บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

โรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงนับเป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างหนึ่ง ในการส่งมะม่วงไปจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่มีความเข้มงวดในการนำเข้าผลไม้สด ผลไม้ที่แก่เต็มที่แล้ว จุลินทรีย์สามารถเข้าทำลายได้ง่ายเนื่องจากมีความชื้นและอาหารของจุลินทรีย์สูง มูลค่าการสูญเสียของผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวมีประมาณ 10-30% ของผลผลิตทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำในผลผลิต (ประจวบ, 2531) สำหรับประเทศทางเขตร้อนและกึ่งร้อนอย่างประเทศไทยมีการสูญเสียของผลผลิตมาก เนื่องจากลักษณะภูมิอากาศทางเขตร้อนและกึ่งร้อนเหมาะและเอื้ออำนวยต่อการเข้าทำลายและการพัฒนาของโรคเร็วกว่าเขตอบอุ่น อีกทั้งผลไม้ทางเขตร้อนและกึ่งร้อนมักมีความอ่อนนุ่มของเนื้อและความหวานสูง เหมาะแก่การพัฒนาของโรคต่าง ๆ เป็นอย่างดี มะม่วงซึ่งเป็นผลไม้ทางเขตร้อนและกึ่งร้อนชนิดหนึ่งก็มีปัญหาถูกเชื้อโรคต่าง ๆ เข้าทำลายมากมาย สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการเน่าเสียของผลมะม่วงภายหลังการเก็บเกี่ยวว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides, Aspergillus niger, Phomopsis* sp., *Dothiorella* sp., *Gloeosporium mangifera* และ *Lasiodiplodia theobromae* (ระจิตร, 2536)

2.1 โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ในมะม่วง

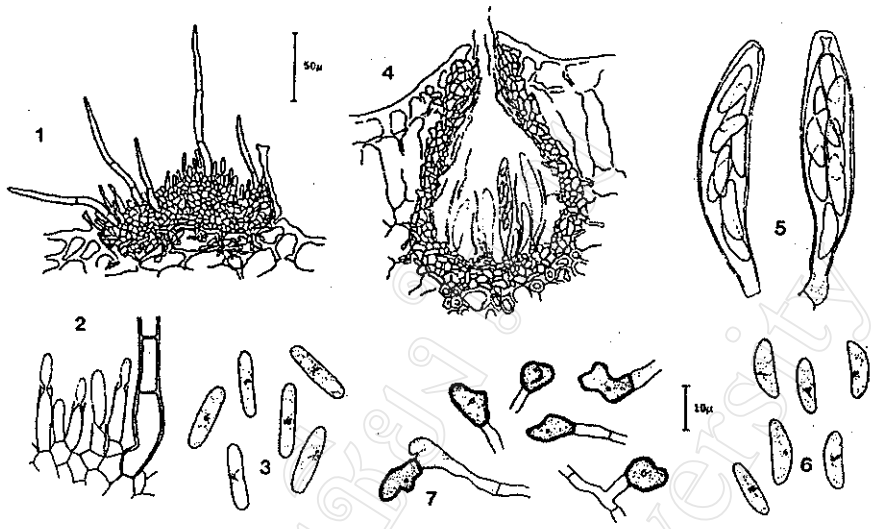
โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของมะม่วง พบในแหล่งปลูกมะม่วงทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น เกิดได้กับหลายส่วนของมะม่วง เช่นใบ ยอด ดอก ผล กิ่งและเกิดได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของมะม่วง โดยจะเริ่มติดเชื้อที่ใบอ่อนก่อนแล้วตามด้วยช่อดอกและเมื่อผลมะม่วงเกิดการติดเชื้อ เชื้อราก็จะแฝงตัวอยู่ในผลแล้วจะเริ่มแสดงอาการเมื่อผลสุกหลังการเก็บเกี่ยว (Litz, 1997) มะม่วงพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้มากคือ พันธุ์น้ำดอกไม้ นิพนธ์และคณะ (2532) ได้แยกเชื้อราจากช่อมะม่วงและทดสอบการก่อโรค ซึ่งชนิดเชื้อราที่ตรวจพบในปริมาณมาก คือ *Colletotrichum* sp. นอกจากนั้นยังพบเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Cladosporium* sp. โรคแอนแทรคโนสมีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เชื้อเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 10-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95-97 เปอร์เซ็นต์ ระบาดโดยลมและฝน โดยสปอร์ของเชื้อราจะปลิวไปตามลมและฝน ในช่วงฤดูฝนมะม่วงจะผลิใบอ่อน การทำลายจะมีมาก ส่วนการแพร่ระบาดเกิดขึ้นได้ดีในระยะที่มะม่วงออกดอกซึ่งเป็นฤดูแล้ง ในระยะนี้หากมี

พายุฝนการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลจะรุนแรงและระบาดไปทั่วทั้งสวน (ชลอ,2539) การระบาดของโรคแอนแทรคโนสนั้น *Colletotrichum gloeosporioides* จะระบาดไปโดยสร้าง conidia บนซากพืช เมื่อถูกฝนหรือลมพัดไป conidia จะสร้าง germ tube และ appressoria ภายใน 20 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อราสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชได้โดยที่เนื้อเยื่อพืชไม่จำเป็นต้องมีแผลมาก่อน หลังจากนั้นก็แสดงอาการอย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถแฝงตัวอยู่บนผลมะม่วงดิบได้นานหลายเดือน ดังนั้นก่อนการเก็บเกี่ยวผลไม้อาจมีสภาพดี แต่แสดงอาการออกในภายหลังได้ (Ploetz, 1994) ปัจจุบันโรคแอนแทรคโนสเป็นปัญหาที่น่าวิตกกังวลมากหากไม่มีการจัดการสวนมะม่วงก่อนการเก็บเกี่ยวอย่างถูกต้อง (Johnson *et al.*, 1995)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

Ashby (1931) กล่าวถึง strain ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยแบ่งกลุ่มของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสออกเป็น 3 กลุ่ม คือ พวกที่เจริญบนอาหาร PDA สร้างลักษณะต่าง ๆ ตามปกติ คือ สร้าง slime mass สีชมพูอมส้มกระจายอยู่ทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ slime mass คือกลุ่มของ conidia ซึ่งเกิดบนกลุ่มเส้นใยสีเทา กลุ่มนี้ไม่มี aerial mycelium เกิดขึ้น ระหว่างที่มีการสร้าง acervuli เชื้อจะไม่สร้าง pigment ใด ๆ และเส้นใยจะไม่รวมกันเป็น plectenchyma เมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยจะสร้าง appressoria สีน้ำตาลดำหรือสีเทามากมายใต้ผิววุ้น อีกพวกหนึ่ง ได้แก่ พวกที่สร้าง aerial mycelium มี acervuli เล็กน้อย ภายในเกิดสปอร์ได้ พวกที่สามได้แก่พวกที่สร้าง perfect stage โดยการสร้าง fruiting structure แบบ perithecia

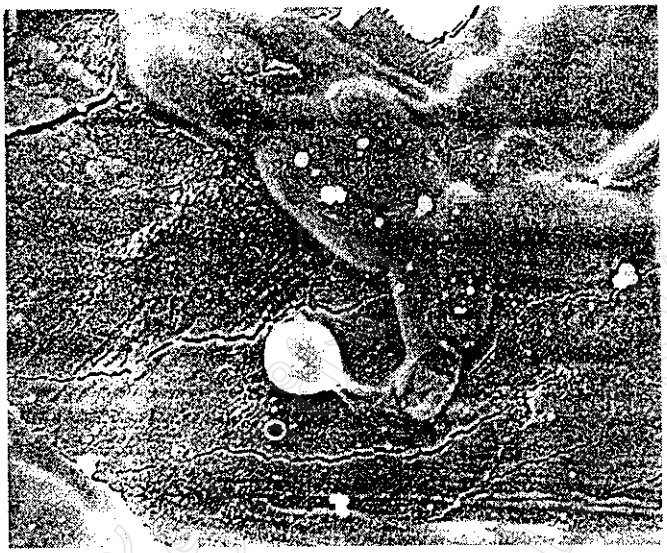
การสืบพันธุ์ของเชื้อมี 2 แบบ คือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น เชื้อราจะสร้าง perithecia และเจริญต่อไปเป็น ascospore ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นเชื้อราจะสร้าง acervuli และเจริญต่อไปเป็น conidia (ดูภาพที่ 1) ซึ่งโดยทั่วไปที่พบ เชื้อที่เข้าทำลายผลมะม่วงจะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยในฤดูฝน acervuli จะถูกผลิตขึ้นในช่วงที่ต้นมะม่วงมีความอุดมสมบูรณ์ในทุกๆส่วน หลังจากนั้น conidia จะถูกพัดมากับฝน ซึ่งถ้าความชื้นยังคงเหลืออยู่ เชื้อราก็จะยิ่งเข้าทำลายได้มาก Snowdon (1990)



ภาพที่ 1 ลักษณะของ 1. acervulus 2. conidiophores 3. conidia 4. perithecium 5. asci 6. scospores และ 7. appressoria ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในระยะอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (Litz, 1997)

ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนส

โรคแอนแทรคโนสจะเข้าทำลายมะม่วงในทุกระยะของการเจริญเติบโตของต้น ดอกและผล Litz (1997) กล่าวว่า อาการเริ่มต้นที่พบบนใบอ่อนของต้นมะม่วง จะมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลเล็ก ๆ และบางครั้งพบว่ามีอาการใบงอร่วมด้วย ตรงจุดศูนย์กลางของแผลสีน้ำตาลเล็ก ๆ ที่แก่จะทำให้ใบหล่น ส่วนบนช่อดอกที่ติดเชื้อก็จะส่งผลให้ดอกอ่อนเกิดการติดเชื้อตามไปด้วย เนื่องจากเกิดการแพร่เชื้ออย่างรวดเร็ว ซึ่งการติดเชื้อระยะมีดอกนี้จะส่งผลให้จำนวนของผลมะม่วงน้อยกว่าที่ควรจะเป็น หากผลติดเชื้อตั้งแต่ผลอ่อนจะทำให้ผลอ่อนไม่เจริญและหล่นลงพื้นในที่สุด สำหรับผลที่มีขนาดใหญ่ (4-5 เซนติเมตร) การติดเชื้อดังกล่าวจะไม่แสดงอาการ แต่เชื้อราจะแฝงตัวแล้วหยุดการเจริญชั่วคราวหลังจากที่มีการสร้าง appressorium (ดูภาพที่ 2) แต่จะเริ่มเจริญต่อหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้ว และมะม่วงเริ่มสุกอาการที่ติดเชื้อก็จะปรากฏให้เห็นเป็นจุดสีน้ำตาลดำไปจนถึงการเกิดแผลสีดำ



ภาพที่ 2 การเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum groeosporioides* บนผิวของมะม่วงสุก (Snowdon,1990)

อาการบนผล ในระยะที่ผลอ่อนมากและได้รับเชื้อโรคแต่จะแฝงตัวอยู่และอาจทำให้เกิด รอยแผลเห็นเป็นจุดเล็กมากแต่ถ้าอากาศชื้นแผลอาจขยายตัวออกและสร้างสปอร์จำนวนมาก อาการบนผลแก่หรือผลสุกจะเห็นจุดสีดำ ๆ (black spot) รูปต่างๆ รอยแผลจะขยายขนาดมากขึ้น เกิดเป็นรอยบุ๋มตื้น ๆ และผิวอาจแตก รอยแผลจะขยายเชื่อมกันเกิดเป็นรอยแผลโตขึ้นในที่สุดแผลจะเน่าและยุบลง (วิจิตร, 2529) อาการดังกล่าวจะลุกลามลึกลงไปในเนื้อผล ทั้งขณะที่อยู่บนต้นหรือหลังการเก็บเกี่ยวมาแล้ว โดยเชื้อราจะมีการเจริญในบริเวณผิวลึกลงไป 1-2 มิลลิเมตรและในเนื้อเยื่อที่ลึกกว่า 2 มิลลิเมตรแต่ลึกไม่เกิน 10 มิลลิเมตร (อังสุมา, 2530) อาการบนผลจะเห็นชัดเมื่อเก็บรักษาผลมะม่วงไว้นานจนผลสุกเพราะผลจะเริ่มอ่อนตัวทำให้เป็นโรคได้ง่ายโดยเฉพาะมะม่วงที่มีแผลเมื่อได้รับเชื้อผลจะเน่าเร็วกว่าปกติ (Johnson *et al.*, 1995) Quimio (1974) กล่าวว่า ผลที่เริ่มสุกและมีบาดแผล สามารถเห็นอาการเริ่มแรกด้วยตาเปล่าภายใน 12 ชั่วโมง และผลที่ยังเป็นสีเขียวแต่มีรอยแผลสามารถเห็นอาการเริ่มแรกด้วยตาเปล่าภายใน 24 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ในผลที่เริ่มสุกและไม่มีบาดแผลจะเห็นอาการภายใน 48 ชั่วโมง ส่วนผลที่ยังเขียวจะเห็นอาการภายใน 72-96 ชั่วโมง โดยสปอร์ของเชื้อจะเริ่มงอกตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรกหลังจากทำการปลูกเชื้อบนผิวผลมะม่วงที่ยังมีสีเขียวอยู่มะม่วงที่ถูกทำลายโดยแอนแทรคโนสนั้นไม่สามารถนำออกจำหน่ายได้เนื่องจากไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค

การควบคุมและป้องกันโรคแอนแทรคโนสต้องทำทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยว ปัจจุบันมีการควบคุมโดยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีระดับของความต้านทานต่อเชื้อราสูงแต่ผลการทดลองก็ยังมีข้อจำกัดอื่นอยู่บ้าง (Droby *et al.*, 1986) สำหรับการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวผลไม้นั้นพบว่าสารเคมีที่นิยมนำมาใช้ คือ biphenyl, benomyl, thiabendazole, sec-butylamine และ dicloran แต่เชื้อราที่เข้าทำลายแบบแฝง เช่น *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp.และ *Diplodia* sp. นิยมใช้สารในกลุ่ม benzimidazole ซึ่งสารในกลุ่มนี้ได้เริ่มนำมาใช้ในปี ค.ศ. 1960 (Gilpatrick, 1983)

ในปี 2532 นิพนธ์และคณะได้ทดลองนำผลมะม่วงน้ำดอกไม้จากสวนมาจุ่มในสารเคมี 4 ชนิด คือ benomyl (Benlate 50 WP), carbendazim (Derosan 50 WP), iprodione (Rovral 50 WP) และ prochloraz (Sportak 45 EC) ที่อัตราความเข้มข้น 500, 500, 500 และ 250 ppm ตามลำดับ พบว่าหลังจากนั้น 10 วัน เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคกับผลมะม่วงสุกเมื่อใช้สาร prochloraz ต่ำกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ และเมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* sp., *Botryodiplodia* sp., *Dothiorella* sp., *Phomopsis* sp. และ *Aspergillus* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคผลเน่าระยะหลังเก็บเกี่ยวมาปลูกเชื้อบนผลมะม่วงก่อนจุ่มสารป้องกันกำจัดเชื้อราดังกล่าว ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคระหว่างทรีทเมนต์ไม่ลดลงมากนัก เชื้อ *Dothiorella* sp. เป็นชนิดเดียวที่มีแนวโน้มเป็นโรคลดลง

ส่วนการป้องกันการเข้าทำลายโรคโดยการฉีดพ่นสารเคมีประเภท benzimidazole ก็นับว่าได้ผลดีแต่การป้องกันวิธีนี้มีผลเสีย คือ ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคจะลดน้อยลงไปทุก ๆ ปี เนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จะมีความต้านทานต่อสารเคมีเพิ่มขึ้น (Farungsang and Farungsang, 1992)

ในประเทศไทย การศึกษาการใช้สารสกัดจากพืช ส่วนใหญ่จะเน้นเฉพาะทางด้านการแพทย์ ทั้งนี้เนื่องจากพบว่า สารสกัดจากพืชโดยเฉพาะพืชสมุนไพรนั้นสามารถนำมาใช้เป็นยาหรือองค์ประกอบส่วนหนึ่งของยารักษาโรคที่เกิดกับมนุษย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อนำมาใช้ควบคุมโรคพืชซึ่งมีสาเหตุมาจากโรคแอนแทรคโนสนั้นก็ได้มีการศึกษากันมากขึ้น (ธารทิพย, 2540)

เกษม (2528) ได้นำพืชสมุนไพรจำนวน 10 ชนิดได้แก่ หนอนตายหยาก สลอด แสลงใจ โล่ติน โปยก๊ก กานพลู กระเทียม เทียนขาว ตะไคร้ และลำโพง มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum dematium* พบว่าโปยก๊กสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 20,000 ppm รองลงมาได้แก่ เทียนขาว ตะไคร้ กานพลู หนอนตายหยาก กระเทียม แสลงใจ สลอด ลำโพงและโล่ติน ตามลำดับ จันทร์เพ็ญพร (2538) ทำการศึกษาการใช้สารสกัดจากใบพลูพื้นเมืองควบคุมโรคแอนแทรคโนสในถั่วเหลือง พบว่าระยะเวลาในการสกัด

สาร 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1:4 โดยใช้เหล้าขาวเป็นตัวทำละลายเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารเพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในถั่วเหลือง เมื่อนำสารสกัดจากเหล้าขาวไปใช้กับพืชในเรือนทดลองพบว่าถั่วเหลืองที่ถูกพ่นสารสกัดโดยเหล้าขาวมีการเจริญของเชื้อลดลง เมื่อเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับการพ่นสารสกัด อัญชลี (2543) ได้รายงานว่าการใช้สารสกัดประเภทน้ำมันหรือเมล็ดที่มีน้ำมันสะเดาอยู่ภายในสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum atramentarium* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคที่เกิดในมะเขือยาวได้ อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด

ในการศึกษาการสกัดสารจากพลูคาว แน่งน้อย (2541) พบว่าสารคาพริลแอลดีไฮด์ (capryl aldehyde) ซึ่งได้จากการสกัดใบพลูคาวซึ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ได้ ซึ่งไดคลอโรมีเทนนั้นเป็นตัวทำละลายไม่มีขั้ว นอกจากนั้น สุคนธ์ทิพย์ (2543) ได้สกัดสารจากใบพลูคาวเช่นกันโดยใช้ตัวทำละลายชนิดมีขั้ว คือ เมธานอล ความเข้มข้น 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์และเหล้าขาว 35 ดีกรี พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยเหล้าขาว 35 ดีกรีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารจากพลูคาวต่อไปในอนาคตนั้นจึงควรศึกษาเกี่ยวกับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารเพื่อใช้ยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง ตลอดจนศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมในการยับยั้งที่จะนำมาใช้ในการป้องกันโรคบนผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อเป็นแนวทางในการช่วยลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์และเพื่อพัฒนาสารสกัดจากพืชให้มีประสิทธิภาพในการใช้ควบคุมโรคของผลไม้อื่น ๆ ต่อไป

2.2 พลูคาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Houttuynia cordata* Thunb.

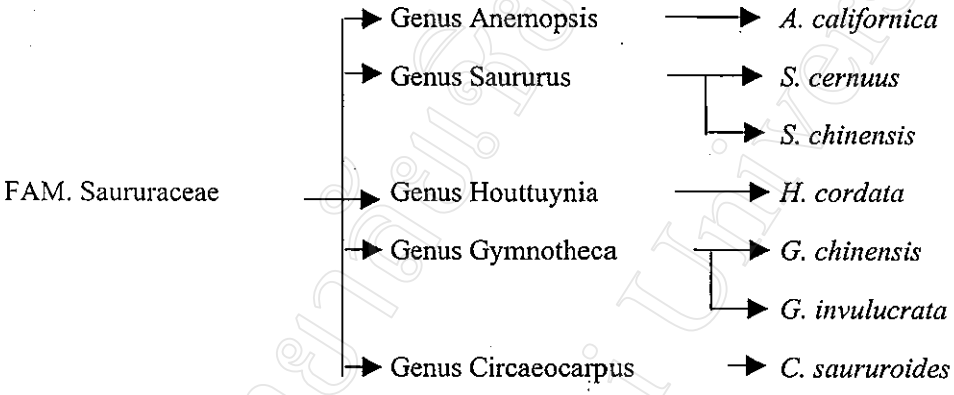
วงศ์ (family) Saururaceae

ชื่ออื่น ๆ ในประเทศไทย ผักก้านตอง (แม่ฮ่องสอน)

ผักเข้าตอง ผักคาวตอง ผักคาวปลา (ภาคเหนือ)

ผักคาวทอง พลูคาว (ภาคกลาง)

พืชในวงศ์ (family) Saururaceae แบ่งได้ตาม Genus และ Species ต่างๆดังนี้



พลูคาวเป็นพันธุ์ไม้ล้มลุกอายุหลายปี พบได้ทั่วไปในทวีปเอเชียตั้งแต่แถบเทือกเขาหิมาลัย ไปจนถึงเวียดนาม รวมทั้งไทยและญี่ปุ่น สำหรับในประเทศไทยพลูคาวจะเป็นพันธุ์ไม้ทางภาคเหนือ ทั้งต้นมีกลิ่นคาวจึงเรียกกันว่าคาวตอง นิยมนำมารับประทานเป็นผักจิ้มปลาร้าและลาบ ทางภาคกลางไม่ค่อยเป็นที่รู้จักนัก (ชุมนุมสมุนไพร, 2543)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ชุมนุมสมุนไพร, 2543 และ พร้อมจิตรและคณะ, 2543)

ต้น : พลูคาวเป็นพันธุ์ไม้ล้มลุกขนาดเล็กที่มีอายุหลายปี สูงประมาณ 6-20 นิ้ว ลำต้นสีเขียว ทอดไปตามพื้นดิน ส่วนโคนที่แตะดินจะมีรากงอกออกมาตามข้อของลำต้น

ใบ : ออกใบเดี่ยว เรียงสลับกันไปตามข้อ ใบเป็นรูปหัวใจ ปลายใบแหลม โคนใบเว้าขอบใบเรียบ มีสีเขียวท้องใบจะมีลายสีม่วงอ่อน ๆ ขนาดของใบกว้าง 1.5-2.0 นิ้ว ยาว 1.5-3.0 นิ้ว ก้านใบยาว 0.5-1.5 นิ้ว ส่วนก้านใบจะห่อลำต้นไว้ เมื่อนำใบมาขยี้จะมีกลิ่นคาวปลา

ดอก : ออกเป็นช่อตรงปลายยอดของต้น ช่อดอกประกอบด้วยดอกเล็ก ๆ จำนวนมากติดกันแน่นเป็นรูปทรงกระบอกยาว 1 นิ้ว ดอกสีขาวออกเหลือง ในแต่ละช่อนั้นจะมีกลีบรองดอกสีขาวอยู่ 4 กลีบ ปลายกลีบมน

ผล : เมื่อดอกแก่หรือร่วงโรยไปจะกลายเป็นผล ผลมีลักษณะกลมรี ตรงปลายผลแยกออกเป็น 3 แฉก จะออกรวมตัวเรียงกันแน่นยาวเป็นรูปทรงกระบอก เมล็ดรูปมนรี

การเจริญเติบโต : เป็นพรรณไม้กลางแจ้งปลูกได้งามดีในที่ลุ่มต่ำแฉะ และขึ้นได้ง่าย ขยายพันธุ์ได้ด้วยการตัดเอามาปักก็ขึ้นได้

สรรพคุณในตำหรับยาไทย (อรุณพร, 2532 และชุมนุมสมุนไพร, 2543)

ต้น : ใช้รักษาโรคติดเชื้อและทางเดินหายใจ ฝีหนองในปอด ปอดบวม ปอดอักเสบ ไข้มาลาเรีย แก้บิด ขับปัสสาวะ ลดอาการบวมน้ำ นิ่ว ขับระดูขาว ริดสีดวงทวาร แก้โรคผิวหนัง ผื่นคัน ฝีฝักบัว แผลเปื่อย ติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ แก้ไอ หลอดลมอักเสบ หูชั้นกลางอักเสบ

ราก : ขับปัสสาวะ

ใบ : แก้บิด หัด โรคผิวหนัง ริดสีดวงทวาร หนองใน ใช้ปรุงเป็นยาแก้กามโรค ทำให้แผลแห้งเร็ว แก้โรคข้อและแก้โรคผิวหนังทุกชนิด

องค์ประกอบทางเคมี

พิทยา (2543) ได้จำแนกองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรกว้าง ๆ ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. primary metabolite เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของพืชโดยทั่วไป พบในพืชทุกชนิดเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสง เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน กรดอินทรีย์ต่าง ๆ กรดอะมิโน

2. secondary metabolite เป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ลักษณะพิเศษ โครงสร้างโมเลกุลค่อนข้างซับซ้อนกว่ากลุ่มแรกเพราะสารเหล่านี้เกิดจากการนำ primary metabolite มาผ่านกระบวนการทางชีวภาพและเมตาบอลิซึมในเซลเสียก่อนเกิดการสังเคราะห์ได้สารอินทรีย์ใหม่ ๆ ซึ่งมีอยู่หลายกลุ่ม เช่น อัลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ สเตอรอยด์ แทนนินและน้ำมันหอมระเหย เป็นต้น

ส่วนใหญ่สารพวก secondary metabolite จะมีสรรพคุณทางยา เช่น อัลคาลอยด์ ชื่อ reserpine จากรากระย่อมมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ไกลโคไซด์จากใบขี้เหล็กและใบมะขามแขกมีฤทธิ์เป็นยาระบายและฆ่าเชื้อ แทนนินจากใบฝรั่งและกล้วยน้ำว้าดิบมีฤทธิ์ฝาดสมานและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ เป็นต้น แต่ก็ไม่เสมอไป สารพวก primary metabolite บางตัวก็สามารถออกฤทธิ์ในการรักษาโรคได้เช่นกัน นอกจากนี้การศึกษาทางเภสัชวิทยายังพบว่าสรรพคุณทางยาของสมุนไพรชนิดหนึ่งอาจไม่ใช่เกิดจากสารออกฤทธิ์เพียงชนิดเดียวเท่านั้น แต่มักเกิดจากสารหลายชนิดมาออกฤทธิ์ร่วมกัน อาจเป็นกลุ่มของ primary metabolite หรือ secondary metabolite หรือทั้งสองกลุ่มก็ได้ ดังนั้นจึงไม่แปลกที่สารสกัดบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพรจะออกฤทธิ์ได้ไม่ดีเท่าสารสกัดหยาบ

จากการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของใบพลูคาวพบว่า มีสารประกอบหลักอยู่ 3 กลุ่มด้วยกันดังนี้

1. กลุ่มน้ำมันหอมระเหย (volatile oil)

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่มีกลิ่นที่ได้จากการสกัดจากพืชโดยทำการกลั่นไอน้ำ (steam distillation) สารนี้สามารถระเหยได้ในอากาศที่อุณหภูมิปกติ บางครั้งอาจเรียกน้ำมันหอมระเหยว่า essential oils ซึ่งมาจากคำว่า essences (perfume น้ำหอม) การที่พืชมีน้ำมันหอมระเหยและระเหยได้นี้เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว น้ำมันหอมระเหยอาจเกิดขึ้นได้โดยตรงจาก protoplasm หรือเกิดจากการสลายตัวของชั้น resinogenous ของผนังเซล (cell wall) บางชนิดอาจเกิดโดยการ hydrolysis ของ glycosides แต่จะพบน้ำมันหอมระเหยได้ในเกือบทุกส่วนของพืช เช่น ยอดตูม ดอก ใบ เปลือก ลำต้น ผล เมล็ด ราก และเหง้า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ใหม่ ๆ มักจะไม่มีสี แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ในที่มีแสงและอากาศนาน ๆ จะถูก oxidized และเกิด resinify ทำให้สีคล้ำขึ้น จึงควรเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อากาศเย็นและแห้ง (เอื้อพร, 2531)

ในปี 1967 Jenkins *et al.* อ้างโดย ขจรศักดิ์ (2539) ได้จำแนกองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยซึ่งได้ไว้ดังนี้

1. ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) จะมีพวก acyclic เช่น heptane และ myrcene ส่วน isocyclic ได้แก่ pinene, camphene และ limonene เป็นต้น
2. แอลกอฮอล์ (alcohol) อาจปรากฏเป็นอิสระหรืออยู่รวมกับกรดกลายเป็นเอสเทอร์ (ester) ได้แก่ linalool, geraneol และ citronellol เป็นต้น
3. อัลดีไฮด์ (aldehyde) ได้แก่ benzaldehyde และ cinnamic aldehyde เป็นต้น
4. คีโตน (ketone) ได้แก่ camphore, carvone และ menthone เป็นต้น
5. ฟีนอล (phenol) ได้แก่ anethol, eugenol และ carvecrol เป็นต้น
6. กรด (acid) บางครั้งปรากฏอยู่ในรูปอิสระในปริมาณที่น้อย โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของ acetic acid, propionic acid, butyric acid เป็นต้น บางครั้งจะรวมกับแอลกอฮอล์กลายเป็นเอสเทอร์
7. ซัลเฟอร์ (sulfer) เช่น allyl และ isothiocyanate (mustard oil)

อัมพิกา (2540) ได้ศึกษาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากการกลั่นไอน้ำส่วนเหนือดินของพลูคาวด้วยไอน้ำ โดยเปรียบเทียบสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้จากต้นพลูคาวที่ปลูกในประเทศไทยกับต้นพลูคาวที่ปลูกในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งพบว่าน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสาร 3 ชนิด คือ capryl aldehyde, 2-undecanone และ lauryl aldehyde เหมือนกันแต่ปริมาณต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบปริมาณสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดโดยการกลั่นด้วยไอน้ำต้นพลูคาวสดที่ปลูกในประเทศไทยและญี่ปุ่น

สารที่พบ	%สารที่พบ	
	ไทย	ญี่ปุ่น
Capryl aldehyde	13.36	5.59
2-undecanone	9.10	20.95
Lauryl aldehyde	8.03	2.24

ที่มา อัมพิกา (2540)

จากตารางที่ 1 พบว่าปริมาณของสารในน้ำมันหอมระเหยที่พบในประเทศไทยและญี่ปุ่น มีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยปริมาณของ capryl aldehyde และ lauryl aldehydeที่พบในประเทศไทยมีปริมาณมากกว่าที่พบในญี่ปุ่น ส่วนพลูคาวที่ปลูกในประเทศญี่ปุ่นมีปริมาณของ 2-undecanone มากกว่าพลูคาวที่ปลูกในประเทศไทย การที่สารในน้ำมันหอมระเหยมีปริมาณที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม พื้นที่ สภาพอากาศที่แตกต่างกัน จึงอาจมีผลทำให้ปริมาณสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยแตกต่างกัน

ในปี ค.ศ. 1972 Kameoka *et al.* อ้างโดยแน่งน้อย (2541) ได้ทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยไอน้ำจากใบและกิ่งพลูคาวที่ปลูกในประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีส่วนประกอบเป็นสารเคมี 32 ชนิดด้วยกันได้แก่ α และ β-pinene, camphene, β-rnyrcene, limonene, 1,8-cineol, ocimene, p-cymene, terpinolene, β-caryophyllene, humulene, leaf alc., linalool, terpinene-4-ol, l-nonanol, l-decanolnerol, geraniol, 1-dodecanol, 1-tridecanol, nonanal, decanal, dodecanal, 3-ketodecanal, methyl-n-nonyl ketone, methyl-n-undecyl ketone, methyl lauryl sulfide, capric acid, thymol, carvacrol, o-cresol และ p-cersol ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ อรุณพร (2532) และ วีณา (2543)

ซึ่งพบว่าต้นพลูคาวมีน้ำมันหอมระเหยที่มีสาร decanoyl acetaldehyde, capric acid, lauric aldehyde, methyl-n-noyl ketone เช่นกัน โดยคาดว่าสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของพลูคาวน่าจะได้แก่ methyl-n-nonyl ketone และ methyl lauryl sulfide น้ำมันหอมระเหยจากพลูคาวมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราและยีสต์ อีกทั้งน้ำมันพลูคาวยังมีพิษน้อยมาก จึงมักถูกนำไปใช้รักษาโรค ต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว

ฤทธิ์ต้านไวรัส มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากพลูคาวซึ่งประกอบด้วย n-decyl aldehyde, dodecyl aldehyde และ methyl-n-nonyl ketone สามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสที่เป็นสาเหตุของไข้หวัดใหญ่ในหลอดทดลองได้ โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 41 vol/vol % ต่อมา Hayashi *et al.*(1995) จากมหาวิทยาลัยโตโยมา ประเทศญี่ปุ่น ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยรวมทั้งสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่มีต่อไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม 3 ชนิด ได้แก่ herpes simplex virus type-1 (HSV-1) ไวรัสไข้หวัดใหญ่และไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเอดส์ (HIV-1) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากใบพลูคาวมีฤทธิ์ในการฆ่าไวรัสดังกล่าวโดยปราศจากความเป็นพิษต่อเซลแต่ไม่สามารถยับยั้งไวรัสที่ปราศจากเปลือกหุ้ม 2 ชนิด คือ โปลิโอไวรัส และ coxsackie virus ซึ่งสารที่สำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยได้แก่ methyl-n-nonyl ketone, lauryl aldehyde และ capryl aldehyde มีผลในการ inactivate ไวรัสทั้ง 3 ชนิดเช่นเดียวกัน ดังนั้นผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากพลูคาวมีฤทธิ์ในการฆ่าไวรัสชนิดที่มีเปลือกหุ้ม โดยการรบกวนการทำงานของเปลือกหุ้มของไวรัส

2. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่ทำให้เกิดสีสันต่าง ๆ ของพืชในธรรมชาติ ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่มีคาร์บอน 15 ตัว จัดเรียงตัวในระบบ 3-ring เรียก A- , B- , C-ring โดยมี A และ B เป็น phenyl ring และ C เป็น lactone ring แบ่งออกตามโครงสร้างได้มากกว่า 10 กลุ่ม และในแต่ละกลุ่มยังแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ ได้อีก ในอดีตฟลาโวนอยด์ ยังได้รับการนิยมว่ามีคุณค่าทางอาหาร เรียกว่า vitamin P (permeability) แต่เมื่อไม่มีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารนี้จึงเปลี่ยนมาใช้ชื่อว่า bio-flavonoid เชื่อกันว่า สารนี้มีฤทธิ์ต่อหลอดเลือดฝอย (อ้อมบุญ, 2536)

อรุณพร (2532) และ วีณา (2543) รายงานว่าพบสารฟลาโวนอยด์ 6 ชนิด ได้แก่ flavones, quercetin, rutin, hyperin, afzelin และ isoquercitrin โดยในส่วนใบมีปริมาณ quercitrin สูงที่สุด ส่วนของช่อดอกมีปริมาณ quercitrin และ hyperin สูง ส่วนกิ่งมีสารเหล่านี้เพียงเล็กน้อย นอกจากนั้นยังพบอีกว่า quercetin ซึ่งเป็น flavonol glycocide แยกได้จากใบพลูคาวเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์เป็นยาขับปัสสาวะ ส่วน rutin ช่วยเพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดฝอย นอกจากนั้นยังพบว่าสารจำพวกฟลาโวนอยด์ที่พบในพลูคาวยังมีฤทธิ์เสริมฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ของเบต้าแคโรทีน ทำให้มีประโยชน์ในการการผลิตเครื่องสำอางค์ อาหารและเวชภัณฑ์

3. สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloids)

อัลคาลอยด์เป็นกลุ่มสารที่ได้จาก secondary metabolism ลักษณะที่สำคัญของอัลคาลอยด์เป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมักอยู่ใน heterocyclic system ส่วนใหญ่มีฤทธิ์เป็นด่างและได้จากพืชชั้นสูง แต่มีการกระจายตัวในพืชจำกัดเฉพาะในพืชบางตระกูลเท่านั้น อัลคาลอยด์ที่พบในพลูคาวมี 2 กลุ่ม ด้วยกันคือ กลุ่มแรกเป็นอนุพันธุ์ของ pyridine และ 1,4-dihydropyridine ได้แก่ 3,5-didecanoyl pyridine, 3-decanoyl-6-nonylpyridine และ 3,5-didecanoyl-4-nonyl-1,4-dihydropyridine กลุ่มที่ 2 เป็นอนุพันธุ์ของ aporphine ได้แก่ cepharanoneB, cepharadione B, 7-chloro-6-demethyl-cepharadione B, norcepharacdione B และอัลคาลอยด์ที่พบเป็นครั้งแรกในพลูคาวอีก 2 ชนิด คือ aristolactam A II และ piperolactam A (เอื้อพร, 2531)

มีการรายงานเพิ่มเติมว่า สารสกัดจากใบพลูคาวมีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและลดอาการบวมและมีฤทธิ์ในการต้านการจับตัวของเกล็ดเลือดและมีความเป็นพิษต่อเซล ในปี 1993 นั้น Probstle *et al.* ได้ทำการสกัดสารจากใบพลูคาวโดยใช้ตัวทำละลายคือ เฮกเซน พบว่าสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ได้ และเมื่อทำการกำจัดคลอโรฟิลล์ แล้วทำการแยกสารสกัดเฮกเซนบนแผ่นซิลิกาเจล พบสารบริสุทธิ์ 6 ชนิด คือ aristolactam cepharanone B, Phytol, Stigmast-4-ene-3,6-dione และอีก 3 ชนิดที่ยังไม่ถูกวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีสารบริสุทธิ์สารใดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase ได้ดีเท่ากับสารสกัดเฮกเซนหยาบ อาจเพราะภายในสารสกัดเฮกเซนดังกล่าวยังมีสารอื่นที่ช่วยทำให้สารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดียิ่งขึ้น

การเกิดสารเคมีที่สำคัญภายในเซลของพืชสมุนไพร ประกอบด้วยชนิดของสารและปริมาณของสารต่างชนิดกันหรือคล้ายกันของสมุนไพรแต่ละชนิดขึ้นกับสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชด้วยเพราะการดำรงชีวิตของพืชขึ้นอยู่กับกระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) (ขจรศักดิ์, 2539)

$$6CO_2 + 6H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + \text{energy}$$

กล่าวคือ เมื่อพืชดูดน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานจากแสงแดดได้ออกซิเจนเข้าสู่กระบวนการหายใจและคาร์โบไฮเดรตเข้าสู่กระบวนการต่าง ๆ คือ กระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) กระบวนการไตรคาร์บอกซิลิกแอซิดหรือกระบวนการเครบส์ (tricarboxylic acid cycle

or Kreb's cycle) ได้สารประกอบมากมาย ได้แก่ กรดอะมิโน(amino acid) กรดไขมัน(fatty acid) กลีเซอรอล (glycerol) ด่าง (alkali) กรด (acid) อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคซายด์ (glycosides) สารเมือกมิวซิเลจ (mucilage) สารเมือกกัม (gum) น้ำยางลาเทกซ์ (latex) สารฝาด (tannin) และน้ำมันระเหยง่าย (volatile oil) สารประกอบดังกล่าวที่ได้จากสมุนไพรขึ้นกับกระบวนการชีวสังเคราะห์สาร (biosynthesis) ของพืชแต่ละชนิดและแหล่งที่อาศัย (habitat or Geographical source) ถ้าพืชชนิดเดียวกันนำไปปลูกในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ก็อาจสร้างสารประกอบต่างกัน ทำให้องค์ประกอบสำคัญในพืชเปลี่ยนไป

2.3 วิธีการสกัดสาร (อนุศักดิ์, 2538 , ขจรศักดิ์, 2539 และแสงหล้า, 2543)

การสกัดสารทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน วิธีเหล่านี้ได้แก่

2.3.1 การหมักหรือการทำให้วัสดุอ่อนนุ่มโดยการแช่สารละลาย (Maceration)

เป็นการสกัดสาร โดยการแช่ตัวอย่างพืชกับตัวทำละลายในภาชนะปิดสนิท เขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลา รินเอาสารสกัดออก สกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ได้สารมากที่สุด วิธีนี้มีข้อดีคือสารไม่สัมผัสความร้อนแต่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.3.2 การสกัดแบบ Percolation

เป็นการสกัดสารแบบต่อเนื่อง โดยการแช่พืชกับตัวทำละลายจนอิ่มตัว แล้วเติมตัวทำละลายให้สูงกว่าระดับพืช 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง เริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยคอยเติมตัวทำละลายเอาไว้อย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ วิธีนี้สารไม่สัมผัสความร้อนแต่ใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก

2.3.3 การสกัดด้วย Soxhlet apparatus

เป็นการสกัดแบบต่อเนื่องใช้เวลาประมาณ 8-24 ชั่วโมง วิธีนี้ใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่เป็นผงละเอียดโดยต้มตัวอย่างให้เดือด แล้วไอของสารละลายที่เป็นตัวทำละลายจะไปหมุนเวียนไหลผ่านตัวอย่างผงพืชหลาย ๆ ครั้งโดยใช้ตัวทำละลายจุดเดือดต่ำ ขณะที่ตัวทำละลายไหลผ่านตัวอย่างนั้นจะทำการสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในพืชออกมาด้วย แล้วไหลกลับสู่ภาชนะรองรับซึ่งให้ความร้อนตลอดเวลาตัวทำละลายจะระเหยกลับขึ้นไปใหม่ โดยระเหยผ่านท่อทำความเย็น (condenser) แล้วจับตัวเป็นหยดไหลลงไปในตัวอย่างพืชใหม่ วิธีนี้ใช้ตัวทำละลายน้อย แต่สารสัมผัสความร้อนอาจทำให้สารบางตัวสลายได้

2.3.4 Liquid-liquid Extraction

เป็นการสกัดสารจากสารละลายที่เป็นของเหลว ด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกัน วิธีการนี้ยังแบ่งย่อยออกได้เป็น 2 ชนิด คือ Extractant Lighter คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าสารละลายที่ถูกสกัด และ Raffinate Lighter คือสารละลายที่ถูกสกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้สกัด

2.3.5 การกลั่นด้วยไอน้ำ

วิธีนี้ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติสามารถละลายและระเหยออกมาพร้อมกับไอน้ำ เช่น พวกน้ำมันหอมระเหย เป็นต้น การกลั่นด้วยไอน้ำได้แก่

(1) การกลั่นไอน้ำทางตรง (direct steam distillation)

เป็นการกลั่น โดยให้สารที่ต้องการแยกและน้ำอยู่ในภาชนะเดียวกัน มักใช้กับพืชสด โดยต้มสารตัวอย่างกับน้ำโดยตรง จนเดือดเป็นไอ ไอน้ำจะพาสารที่ระเหยได้ออกมา แล้วกลั่นเป็นของเหลวที่เครื่องควบแน่นโดยของเหลวจะแยกชั้นกับน้ำ เช่น การกลั่นน้ำมันหอมระเหย วิธีการนี้ใช้ได้ดีถ้าสิ่งเจือปนไม่ระเหยพร้อมกับไอน้ำ

(2) การกลั่นไอน้ำทางอ้อม (indirect steam distillation)

เป็นการกลั่นโดยให้ไอน้ำผ่านตัวอย่างที่ต้องการแยก ใช้ในการกลั่นสารอินทรีย์ที่มีจุดเดือดสูงและสลายตัวที่จุดเดือดของมัน เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการแยกสารออกจากผลิตผลจากธรรมชาติ ซึ่งถ้านำไปกลั่นโดยตรงจะทำให้เกิดการเดือดอย่างรุนแรงและทำให้เกิดการไหม้ของสาร การกลั่นไอน้ำทางอ้อมทำได้โดยใส่สารที่ต้องการกลั่นในขวดกลั่นแล้วผ่านไอน้ำจากหม้อต้มเข้าไปยังขวดกลั่น ไอน้ำจะพาสารระเหยได้ออกมาแล้วกลั่นเป็นของเหลวที่ควบแน่นเช่นเดียวกับการกลั่นด้วยไอน้ำโดยตรง

2.3.6 การสกัดโดยวิธีแยกชั้น (partition)

การสกัดแบบนี้มักจะใช้สำหรับตัวอย่างพืชสด โดยนำมาหั่นเป็นท่อนสั้น ๆ ปั่นกับตัวทำละลายในเครื่องปั่น (blender) แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง สารละลายที่ได้นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วจึงนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพต่อไปอีกครั้ง

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ ต้องแยกชั้นกับตัวทำละลายอีกตัวหนึ่ง, สามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้, ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป, ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด , ไม่เป็นสารพิษ และมีราคาถูก ตัวทำละลายอาจเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามากได้ดังนี้

Cyclohexane > Carbon tetrachloride > Ethylene trichloride > Toluene > Benzene > Dichloromethane > Chloroform > Ethyl ether > Ethyl acetate> Acetone > Ethanol > Methanol > น้ำ

2.4 การทำให้สารสกัดเข้มข้น (อนุศักดิ์, 2538)

เมื่อสกัดสารด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งแล้ว ปริมาตรตัวทำละลายจะมากและทำให้สารสกัดเจือจาง จึงต้องทำให้เข้มข้นขึ้น ซึ่งมีหลายวิธีการดังนี้

2.4.1Free Evaporation

คือการระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจาก water bath บางครั้งอาจเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดก็ได้ วิธีการนี้สารสัมผัสความร้อน อาจทำให้สารบางตัวสลายได้

2.4.2 Distillation under reduced pressure

เป็นวิธีการระเหยแห้งที่อุณหภูมิต่ำและลดความดัน โดยใช้ vaccuum pump วิธีการนี้อาจทำให้สารบางตัวสูญเสียไป เนื่องจากการระเหยของสารแต่สารไม่สัมผัสความร้อน ความสูญเสียเนื่องจากความร้อนจึงน้อยลง

2.4.3 Ultrafiltration

วิธีการนี้อาศัยหลักการการเลือกผ่านของ membrane ซึ่งจะยอมให้สารที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดรูของ membrane ผ่านได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่จะติดอยู่บนผิว ดังนั้นสารที่ต้องการศึกษาหากใช้วิธีการนี้จะต้องเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จึงจะสามารถใช้ได้

2.5 การแยกองค์ประกอบของสารโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี (Chromatography) (กฤษณา, 2529)

โครมาโตกราฟี (Chromatography) คือ วิธีการหรือเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารประกอบออกจากกันหรือออกจากของผสมโดยอาศัยหลักการที่สารประกอบแต่ละชนิดสามารถแบ่งแยกตัวเอง (partition) อยู่ระหว่างส่วนที่ตรึงอยู่กับที่ (stationary phase) และส่วนที่เคลื่อนไป (mobile phase) ทั้งนี้โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารประกอบนั้น ๆ หากสารมีปฏิกิริยากับส่วนที่ตรึงอยู่กับที่ (stationary phase) ได้ดี สารก็จะเคลื่อนที่ได้ช้า หากสารมีปฏิกิริยากับส่วนที่เคลื่อนที่ (mobile phase) ได้ดี สารก็จะเคลื่อนที่ได้เร็ว โดยหลักการนี้จึงสามารถแยกสารจากกันได้

คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารประกอบที่จะทำให้เกิดการแยกโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี ได้แก่

1. ความสามารถในการละลายของสารประกอบในตัวทำละลาย (solvent) และความสามารถในการแยกตัว (partition) ของสารประกอบในตัวทำละลายสองชนิดซึ่งไม่ผสมกัน
2. ความสามารถในการถูกดูดซับ (adsorption) ของสารประกอบโดยของแข็งที่มีรู (porous solid substance) หรืออีกนัยหนึ่ง คือ ความสามารถในการดูดซับของของแข็งที่มีรูต่อสารประกอบต่าง ๆ
3. สำหรับก๊าซโครมาโตกราฟี การระเหยของสารเป็นคุณสมบัติที่สำคัญ

การจัดจำแนกชนิดของโครมาโตกราฟีที่พิจารณาจากชนิดของเครื่องมือหรือเทคนิคที่ใช้ สามารถแบ่งได้ดังนี้

1. โครมาโตกราฟีผิวบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC)

คือโครมาโตกราฟีชนิดที่ stationary phase มีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ แผ่กระจายอยู่บนสิ่งยึดเหนี่ยว เช่น แผ่นกระจก และ mobile phase เป็นของเหลว

2. โครมาโตกราฟีคอลัมน์(Column Chromatography, CC)

คือโครมาโตกราฟีชนิดที่ stationary phase มีลักษณะเป็นคอลัมภ์โดยที่ถูกบรรจุอยู่ในภาชนะรูปทรงกระบอก เช่น ท่อแก้ว และ mobile phase เป็นของเหลว

3. โครมาโตกราฟีกระดาษ (Paper Chromatography, PC)

คือโครมาโตกราฟีชนิดที่ stationary phase เป็น cellulose fibers อัดเป็นแผ่นบาง ๆ เหมือนกระดาษและ mobile phase เป็นของเหลว

4. โครมาโตกราฟีก๊าซ (Gas Chromatography, GC)

คือโครมาโตกราฟีชนิดที่ stationary phase อาจจะเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้และ mobile phase เป็นก๊าซ GC ใช้หลักในการแยกสารประกอบที่ระเหยได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

5. โครมาโตกราฟีแบบสมรรถภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

คือโครมาโตกราฟีคอลัมน์ที่ mobile phase ซึ่งเป็นของเหลวเคลื่อนที่ผ่าน stationary phase ซึ่งเป็นผงเล็กมากและอัดกันแน่นโดยอาศัยความดันสูง ซึ่งทำให้ mobile phase เคลื่อนที่ได้เร็ว และเป็นผลให้เกิดการแยกได้เร็ว

2.6 วิธีการทดสอบคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ (Antimicrobial activity tests) (วัชรี, 2543 และ ดำรงค์, 2537)

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ใช้หลักเดียวกับการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะที่นิยมมีหลายวิธี ได้แก่

2.6.1 Agar diffusion method โดยทำให้ตัวยาซึมเข้าไปในอาหารที่ได้ผสมจุลินทรีย์จำนวนพอเหมาะ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ อ่านผลการทดสอบโดยดูวงใสบนอาหารว่ามีหรือไม่ วิธีนี้ทำได้ 4 แบบ คือ

1. Agar disc diffusion method วิธีนี้ใช้ทดสอบสารปฏิชีวนะและน้ำมันหอมระเหยของพืช โดยนำแผ่นกระดาษซับ (absorbing pad) วงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6.0 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในสารสกัดแล้วนำมาวางบนจานเพาะเชื้อ แล้วดูผลจากวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การวัดบริเวณยับยั้งและประเมินผลจากการทดสอบต้องทำเปรียบเทียบกับชุดควบคุม วงใสที่เกิดขึ้นต้องมีขนาดกว้างกว่าชุดควบคุม ถ้ามีขนาดกว้างกว่าชุดควบคุม 3 มิลลิเมตร ถือว่าเชื้อนั้นไวต่อการทดสอบ (sensitive) ถ้าวงใสมีขนาดกว้างกว่าชุดควบคุม 2-3 มิลลิเมตร ก็ถือว่าเชื้อนั้นไวต่อการทดสอบปานกลาง (moderately sensitive) และถ้าวงใสมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดกว้างกว่าชุดควบคุมน้อยกว่า 2 มิลลิเมตรเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ก็จัดว่าเชื้อต้านทานต่อการทดสอบ (resistance) วิธีนี้อาจเรียกอีกอย่างว่า Paper disc method
2. Agar well method วิธีนี้ใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารที่สกัดได้จากพืช ทำโดยการเจาะวุ้นให้เป็นหลุมเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร หยดสารที่ต้องการทดสอบโดยใช้หลอดแคปปิลลารีลงในหลุมที่เจาะไว้
3. Cylindrical plate technique โดยการนำเอาวงแหวนทรงกระบอกเล็ก ๆ (Cylinder cup) ที่ปลายทั้งสองข้างวางบนผิวอาหารที่เพาะจุลินทรีย์ไว้แล้ว หยดสารที่ต้องการทดสอบลงในวงแหวนทรงกระบอกแล้วดูผลการฆ่าเชื้อของสารนั้น
4. Gradient plate technique เป็นวิธีการทดสอบสารปฏิชีวนะที่ใช้หลักการซึมของสารจากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าในอาหารวุ้น

2.6.2 Dilution method เป็นวิธีเจือจางสารที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอาจจะเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลวก็ได้ จากนั้นนำแบคทีเรียหรือเชื้อราไปเพาะเลี้ยงไว้แล้วสังเกตดูว่าเชื้อเจริญหรือไม่ โดยวิธีนี้เราสามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC)

2.6.3 Simplified disc procedure นำกระดาษที่ฆ่าเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำมาย้อมสี เช่น เมธิลีนบลู (methylene blue) ซึ่งสีที่ย้อมต้องเป็นสีที่ไม่เป็นอันตรายกับจุลินทรีย์ นำไปตากให้แห้ง เมื่อจะใช้นำ disc ใส่ลงในปลอกแก้วหรือพลาสติก ทำให้เปียกโดยหยดน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว กำจัดอากาศโดยใส่ disc ลงใน chamber ที่เล็กและปิดสนิท หรือปิดด้วยเทปพลาสติก เมื่อนำไปเพาะเชื้อสปอร์จะงอกภายใน 1-3 ชั่วโมงทำให้สีของเมธิลีนบลูจางลงจนมองไม่เห็น

2.6.4 Blood agar plate method วิธีนี้เร็วและมีประสิทธิภาพโดยมีเลือดเป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) โดยผสมเลือดลงในอาหารวุ้นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เทลงในจานอาหารให้สูงประมาณ 2 มิลลิเมตร รอให้อาหารแข็ง จากนั้นผสมจุลินทรีย์ที่จะทดสอบในหลอดที่มีอาหารวุ้นเหลวแต่ไม่ใส่เลือด เทลงบนผิวของอาหารที่ผสมเลือด รอให้แข็ง วาง disc ที่จุ่มยาปฏิชีวนะลงในจานอาหารแล้วนำไปเพาะเชื้อ หลังจากบ่มไว้ 2-6 ชั่วโมงจะเห็น zone สีแดงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากสารปฏิชีวนะไปมีผลต่อจุลินทรีย์ แต่ถ้าบริเวณรอบ disc ไม่มีสีแสดงว่าสารปฏิชีวนะไม่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญและทำลายเม็ดเลือดแดงจนแตก

2.6.5 Stokes method ในการทดสอบสารและตัวควบคุมจะถูกเปรียบเทียบกับ disc อื่น ๆ บนอาหารชนิดเดียวกัน ภายใต้สภาวะเดียวกัน แบ่งจานอาหารขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ออกเป็น สามส่วนแล้วเพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงส่วนกลาง โดยการ swap แล้วเพาะเชื้อควบคุมไว้ทั้งสองข้างที่เหลือ โดยเว้นส่วนกลางระหว่างพื้นที่ไว้ นำไปเพาะแล้วสังเกตและวัดขนาดของ zone