D. Edmondson, Anthony Mastracchio, Jinyou Xu, George J. Eiermann, Barbara Leiting, Joseph K. Wu, KellyAnn D. Pryor, Reshma A. Patel, Huaibing He, Kathryn A. Lyons, Nancy A. Thornberry, Ann E. Weber (2007). **Triazolopiperazine-amides as dipeptidyl peptidase IV inhibitors: Close analogs of JANUVIA™ (sitagliptinphosphate)** Volume 17, Issue 12 pp. 3373–3377<sup>1</sup>
- Hanne B. Rasmussen, Sven Branner, Finn C. Wiberg, Nicolai Wagtmann. (2002). **Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD 26 in complex with a substrate analog.** *Nature Structural & Molecular Biology* 10, pp. 19 – 25.
- Hao-Fu Dai, Jun Liu, Yan-Bo Zeng, Zhuang Han, Hui Wang and Wen-Li Mei (2009). **A New 2-(2-Phenylethyl)Chromone from Chinese Eaglewood.** *Molecules*. 14, pp. 5165-5168<sup>1</sup>
- Hideaki Hara, Yasuaki Ise, Nobutaka Morimoto, Masamitsu Shimazawa, Koji Ichihashi, Masayoshi, Ohyama and Munekazu Inuma. (2008). **Laxative Effect of Agarwood Leaves and Its Mechanism.** *Biosci Biotechnol Biochem*. 72(2), pp. 335-345.
- Hiroaki Takemoto, Michiho Ito, Tomohiro Shiraki, Toru Yagura and Gisho Honda. (2008). **Sadative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their components.** *J. Nat. Med.* V. 62, pp. 41-46.
- Jie Feng, Xiu-Wei Yang, Ru-Feng Wang. (2011). **Bio-assay guided isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*.** *Phytochemistry*. V. 72, pp. 242–247.
- Julio Rosenstock, Michelle A. Ban, Sylvain Dejager, David Mills, Anja schweizer. (2007). **Comparison of Vildagliptin and Rosiglitazone Monotherapy in Patients with Type 2 Diabetes.** *DIABETES CARE*, V. 30:2, pp. 217-223.
- Masakazu Ishihara, Tomoyuki Tsuneya and Kenji Uneyama. (1993). **Fragrant sesquiterpenes from agarwood.** *Phytochemistry*. V. 33(5), pp. 1147-1155.
- Pamela Kushner and Mark Gorrell (2010). **DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes: Importance of Selective Enzyme Inhibition and Implications for Clinical.** *Use* Vol. 59, No. 02.

- Qing-Huang Wang Ke Peng Le-He Tan and Hao-Fu Dai (2010). **Aquilarin A, a New Benzenoid Derivative from the Fresh Stem of *Aquilaria sinensis***. *Molecules*. 15, pp. 4011-4016.
- Rosenstock J, , Brazg R, Andryuk PJ, Lu K, Stein P. (2006). **Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing pioglitazone therapy in patients with type 2 diabetes : a 24-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study**. *Clin Ther*. V. 28, pp. 1556-1568.
- Shu-Yuan Qi, Meng-Ling He, Li-Dong Lin, Chuan-Hai Zhang, Lan-Juan Hu & Hui-Zhen Zhang. (2005). **Production of 2-(2-phenylethyl) chromones in cell suspension cultures of *Aquilaria sinensis***. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 83, pp. 217–221
- Tenji Konishi, Takao Konoshima, Yasuo Shimada and Shiu Kiyosawa. (2002). **Six New 2-(2-Phenylethyl)chromones from Agarwood**. *Chem. Pharm. Bull*. 50(3), pp. 419-422
- Toru Yagura, Michiho Ito, Fumiyuki Kiuchi, Gisho Honda and Yasuo Shimada. (2003). **Four New 2-(2-Phenylethyl)chromone Derivatives from Withered Wood of *Aquilaria sinensis***. *Chem. Pharm. Bull*. V. 51(5), pp. 560-564.
- Toru Yagura, Naomi Shibayama, Michiho Ito, Fumiyuki Kiuchi and Gisho Honda. (2005). **Three novel diepoxy tetrahydrochromones from agarwood artificially produced by intentional**
- Yi Zhang, Weijun Wang, Jianjun Zhang. (2004). **Effects of novel anxiolytic 4-butyl-alpha-agarofuran on levels of monoamine neurotransmitters in rats**. *European Journal of Pharmacology*. V. 504, pp. 39-44

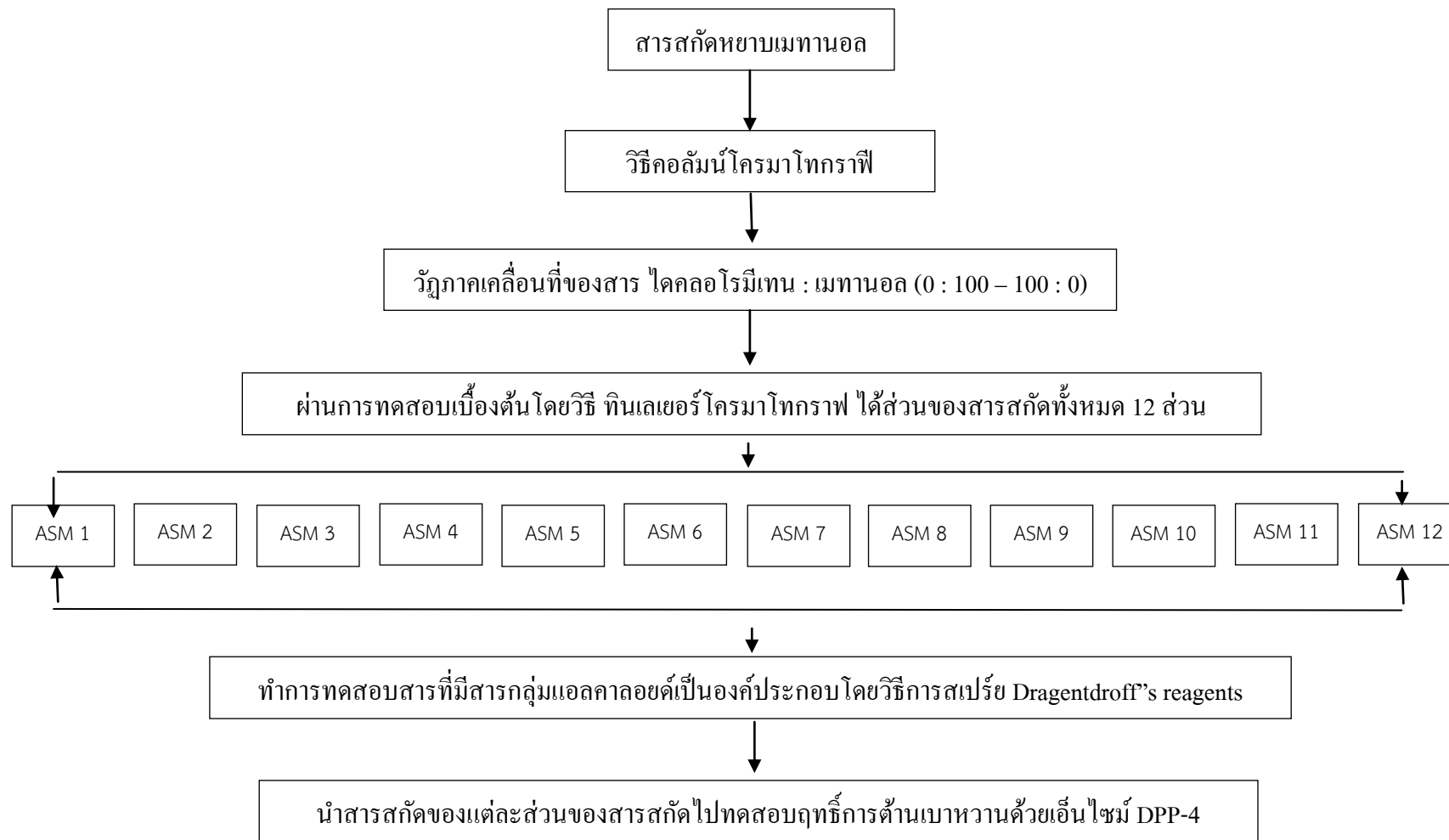
## ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**  
**การสกัดแยกสาร**

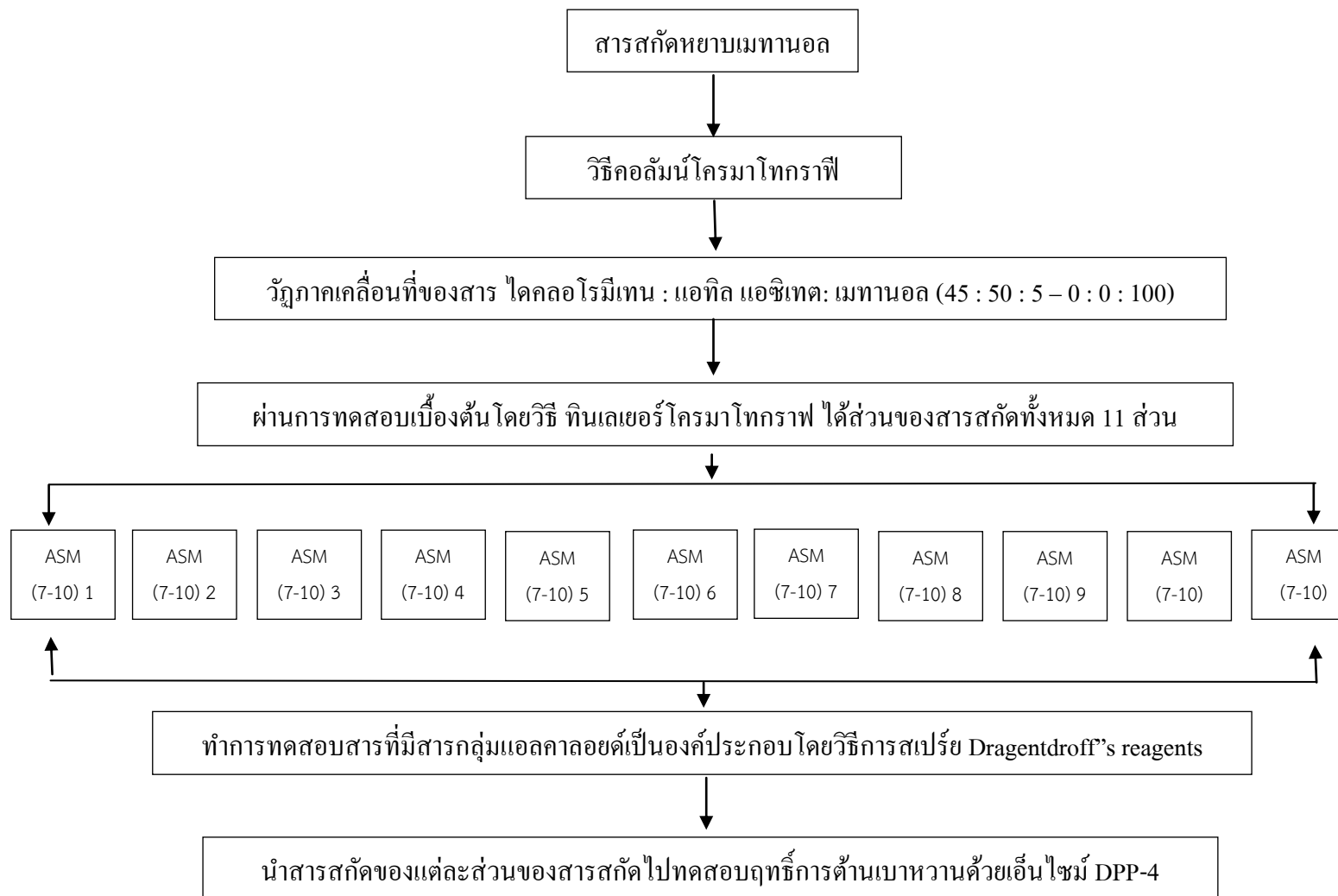


แผนภาพที่ 1 การหมักสกัดแยกสารจากใบของกฤษณาสายพันธุ์

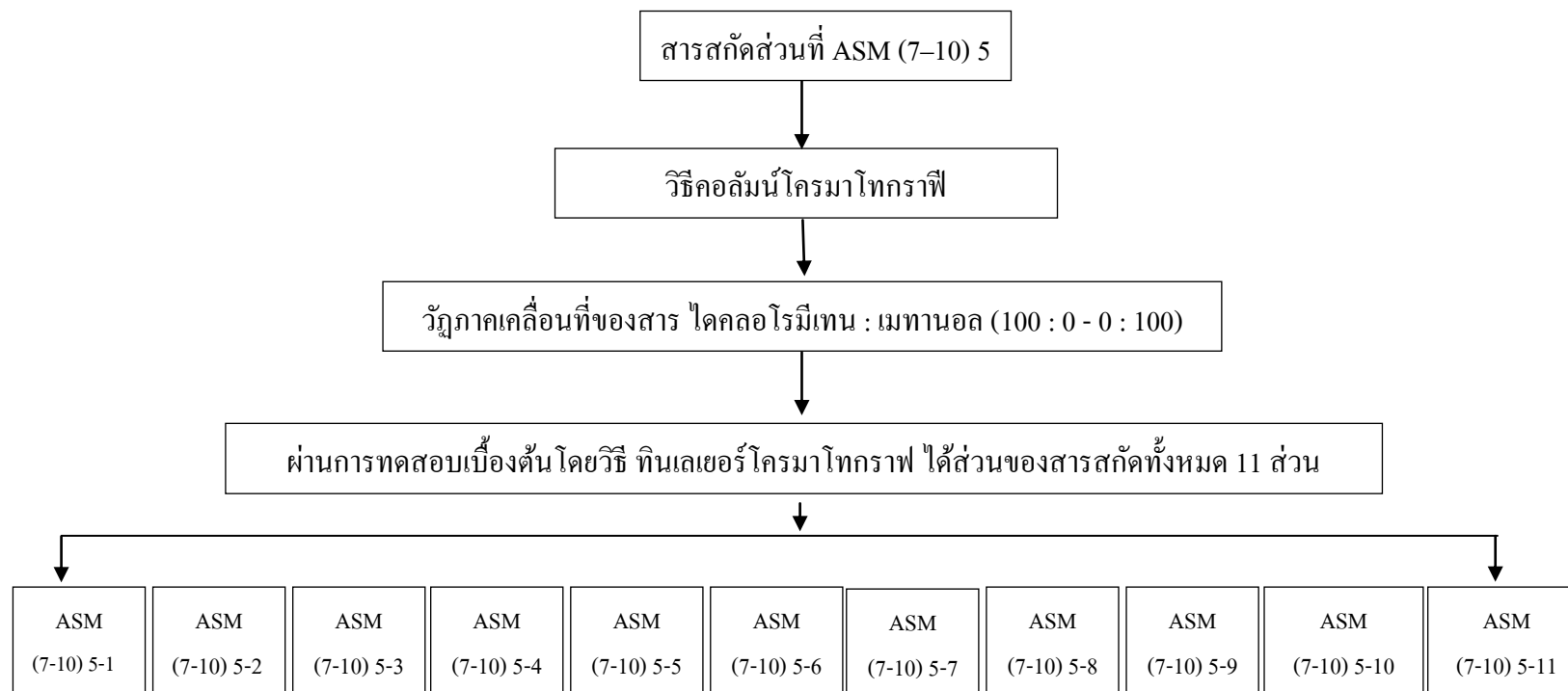
*Aquilaria crassna pierre ex lecomte*



แผนภาพที่ 2 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 158.480 กรัม

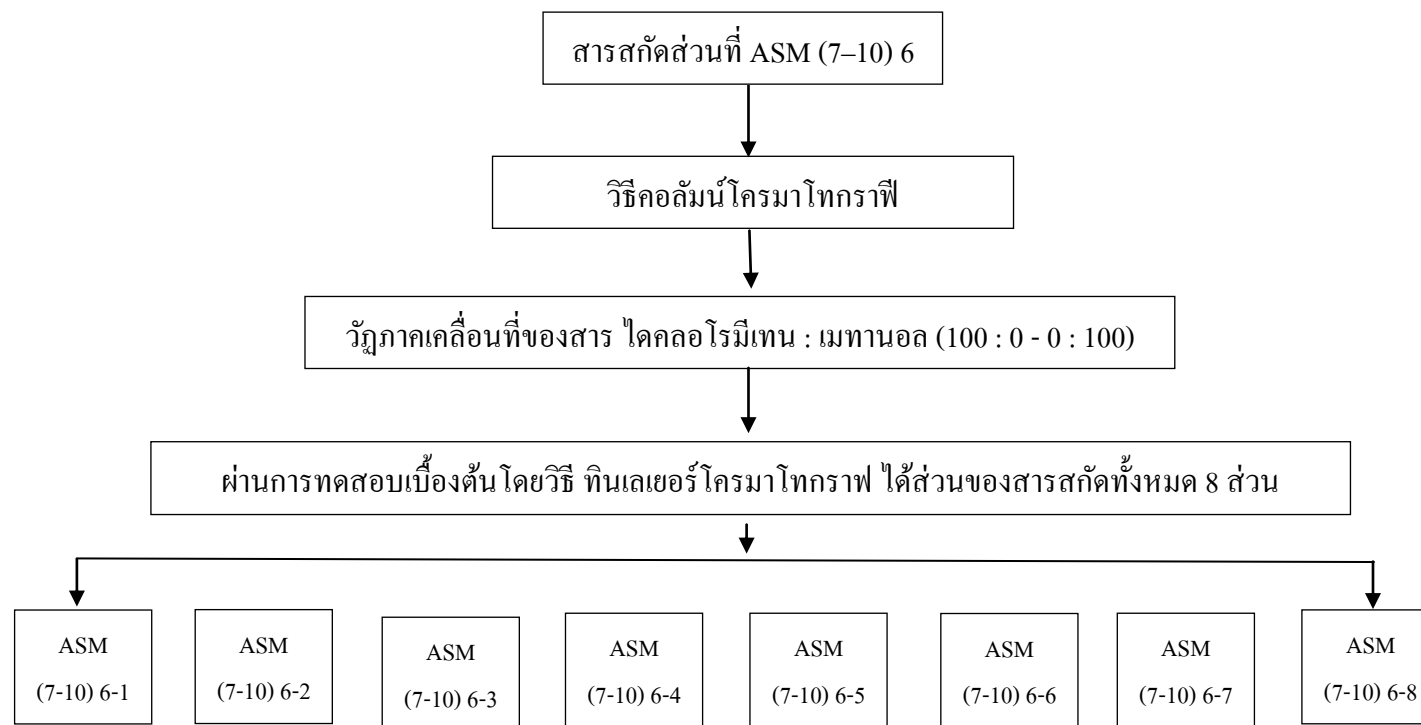


แผนภาพที่ 3 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดที่ จำนวน 25.0 กรัม

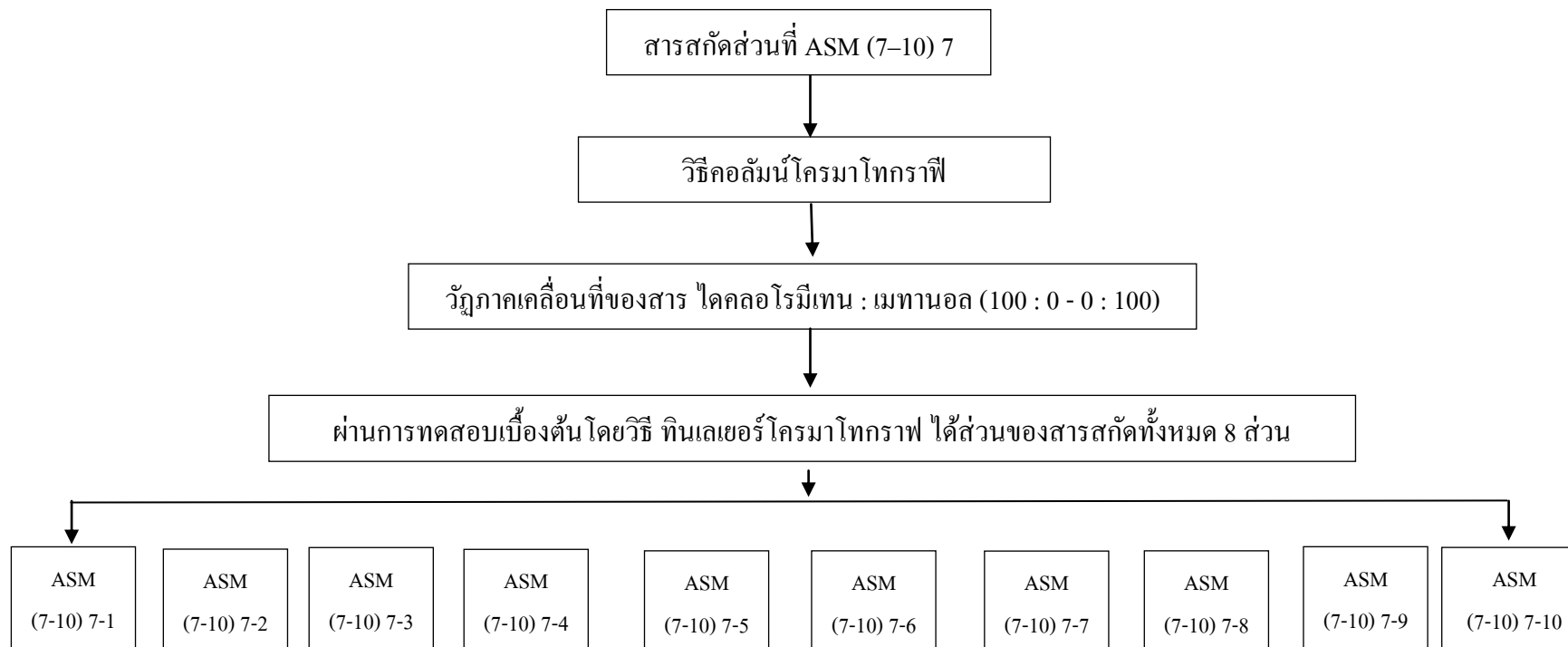


แผนภาพที่ 4 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดที่ ASM (7-10) 5 จำนวน 0.9420 กรัม

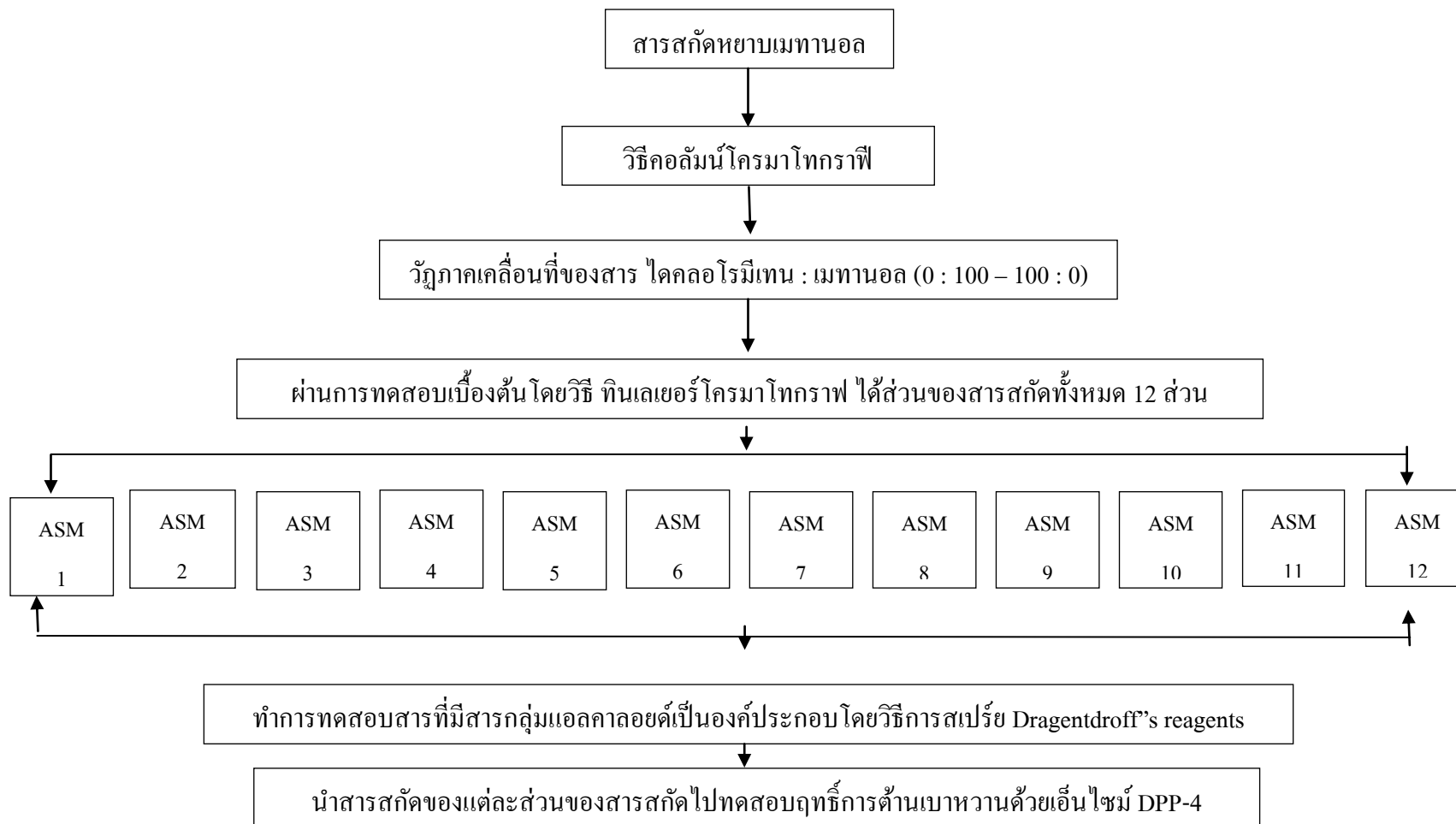




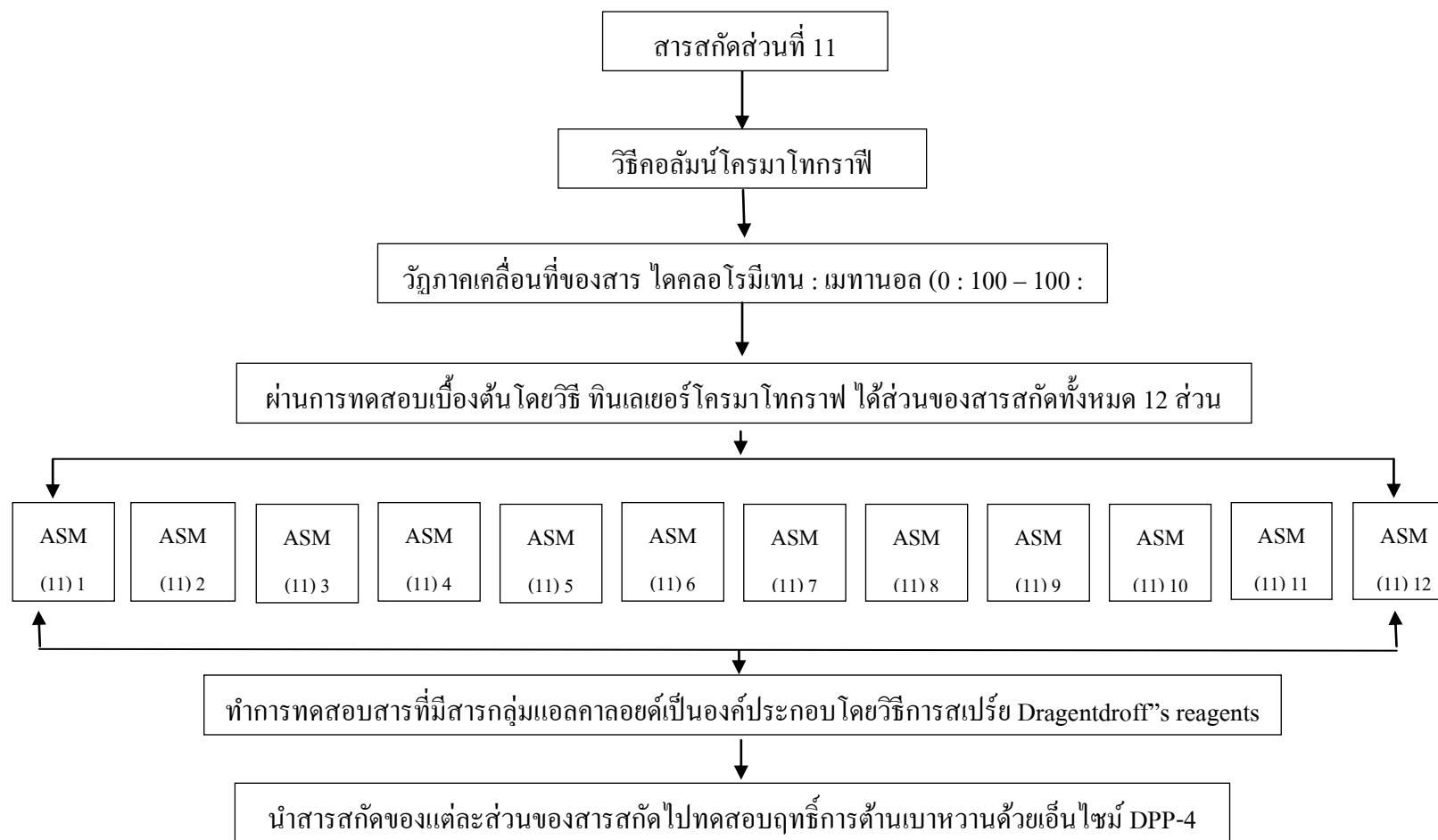
แผนภาพที่ 5 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดที่ ASM (7-10) 6 จำนวน 3.0590 กรัม



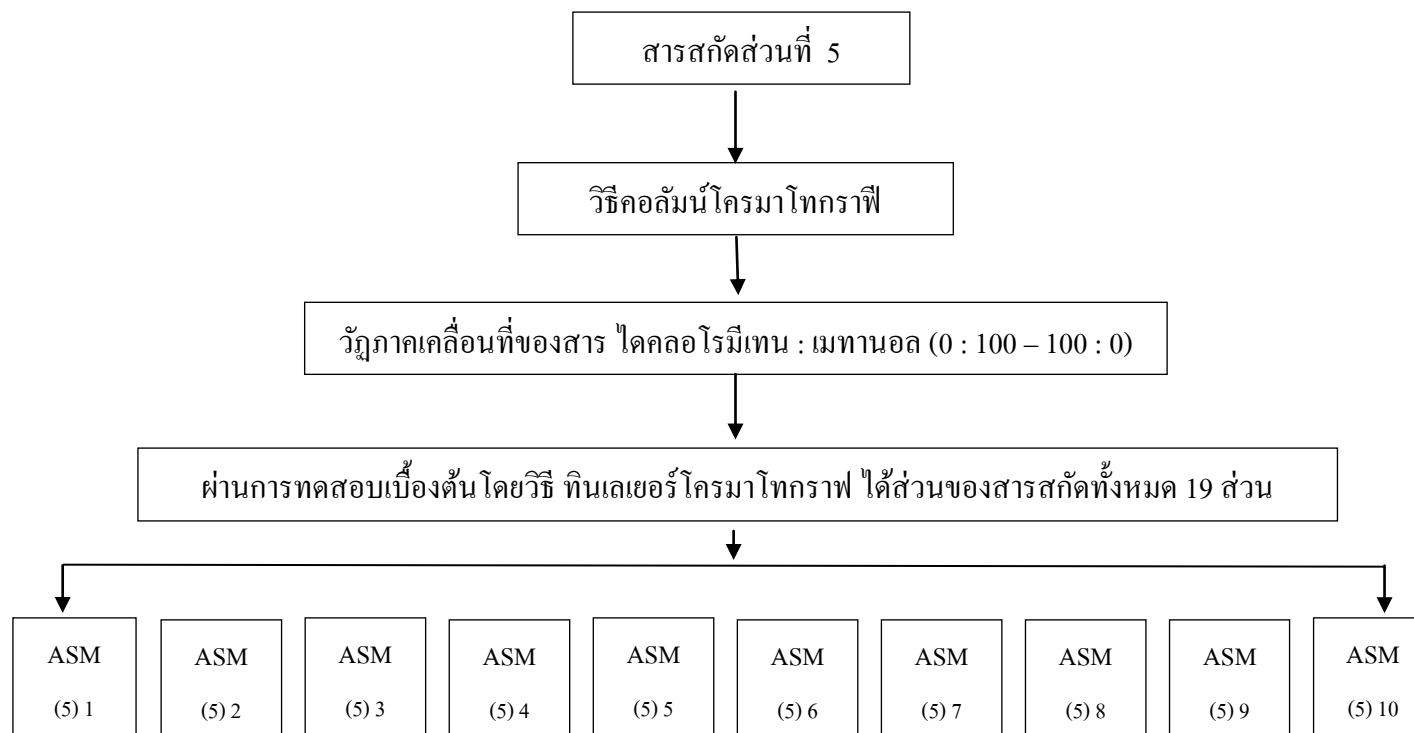
แผนภาพที่ 6 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดที่ ASM (7-10) 7 จำนวน 3.0590 กรัม



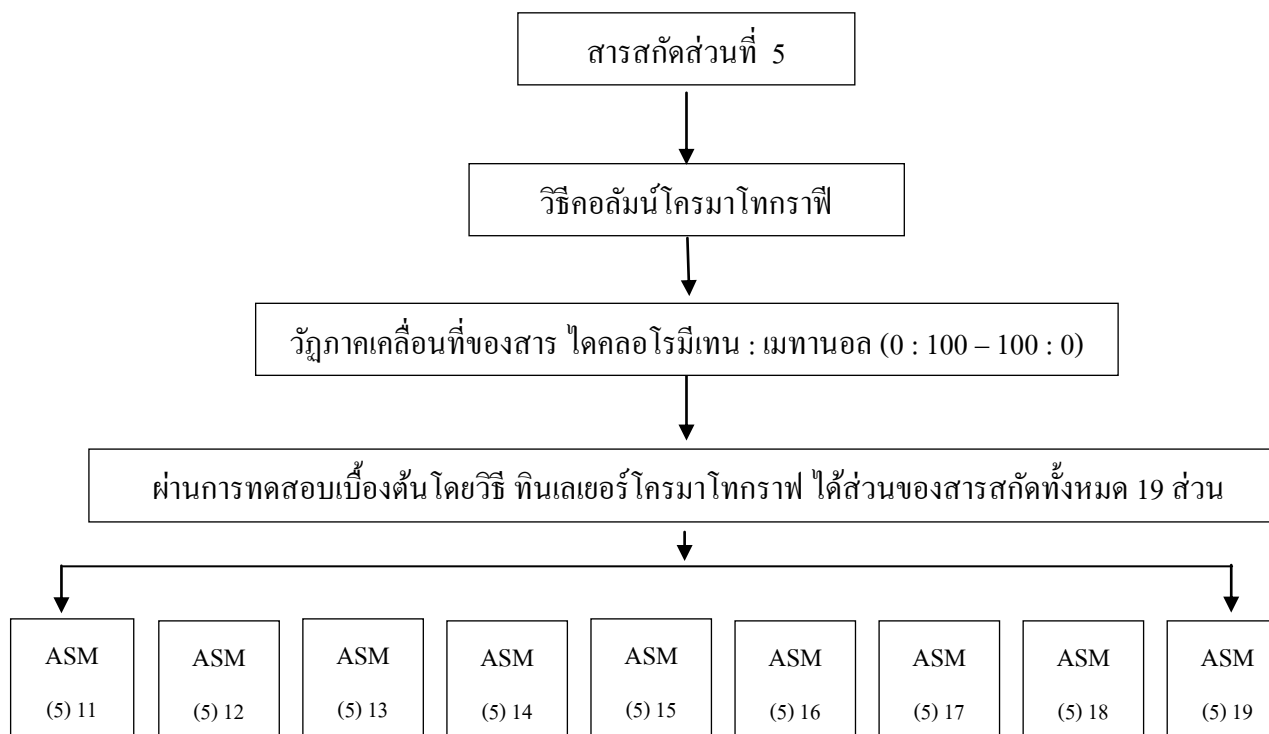
แผนภาพที่ 7 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดเมทานอล จำนวน 169.580 กรัม



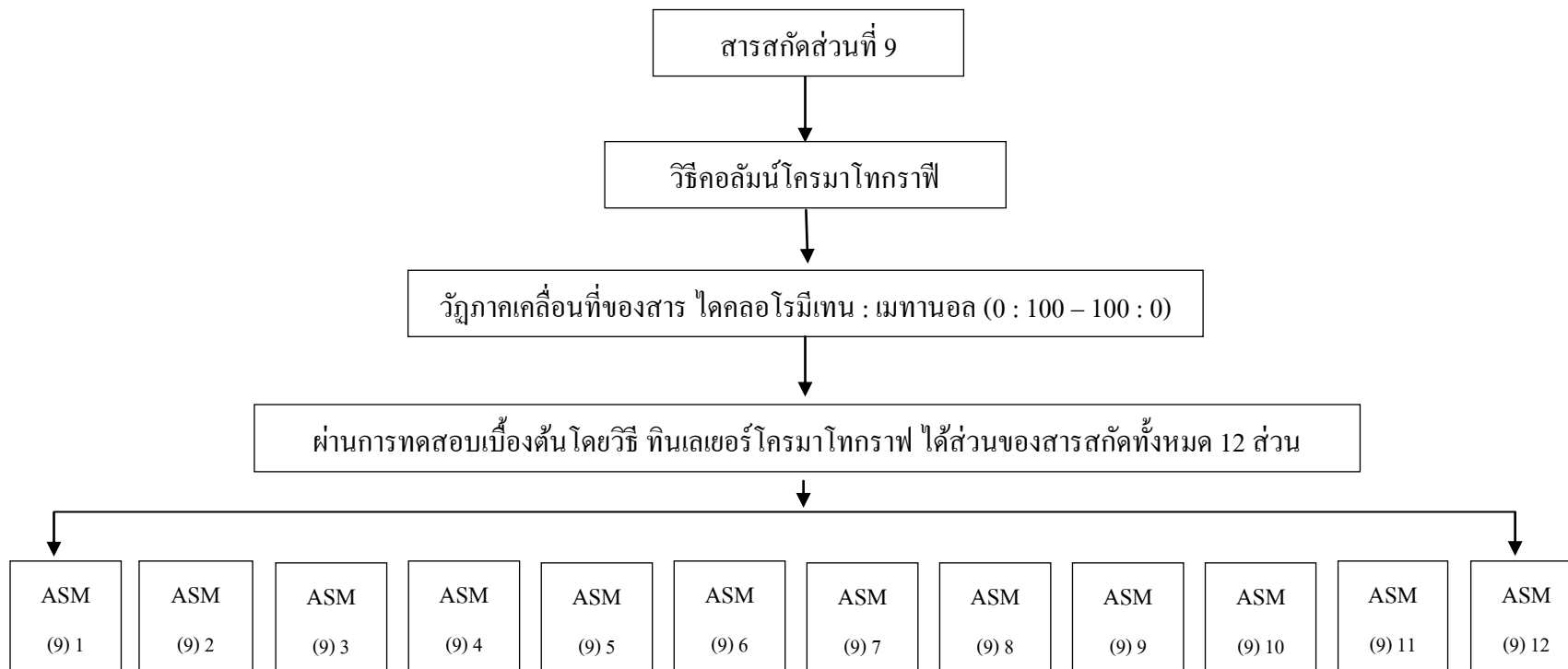
แผนภาพที่ 8 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดส่วนที่ ASM 2-11 จำนวน 35 กรัม



แผนภาพที่ 9 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดส่วนที่ ASM 2-5 จำนวน 19.7800 กรัม



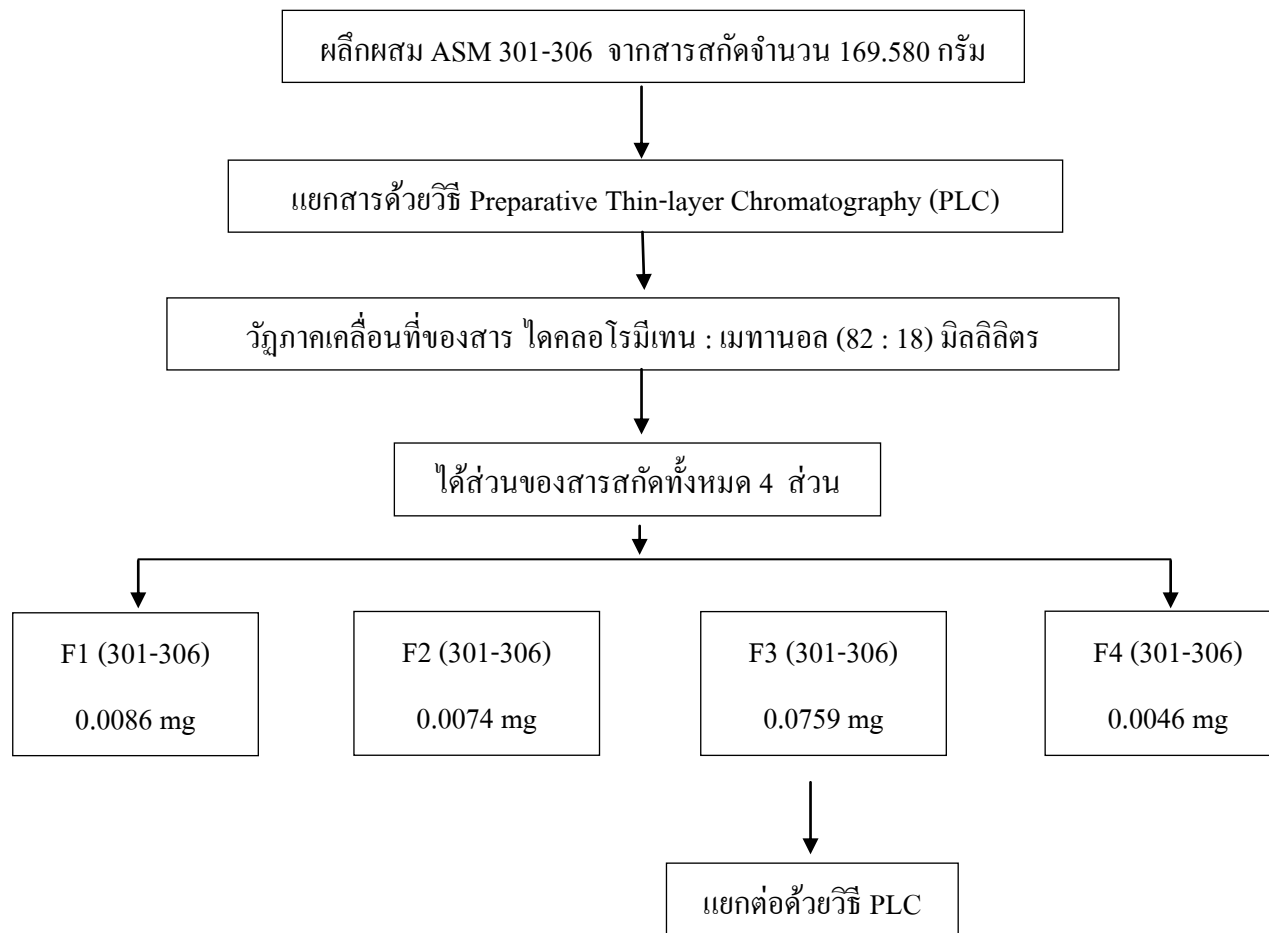
แผนภาพที่ 9 (ต่อ) การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดส่วนที่ ASM 5 จำนวน 19.7800 กรัม



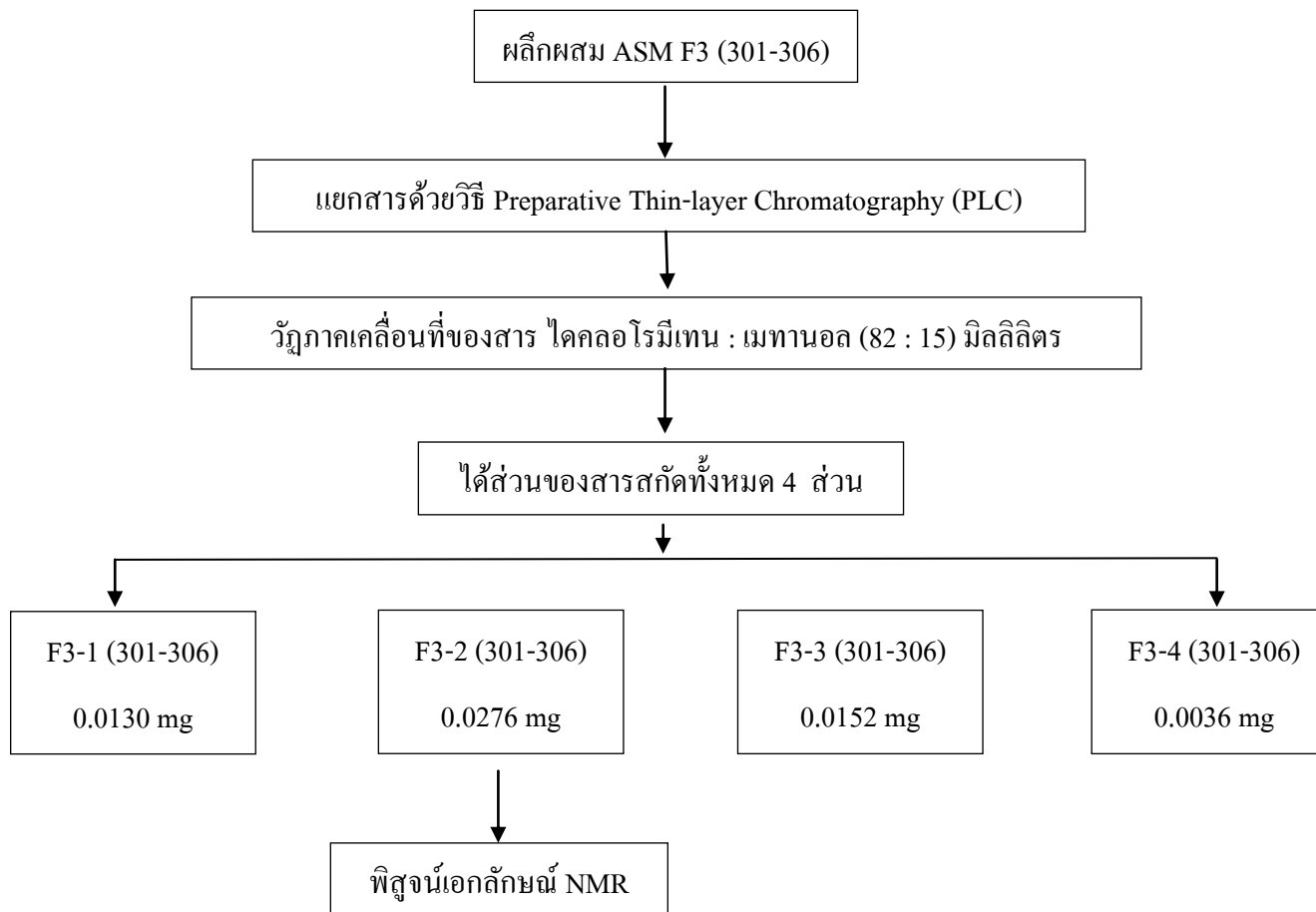
แผนภาพที่ 10 การสกัดแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีในส่วนสกัดส่วนที่ ASM 9 จำนวน 7.9600 กรัม

ภาคผนวก ข  
การแยกสาร โดยวิธี PLC

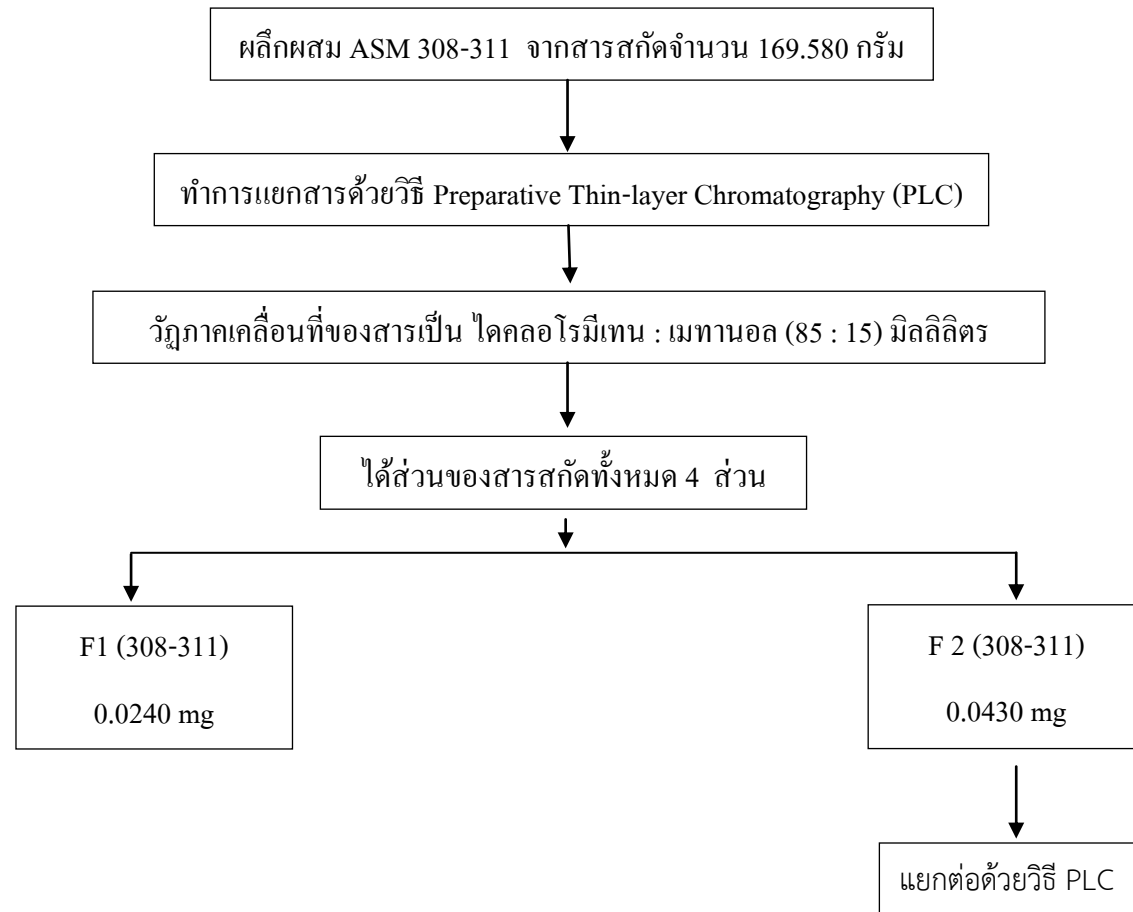




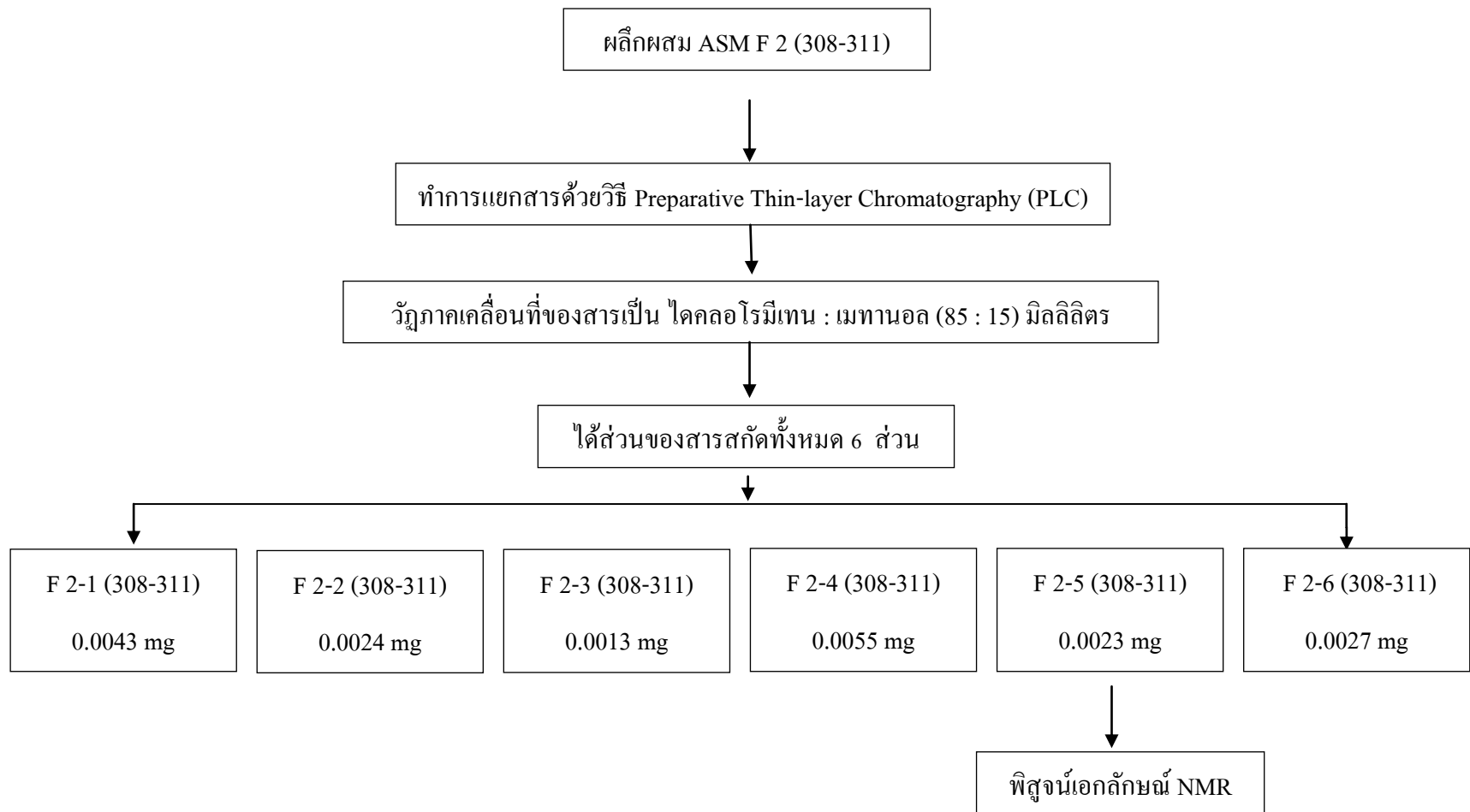
แผนภาพที่ 11 การแยกสาร โดยวิธี PLC ของผลิตภัณฑ์ลำดับที่ ASM 301-306 จำนวน 0.1313 มิลลิกรัม



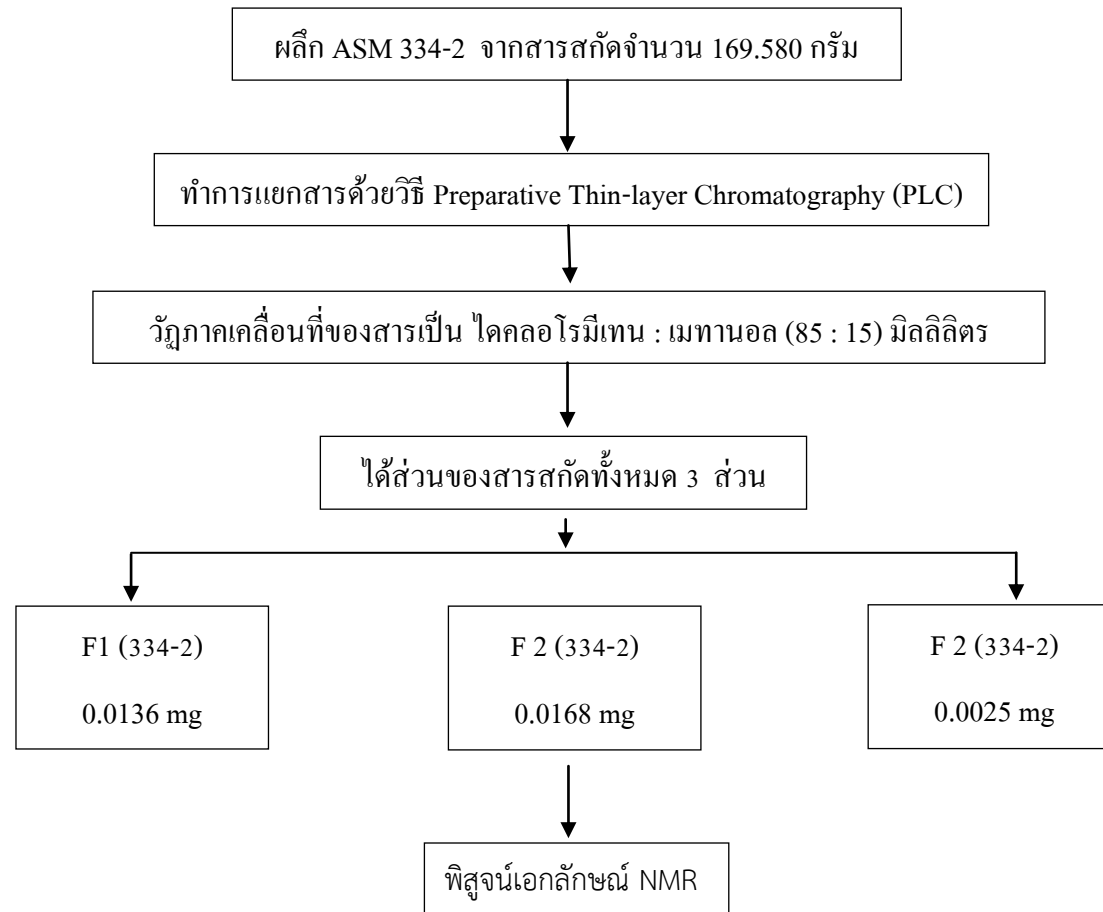
แผนภาพที่ 12 การแยกสาร โดยวิธี PLC ของผลิตภัณฑ์ลำดับที่ ASM F3 (301-306) จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม



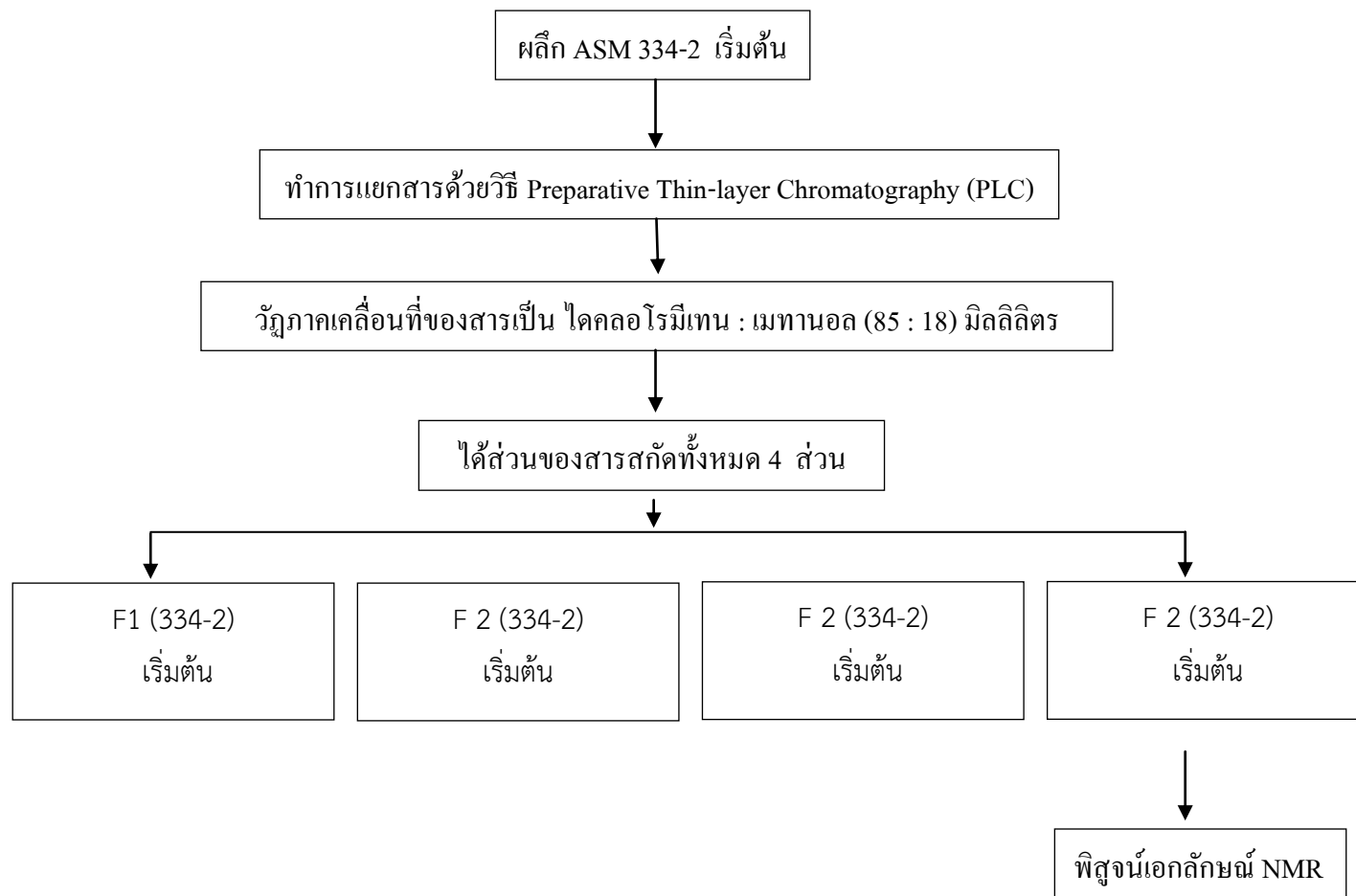
แผนภาพที่ 13 การแยกสารโดยวิธี PLC ของผลิตภัณฑ์ลำดับที่ ASM 308-311 จำนวน 0.0759 มิลลิกรัม



แผนภาพที่ 13 การแยกสาร โดยวิธี PLC ของผลิตภัณฑ์ลำดับที่ ASM F2 (308-311) จำนวน 0.0430 มิลลิกรัม



แผนภาพที่ 14 การแยกสาร โดยวิธี PLC ของผลึกลำดับที่ ASM 334-2 จำนวน 0.0512 มิลลิกรัม



แผนภาพที่ 15 การแยกสารโดยวิธี PLC ของผลึกลำดับที่ ASM 334-2 เริ่มต้น จำนวน 0.0180 มิลลิกรัม

**ภาคผนวก ก**

**การทดสอบสมบัติในการต้านเอ็นไซม์ DPP-4**

## ลำดับการเติมสารสกัดส่วนต่างๆ และสารที่ใช้ในการทดสอบสมบัติในการต้านเอนไซม์ DPP-4

1. การเติมสารสกัดส่วนต่างๆ ยาต้านเบาหวาน และร้อยละ 10 DMSO ใน 96 Well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

หมายเหตุ ■ สารสกัดส่วนต่างๆ

■ ยาต้านเบาหวาน (Januvia)

■ ร้อยละ 10 DMSO

2. การเติมสารละลาย Tris-HCl buffer ตามปริมาณที่กำหนด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาตรของสารละลาย Tris-HCl buffer ที่เติมลงใน 96 Well plate

Sample type	Tris-buffer		ร้อยละ 10 DMSO in Tris-buffer		Tris-buffer
	Buffer (ไมโครลิตร)	Enzyme (ไมโครลิตร)	Inhibitor (ไมโครลิตร)	10% DMSO (ไมโครลิตร)	Substrate (ไมโครลิตร)
1. Control system	25	15	-	10	50
2. Blank system	40	-	-	10	50
3. Sample	25	15	10	-	50
4. Blank sample	40	-	10	-	50
5. Januvia	25	15	10	-	50
6. Blank Januvia	40	-	10	-	50



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Green
B	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Green
C	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Green
D	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Green
E	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Green
F	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Green
G	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Green
H	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Green

- หมายเหตุ
- สารละลาย Tris-buffer 25 ไมโครลิตร
  - สารละลาย Tris-buffer 40 ไมโครลิตร
  - ยาด้านเบาหวาน
  - ร้อยละ10 DMSO control

### 3. การเติมเอนไซม์ DPP-4

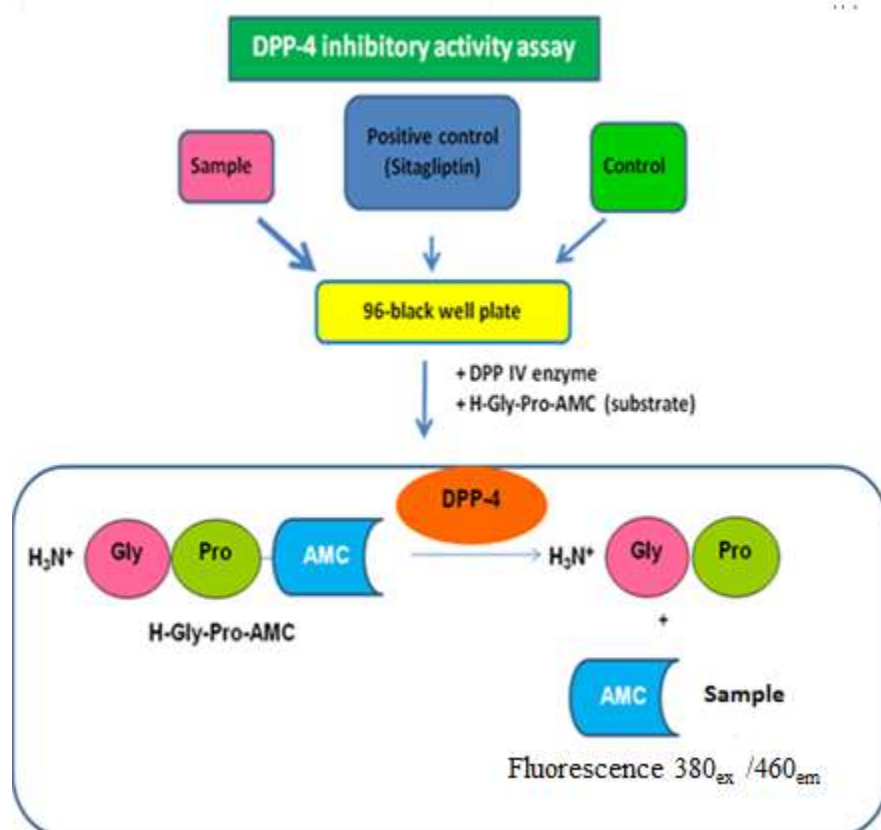
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green
B	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green
C	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green
D	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green
E	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: auto;">NO enzyme DPP-4</div>											
F												
G												
H												

- หมายเหตุ
- เอนไซม์ DPP-4 15 ไมโครลิตร
  - ไม่เติมเอนไซม์ DPP-4

4. นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม Substrate ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร จนครบทุกช่องใน 96 Well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

หมายเหตุ  เต็ม Substrate 50 ไมโครลิตร



**ภาคผนวก ง**  
**การเตรียมสารละลาย**

### การเตรียมสารละลาย Dragendorff's reagent

สารละลาย Dragendorff's reagent เป็นสารที่ใช้ทดสอบเพื่อหากรูบสารแอลคาลอยด์ โดยสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นสารอินทรีย์ที่มีลักษณะโดยรวมคือส่วนใหญ่มีสมบัติเป็นเบสและมีไนโตรเจน (Nitrogen) อยู่ในโมเลกุล มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) เมื่อทำการทดสอบกับสารที่เราต้องศึกษาโดยการพ่นลงแผ่น TLC พบว่าสารที่มีกลุ่มสารแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบจะมีสีส้มปรากฏบนแผ่นที่ TLC

### การเตรียมสารละลาย A

ชั่งสารบิสมัท ไนเตรท (Bismuth nitrate,  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ ) จำนวน 0.85 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจำนวน 40 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรด แอซติก (Acetic acid,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) จำนวน 10 มิลลิลิตร

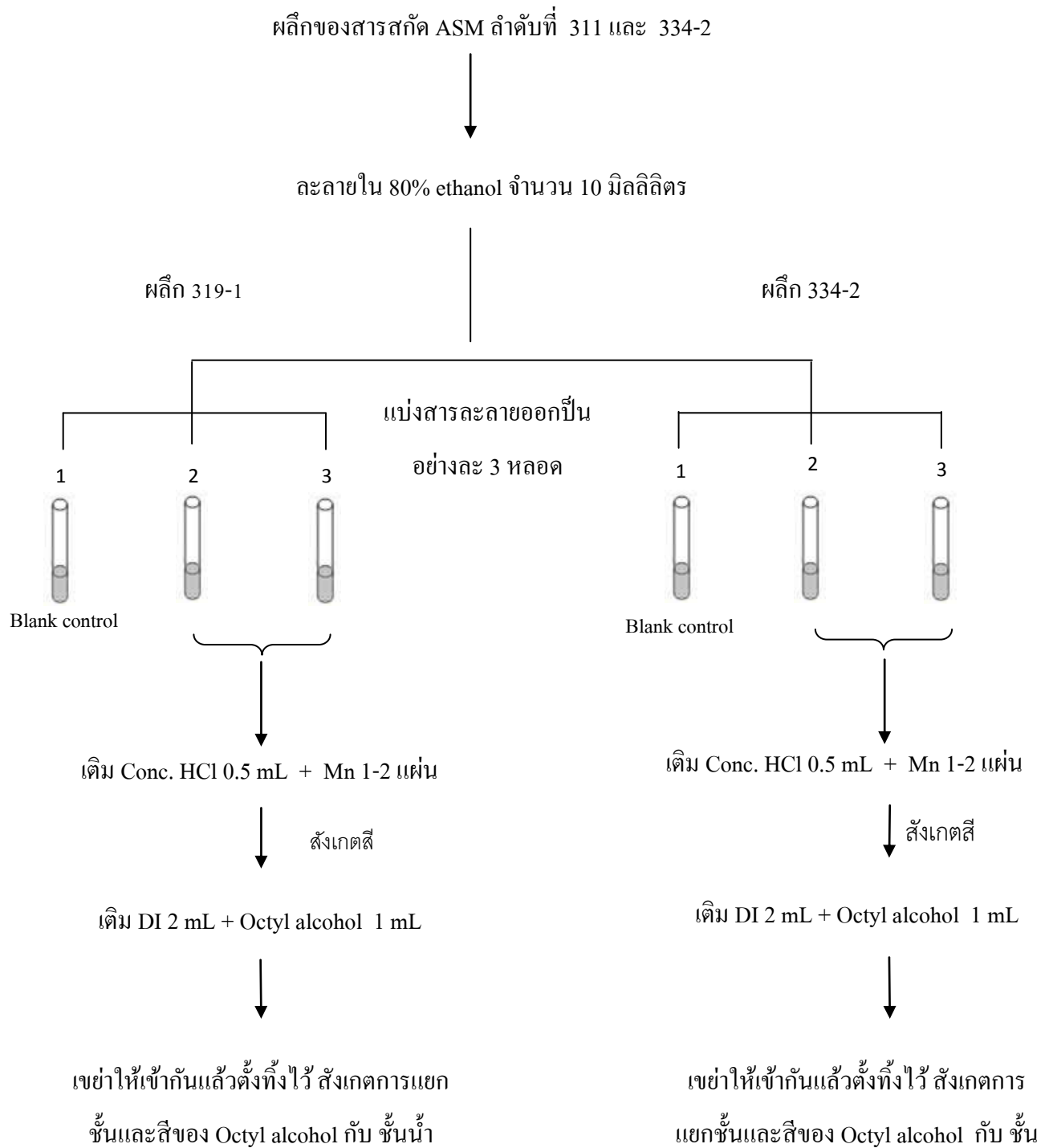
### การเตรียมสารละลาย B

ชั่งสารโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI) จำนวน 16 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจำนวน 40 มิลลิลิตร

### การผสมสารละลาย A และ B

นำสารละลาย A และ B มาอย่างละเท่าๆ กัน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงปิเปตต์ สารละลายมา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรด แอซติก จำนวน 20 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง  
การทดสอบหาสารฟลาโวนอยด์



**การสังเกตสี**

- สีส้ม ถึง สีแดง                      Flavone
- สีแดง ถึง สีแดงเลือดนก          Flavanol
- สีแดงเลือดคน ถึง แดงม่วง        Flavanone
- Chalcone, aurone                    ไม่ให้สีกับวิธีการทดสอบ

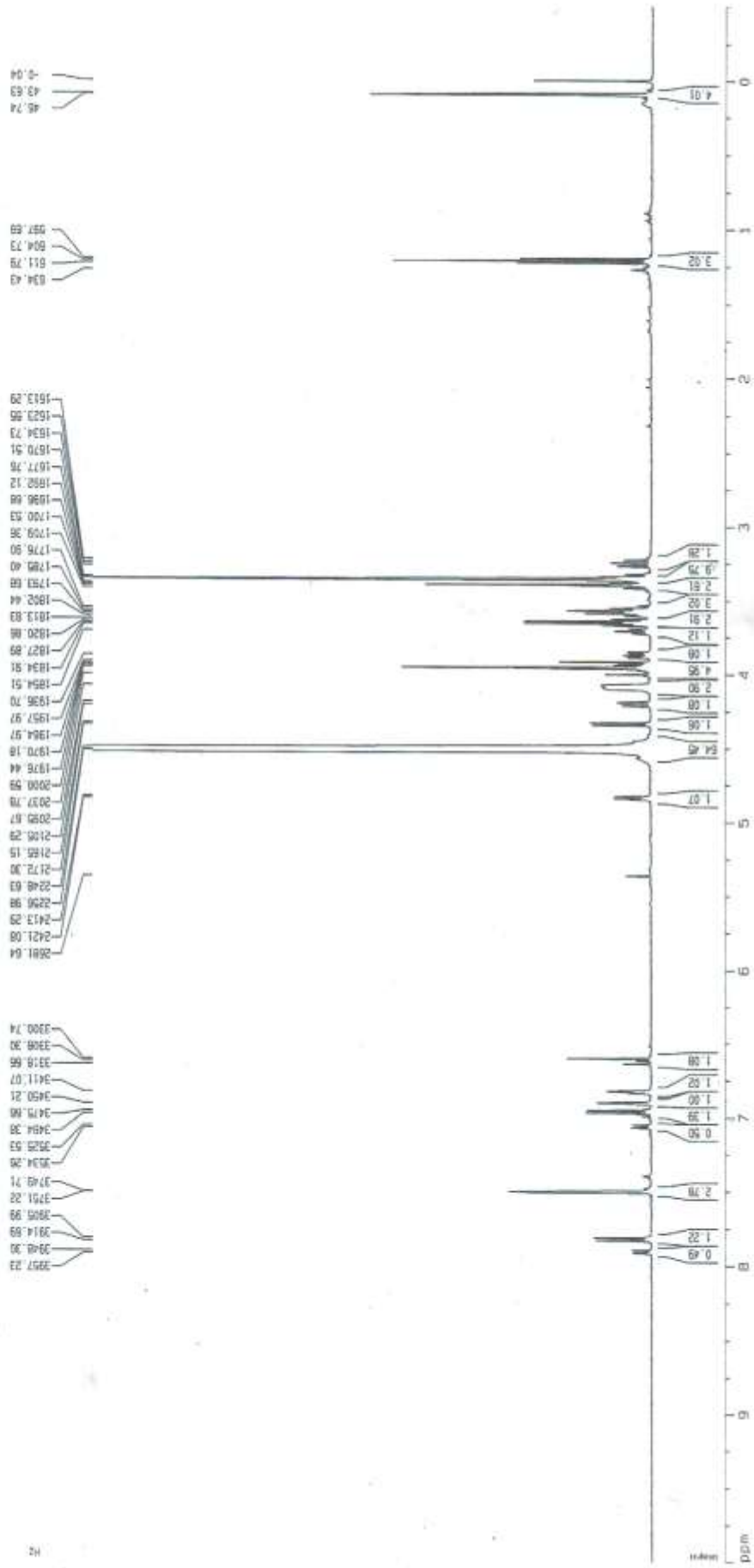
**การสังเกตสีในชั้น Octyl alcohol และชั้นน้ำ**

- ถ้าเป็น aglycone จะให้ชั้น Octyl alcohol
- ถ้าเป็น glycoside จะให้ชั้นน้ำ

**ภาคผนวก ฉ**

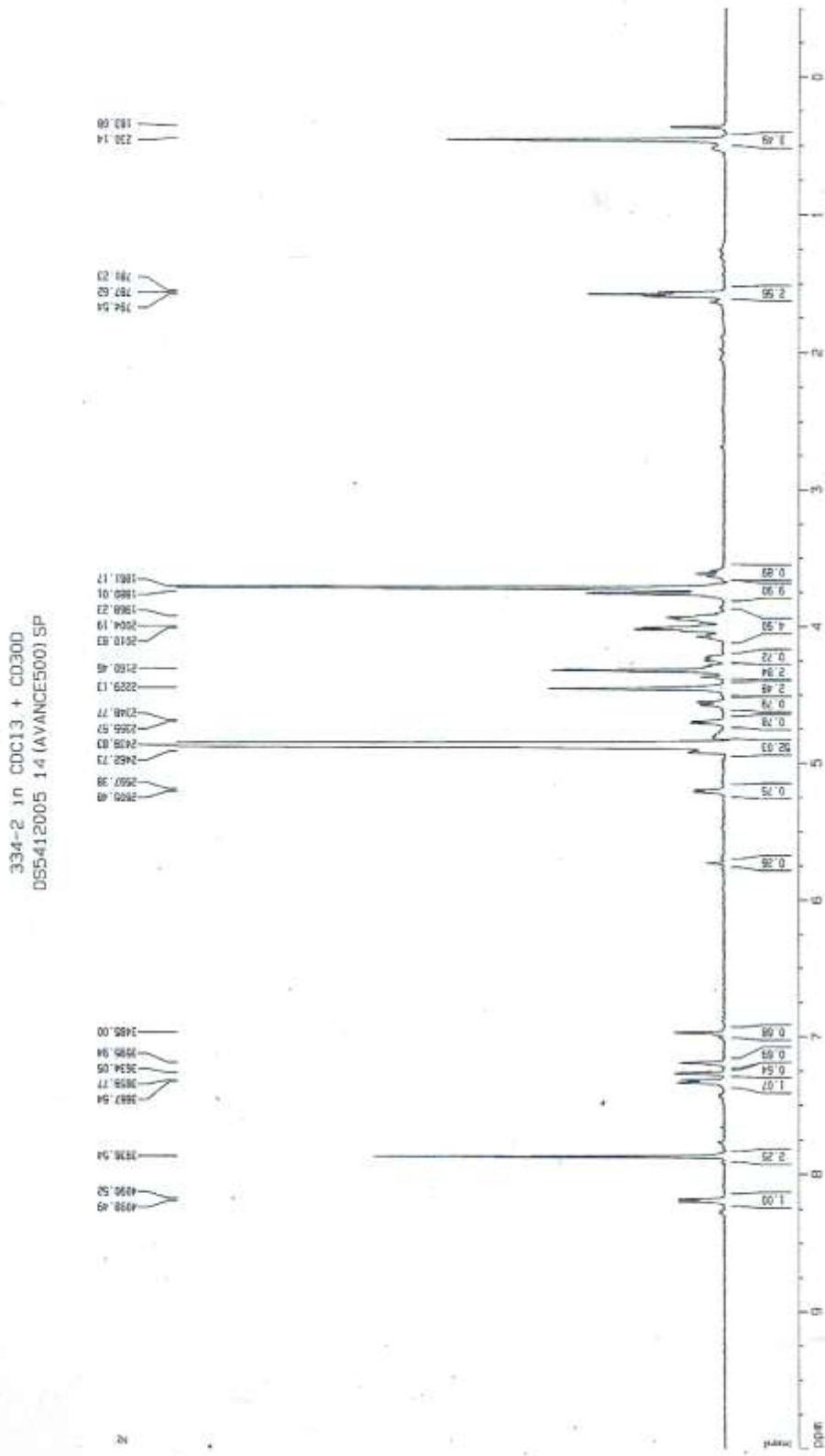
**การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางสเปคโทรสโกปี**

319-2 in CDC13 +CD300  
 OS5412005 11 (AVANCE500). SP



แผนภาพที่ 16 การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางสเปกโทรสโกปีของสารลำดับที่ 319-1





แผนภาพที่ 17 การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางสเปกโทรกราฟิกของสารลำดับที่ 334-2

**ภาคผนวก ข**  
**หนังสือตอบรับบทความ**

Ref. No. 0564.14/ 371



Bansomdejchaopraya Rajabhat University  
1061 Isarapap 15 Hirunrujee  
Thonburi Bangkok 10600

6 July 2017

**Subject** Notification of Results of BSRU Conference 2017 Full Paper and  
Invitation to the Conference

**Attention** Saranluk pengmuean & the others

**Attachment** A set of schedule of paper presentation

We are pleased to inform you that your full paper entitled, "The active fraction from leaf of *Aquilaria crassna pierre ex lecomte* agents Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) enzymes" was accepted for a poster presentation at the 1<sup>st</sup> National and International Conference 2017 on Education for Sustainable Locality Development organized by Bansomdejchaopraya Rajabhat University in Bangkok, Thailand on the 29<sup>th</sup> of July, 2017.

Also, you are invited to participate in the opening ceremony. After the plenary session in the morning, your presentation is scheduled in the afternoon according to the attachments informing the venue, time and room monitors. Your poster will be instantly designed and set at the venue of presentation by Graduate School and you are expected to stand by your poster in case of visitors' queries.

Please feel free to contact us regarding any questions you may have. All of us at BSRU Conference 2017 are doing our best to make this year event fruitful and memorable, and we look forward to welcoming you.

Cordially yours,

A handwritten signature in blue ink that reads "Areewan".

(Assistant Professor Dr. Areewan Iamsa-ard)  
Dean  
Graduate School of BSRU

Graduate School  
Tel. +662-473-7000 Ext. 1810, 1813

## ประวัติผู้ทำวิจัย

<b>ชื่อ</b>	สร้อยลักษณ์ เฟื่องเหมือน
<b>เกิดเมื่อ</b>	18 พฤศจิกายน 2529
<b>ที่อยู่</b>	85/1 หมู่ 6 ตำบลบึงคล้า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ 36000
<b>ประวัติการศึกษา</b>	
<b>ปัจจุบัน</b>	กำลังศึกษาอยู่ในระดับปริญญาโท สาขาเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
2557 - 2559	ประกาศนียบัตรวิชาชีพครู มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
2548 - 2552	ระดับปริญญาตรี สาขาเคมีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
<b>ประสบการณ์</b>	
<b>ปัจจุบัน</b>	ครูโรงเรียนปัญจดี จ.ชัยภูมิ ตำแหน่ง ครูผู้สอน ชุรการ ฝ่ายทะเบียนและวัดผล
2555 – 2558	อาจารย์ประจำวิทยาลัยเทคโนโลยีพณิชยการสุโขทัย จ.กรุงเทพมหานคร
<b>กิจกรรมทางวิชาการ</b>	
2557	ได้รับรางวัลที่ปรึกษาโปรเจกต์เด่น โครงการประกวดสิ่งประดิษฐ์ ปตท. ประจำปี 2557
2557	นำนักเรียนในที่ปรึกษาเข้าร่วมกิจกรรม โครงการประกวดสิ่งประดิษฐ์ ปตท. ประจำปี 2557 ซึ่งด้วยพระราชทานสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้รางวัลรองชนะเลิศระดับอาชีวศึกษา 2557 เข้าร่วมอบรมการคิดวิเคราะห์และการแก้ไขปัญหาทางคณิตศาสตร์และวิทยาศาสตร์ ของสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมอาชีวศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ
2556	เข้าร่วมกิจกรรมประกวดสื่อการสอนทักษะวิชาชีพอาชีวศึกษาเอกชนครั้งที่ 28 ประจำปีการศึกษา 2556 ที่วิทยาลัยหมู่บ้านครู
2555	ผ่านการฝึกอบรม ระบบบริหารคุณภาพ มาตรฐาน ISO 9001 และ ระบบบริหารจัดการสิ่งแวดล้อม ISO 14001
2553	ผลงานวิชาการ เรื่อง Photocatalytic decolorization of dyes for nano-structures of titanium dioxide (TiO <sub>2</sub> ) films