บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสารสกัดของพริกขี้หนูด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

เมื่อนำพริกขี้หนูสด สีแดงตัวอย่างละ 300 กรัม นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ได้ปริมาณร้อยละของสารสกัดหยาบและลักษณะทางกายภาพ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณร้อยละโดยมวลและลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากพริกขี้หนูสดผลสีแดงด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ส่วนสกัดหยาบ	ร้อยละส่วนสกัดหยาบ	ลักษณะทางกายภาพ
เฮกเซน	0.04	เป็นของแข็งสีส้ม มีลักษณะเป็นไข
ไดคลอโรมีเทน	0.67	ของหนืดแห้งสนิทสีแดงเข้ม มีลักษณะเป็นไข
เมทานอล	1.50	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอมแดง

จากการใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันคือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ในการสกัดสารจากพริกขี้หนูสดสีแดงพบว่า ตัวทำละลายเมทานอลสามารถสกัดได้ปริมาณส่วนสกัดหยาบเมทานอลสูงสุด รองลงมาคือ ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน และตัวทำละลายเฮกเซนมีความสามารถในการสกัดสารน้อยที่สุด

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

4.2.1 ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ *Sarcina* sp., *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* โดยยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ Ciprofloxacin, Tetracycline และ Penicillin G ด้วยเทคนิค disc diffusion ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	Ciprofloxacin	Tetracycline	Penicillin G
Sarcina sp.	26.5 ± 1.91	30.5 ± 2.38	27.8 ± 2.21
E. coli	27.8 ± 0.96	28.0 ± 2.16	33.8 ± 0.96
B. subtilis	32.0 ± 1.41	35.5 ± 3.10	23.3 ±1.89
S. aureus	27.0 ± 1.63	25.5 ± 2.62	33.0 ± 2.45
P. aeruginosa	24.8 ± 2.08	23.0 ± 0.96	36.0 ± 1.63

ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะมาตรฐาน 3 ชนิด พบว่า ยาปฏิชีวนะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ทุกสายพันธุ์ โดยยา Ciprofloxacin และ Tetracycline มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยบริเวณยับยั้งเท่ากับ 32.0 และ 35.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ยา Penicillin G มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 36.0 มิลลิเมตร

4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยส่วนสกัดหยาบของพริกขี้หนู

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลของพริกขี้หนู ได้ผลดังตารางที่ 4.3-4.5

ตารางที่ 4.3 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของพริกขี้หนู ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
	ความเข้มข้น (mg / mL)				
	6.25	12.5	25	50	100
Sarcina sp.	-	-	7.3±0.47	7.7±1.25	8.0±0.47
E. coli	-	-	6.7±0.47	6.7±0.47	7.0±0.82
B. subtilis	-	-	7.3±0.47	7.7±0.47	8.5±1.40
S. aureus	-	-	-	-	7.2±0.63
P. aeruginosa	-	-	6.7±0.54	6.7±0.74	7.0±1.48

ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของพริกขี้หนูที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ความเข้มข้น (mg / mL)				
	6.25	12.5	25	50	100
Sarcina sp.	-	6.7±0.47	7.6±0.94	7.6±0.82	8.3±0.47
E. coli	7.3±0.82	7.3±0.47	7.6±0.48	8.3±0.47	8.5±0.47
B. subtilis	10.0±0.45	11.0±0.44	11.8±0.47	13.0±0.47	14.3±1.70
S. aureus	6.4±0.43	6.8±0.47	7.7±0.54	8.0±0.47	8.6±0.47
P. aeruginosa	8.2±0.47	7.0±0	8.3±0.81	8.3±0.81	8.7±0.47

ตารางที่ 4.5 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยส่วนสกัดหยาบเมทานอลของพริกขี้หนูที่ความเข้มข้นต่างๆ

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ความเข้มข้น mg / mL				
	6.25	12.5	25	50	100
Sarcina sp.	7.7±0.47	7.7±1.14	9.7±0.57	10.0±1.24	10.0±0.47
E. coli	7.7±0.43	7.3±0.47	7.7±0.47	8.7±0.47	9.3±0.47
B. subtilis	13.3±0.52	7.7±0.43	22.0±0.56	24.3±0.58	41.7±0.56
S. aureus	-	6.6±0.47	7.7±0.47	8.3±0.48	8.3±0.47
P. aeruginosa	7.4±0.44	6.3±0.56	8.0±0.63	8.7±0.47	8.9±0.45

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอลของพริกขี้หนู พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะแปรผันตามความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบ เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบที่ 6.25 และ 12.5 mg / mL จะพบว่า ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แต่ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนและส่วนสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 6.4 -13.3 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบ 25 mg / mL

พบว่า ส่วนสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้สูงสุด รองลงมาคือ ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดหยาบเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่ำสุด โดยสารสกัดจากพริกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. Subtilis* รองลงมาคือ *Sarcina* sp., *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่า ตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทนสามารถสกัดสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจากพริกขี้หนูได้ และเนื่องจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลได้ปริมาณร้อยละส่วนสกัดหยาบ 1.50 ซึ่งสูงกว่าการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน(ร้อยละส่วนสกัดหยาบ 0.67)

จากการศึกษาของ Conforti *et.al.* (2007) ที่พบว่าสารเคมีในพริกมีสูงสุดในระยะที่พริกมีสีแดง และส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองโดยส่วนสกัดหยาบเมทานอลจากพริกขี้หนูสดสีแดง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนและ เฮกเซน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของภัค (2547) โดยสารสกัดจากพริกขี้หนูมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ จากการทดลองของ careaga *et. al.* (2003) พบว่าสารสกัดจากพริกหวาน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ดังนั้นเมทานอลจึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์จากพริกและนำส่วนสกัดหยาบเมทานอลไปแยกสารออกฤทธิ์และทดสอบฤทธิ์ต่อไป

4.3 ผลการแยกสารที่ออกฤทธิ์

4.3.1 การแยกสารที่ออกฤทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเมทานอลและการทดสอบฤทธิ์

นำส่วนสกัดหยาบเมทานอลของพริกขี้หนู 32 กรัม มาละลายด้วยตัวทำละลายเฮกเซน แยกส่วนที่ไม่ละลายออกมาและนำไปละลายต่อด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน แยกส่วนที่ไม่ละลายออกมาสามารถแยกได้ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดย่อยเมทานอล ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณและลักษณะทางกายภาพดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณและลักษณะทางกายภาพของส่วนสกัดย่อย

ส่วนสกัดย่อย	ปริมาณส่วนสกัดย่อย		ลักษณะทางกายภาพ
	น้ำหนัก (g)	ร้อยละ	
เฮกเซน (MH)	0.76	2.39	ของเหลวหนืดสีเขียวขี้ม้า
ไดคลอโรมีเทน (MC)	1.23	3.85	ของเหลวหนืดสีเขียวขี้ม้า
เมทานอล (MM)	30.00	93.76	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

การแยกส่วนสกัดหยาบเมทานอลของพริกขี้หนู ได้ส่วนสกัดย่อยเมทานอลสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 93.76 รองลงมาคือ ส่วนสกัดย่อยไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ตามลำดับ นำส่วนสกัดย่อยมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ได้ผลดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ของส่วนสกัดหยาบเมทานอล(M) สารสกัดย่อยเฮกเซน (MH) สารสกัดย่อยไดคลอโรมีเทน(MC) และส่วนสกัดย่อยเมทานอล(MM) จากพริกขี้หนู ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง(มิลลิเมตร)			
	M	MH	MC	MM
Sarcina sp.	9.0±1.00[a]	8.3±0.58[a]	7.6±1.15[ab]	6.3±0.58[b]
E. coli	8.3±1.15	8.3±0.58	7.0±0.00	7.7±0.58
B. subtilis	20.3±0.58[b]	22.6±1.53[a]	19.3±1.53[bc]	17.3±0.58[c]
S. aureus	-	-	-	-
P. aeruginosa	7.7±1.15	9.0±1.00	7.6±1.15	6.7±0.57

a b c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ Duncan Multiple Range Test

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยส่วนสกัดหยาบเมทานอล(M) ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน(MH) ส่วนสกัดย่อยไดคลอโรมีเทน(MC) และส่วนสกัดย่อยเมทานอล(MM) พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากพริกขี้หนู 25 mg/mL ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ส่วนสกัดหยาบเมทานอล ส่วนสกัดย่อยไดคลอโรมีเทน และส่วนสกัดย่อยเมทานอล โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง 22.6, 20.3, 19.3 และ 17.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *B. subtilis* ของส่วนสกัดย่อยต่างๆ พบว่า ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน (MH) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยไดคลอโรมีเทน(MC) และส่วนสกัดย่อยเมทานอล ตามลำดับ

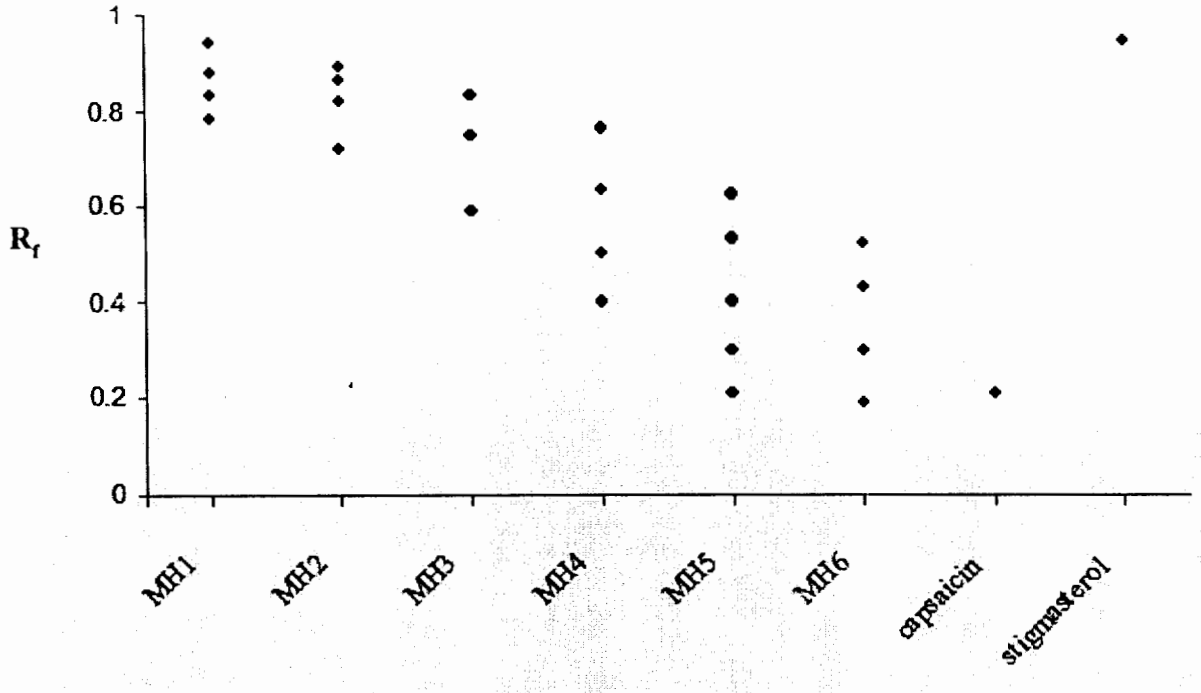
จากการแยกส่วนสกัดหยาบเมทานอลทำให้ทราบว่าสารออกฤทธิ์อยู่ในส่วนสกัดย่อยเฮกเซนและส่วนสกัดย่อยไดคลอโรมีเทน แต่ในการทดลองนี้ได้เลือกเฉพาะส่วนสกัดย่อยเฮกเซนเพื่อนำมาแยกต่อโดยเทคนิค Quick Column Chromatography ต่อไป

4.3.2 ผลการศึกษาการแยกส่วนสกัดโดยเทคนิค Quick Column Chromatography และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์

การแยกส่วนสกัดย่อยเฮกเซน 2.161 g โดยเทคนิค Quick Column Chromatography ใช้ซิลิกาเจล 56 g เป็น stationary phase บรรจุลงใน Sinter glass ที่มีขนาด 150 mL โดยค่อยๆอัดซิลิกาเจลให้แน่นผิวหน้าเรียบเสมอกันชะด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และนำสารสกัดย่อยเฮกเซนที่ผสมกับซิลิกาเจล เทลงบนซิลิกาเจลที่อัดแน่นและปรับผิวหน้าให้เรียบเสมอกัน mobile phase ที่ใช้คือ เฮกเซนต่อไดคลอโรมีเทน โดยเริ่มใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่ำก่อน และเพิ่มความมีขั้วขึ้นไป ตามลำดับดังนี้คือ 100% เฮกเซน 25%ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน 50 %ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน 75%ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน 90%ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน และ 100%ไดคลอโรมีเทน จากนั้นนำแต่ละ fraction ไปตรวจสอบด้วย TLC ใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 2:1 รวม fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ระเหยตัวทำละลายออก ได้ส่วนสกัดย่อย 6 ส่วน คือ MH1-MH6 ดังตารางที่ 4.8 และลักษณะ TLC ของส่วนสกัดย่อย MH1-MH6, capsaicin และ stigmasterol ดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.8 ปริมาณและลักษณะทางกายภาพของส่วนสกัดย่อย MH1-MH6

ส่วนสกัดย่อย	ปริมาณส่วนสกัดย่อย		ลักษณะทางกายภาพ
	น้ำหนัก (g)	ร้อยละ	
MH1	0.0125	0.57	สีเหลืองอมเขียว ลักษณะเป็นไข
MH2	0.0518	2.39	สีเหลืองอมเขียว ลักษณะเป็นไข
MH3	0.0773	3.57	ของเหลวสีส้ม
MH4	0.1599	7.39	ของเหลวสีเขียวขี้ม้า
MH5	0.0057	0.26	ของเหลวสีเขียวขี้ม้า
MH6	0.2470	11.42	ของเหลวสีเขียว



รูปที่ 4.1 ลักษณะ TLC ของส่วนสกัดย่อย MH1-MH6 เปรียบเทียบกับสาร capsaicin และสาร stigmasterol

การแยกส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ด้วยเทคนิค Quick Column Chromatography พบว่า สามารถแยกส่วนสกัดย่อยได้ 6 กลุ่ม และสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด จากการตรวจสอบส่วนสกัดย่อยดังกล่าวด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 2:1 พบว่า สารสกัดย่อยที่สามารถแยกได้ในกลุ่มแรก(MH1-MH3) เป็นสารที่ไม่มีขั้ว ซึ่งดูได้จากค่า R_f ที่มีค่าสูง แสดงว่าสารที่แยกออกมาได้สามารถละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่ (ตัวทำละลาย) ทำให้สามารถเคลื่อนที่ไปได้ไกล ส่วนสารที่แยกได้ในกลุ่มหลังจะเป็นสารที่มีขั้วมากกว่ากลุ่มแรก ดูได้จากค่า R_f ที่มีค่าน้อย ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากสารที่แยกได้สามารถละลายได้ดีในวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เพียงเล็กน้อย และนอกจากนี้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ Stigmasterol(S) ซึ่งสามารถแยกได้จากส่วน MH1 ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพ เป็นผลึกรูปเข็ม สีขาวบริสุทธิ์ มีค่า R_f เท่ากับ 0.94 และสาร capsaicin(C) มีลักษณะทางกายภาพ เป็นของแข็งสีขาวขุ่น และมีค่า R_f เท่ากับ 0.22 ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยส่วนสกัดย่อย MH1-MH6

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยส่วนสกัดย่อยต่างๆ เปรียบเทียบกับสาร capsaicin(C) และ stigmaterol(S) ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผลดังตารางที่ 4.9 พบว่า ส่วนสกัดย่อย MH1 MH2 และ สาร stigmasterol ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ ส่วนสกัดย่อย MH3, MH4, MH5, MH6 และสาร capsaicin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Sarcina* sp., *P. aeruginosa* และ *E. coli* ตามลำดับ แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ของส่วนสกัดย่อย MH5 มีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือ MH6, MH3, capsaicin และ MH4 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 14.3, 11.6, 9.3, 8.6 และ 8.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยส่วนสกัดย่อย MH1-MH6 เปรียบเทียบกับสาร capsaicin(C) และ สาร stigmasterol(S) ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL

เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง (mm)							
	MH1	MH2	MH3	MH4	MH5	MH6	C	S
Sarcina sp	-	-	8.0±0.00	7.6±1.15	8.3±0.57	8.3±0.57	8.3±0.58	-
E. coli	-	-	7.0±0.00	7.6±1.15	7.6±1.15	8.0±1.00	7.9±1.00	-
B. subtilis	-	-	9.3±0.57	8.0±1.00	14.3±1.70	11.6±1.52	8.6±0.58	-
S. aeureus	-	-	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa	-	-	7.3±0.57	7.0±0.00	8.3±1.52	8.0±1.00	8.0±0.58	-

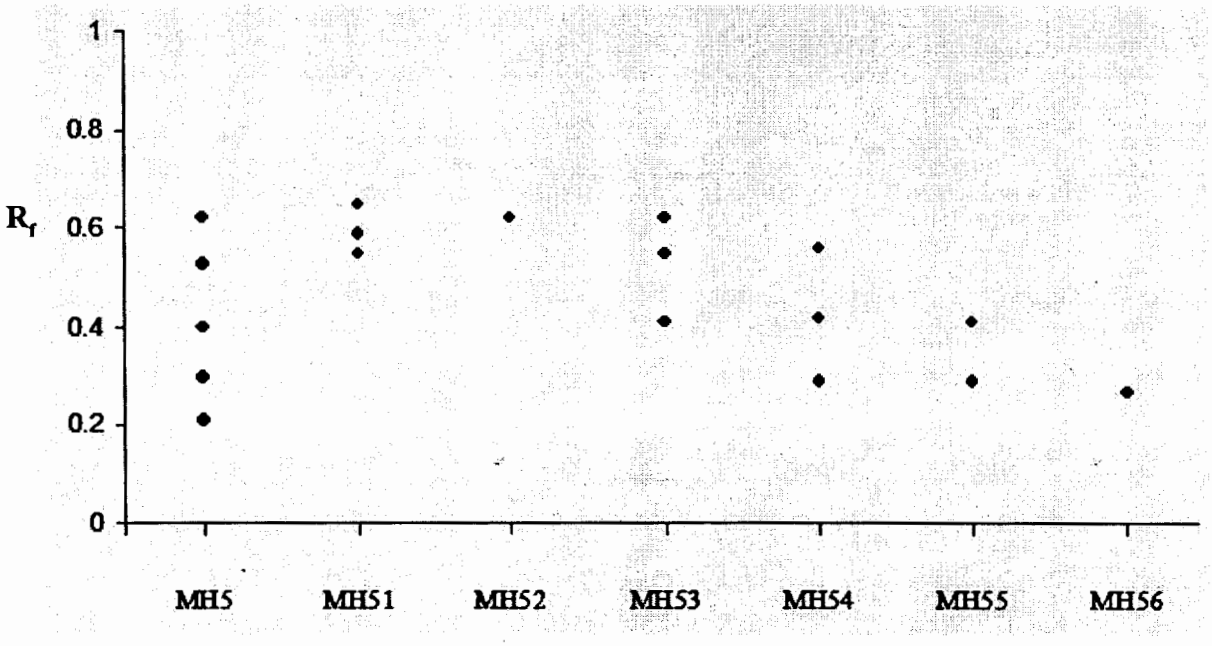
จากการแยกส่วนสกัดย่อยเฮกเซนด้วยเทคนิค Quick Column Chromatography ร่วมกับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ทราบว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีอยู่ในส่วนสกัดย่อย MH5 และ MH6 แต่เนื่องจากส่วนสกัดย่อย MH5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสูงสุดและมีร้อยละการแยกสูงกว่าจึงเลือกส่วนสกัดย่อย MH5 มาแยกต่อโดยเทคนิค Quick Column Chromatography

นำส่วนสกัดย่อย MH5 จำนวน 0.358 g แยกโดยเทคนิค Quick Column Chromatography ใช้ซิลิกาเจล เป็น stationary phase บรรจุลงใน Sinter glass ที่มีขนาด 60 mL และนำสารสกัดย่อย MH5 ที่ผสมกับซิลิกาเจลแล้ว เทลงบนซิลิกาเจลที่อัดแน่นและปรับผิวหน้าให้เรียบเสมอกัน mobile phase ที่ใช้คือ เฮกเซน ต่อเอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 6:1 จากนั้นนำแต่ละ fraction ไปตรวจสอบด้วย TLC ใช้ระบบตัว

ทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 2:1 รวม fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ระเหยตัวทำละลายออก สามารถแยกส่วนสกัดย่อยได้ 6 ส่วน ดังตารางที่ 4.10 และลักษณะ TLC ของส่วนสกัดย่อย MH51-MH56 ดังรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.10 ปริมาณและลักษณะทางกายภาพของสารสกัดย่อย MH51-MH56

ส่วนสกัดย่อย	ปริมาณส่วนสกัดย่อย		ลักษณะทางกายภาพ
	น้ำหนัก (g)	ร้อยละ	
MH51	0.1466	40.97	ของเหลวสีเหลืองอมเขียว
MH52	0.0031	0.86	ของเหลวสีส้ม
MH53	0.0115	3.21	ของเหลวสีเขียว
MH54	0.0032	0.89	ของเหลวสีเขียว
MH55	0.1773	49.46	ของเหลวสีเขียวขี้ม้า
MH56	0.0050	1.39	ของเหลวสีเขียวขี้ม้า



รูปที่ 4.2 ลักษณะ TLC ของส่วนสกัดย่อย MH51-MH56

การแยกส่วนสกัดย่อย MH5 ด้วยเทคนิค Quick Column Chromatography พบว่าสามารถแยกส่วนสกัดย่อยได้ 6 กลุ่ม จากการตรวจสอบส่วนสกัดย่อยดังกล่าวด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 6:1 พบว่าส่วนสกัดย่อย MH52 และ MH56 สามารถแยกได้เป็นสารเดี่ยวๆ มีลักษณะทางกายภาพเป็นสารสีเหลืองอมเขียว และสารสีเขียวขี้ม้า ตามลำดับ มีค่า R_f เท่ากับ 0.64 และ 0.25 ตามลำดับ ซึ่งส่วนสกัดย่อย MH56 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน capsaicin ทั้งเทคนิค TLC และ FTIR พบว่าสารดังกล่าวคือ capsaicin

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยส่วนสกัดย่อย MH51-MH55 ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้ผลดังตารางที่ 4.11 พบว่า ส่วนสกัดย่อยต่างๆ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ทุกสายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *S. aureus* โดยที่ส่วนสกัดย่อย MH52 มีฤทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดี รองลงมาคือส่วนสกัดย่อย MH51, MH55, MH54 และ MH53 ตามลำดับโดยที่ส่วนสกัดย่อย MH52 มีฤทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง 14.3 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.11 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ โดยส่วนสกัดย่อย MH51-MH55 ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL

เชื้อแบคทีเรีย	ค่าเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของบริเวณยับยั้ง (mm)				
	MH51	MH52	MH53	MH54	MH55
Sarcina sp.	11.0±1.00	10.6±0.57	7.0±0.00	7.3±0.57	7.0±0.00
E. coli	10.6±0.57	11.3±0.57	7.3±0.57	7.0±0.00	8.0±1.00
B. subtilis	11.3±0.57	14.3±0.57	7.0±1.00	8.0±1.00	8.3±1.15
S. aureus	-	-	-	-	-
P. aeruginosa	11.3±0.57	11.3±0.57	7.3±0.57	7.6±1.15	7.6±1.15

ในการทดลองไม่สามารถแยกสารที่ออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากส่วนสกัดย่อย MH52 มีปริมาณน้อย จึงไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างของสารโดยเทคนิค UV และ IR ได้ และพบว่า ส่วนสกัดย่อย MH52 ยังมีสารประกอบย่อยอีกอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งตรวจสอบได้จาก TLC และจากการ

เปรียบเทียบส่วนสกัดย่อย MH52 กับสารมาตรฐาน capsaicin ทั้งเทคนิค TLC และ FTIR พบว่าเป็นสารต่างชนิดกัน ดังนั้นจึงต้องทำการพิสูจน์กลุ่มสารของส่วนสกัดย่อย MH52 ต่อไป

4.4 การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดย่อย

การทดสอบกลุ่มสาร(รัตนา, 2547) ที่เป็นองค์ประกอบของส่วนสกัดย่อย โดยมีการตรวจสอบสาร MH52 บนแผ่น TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 2:1 เพื่อดูความจำเพาะ โดยทดสอบด้วยวิธี Vanillin test, Godin reagent, Liebermann Burchard test และ Salkowski test ให้ผลเป็นบวกคือเกิดสารสีม่วง สีม่วง สีน้ำตาล และสีน้ำตาลตามลำดับ แสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ ดังตารางที่ 4.12 และจากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดย่อย MH52 โดยทดสอบด้วยวิธี Ferric chloride solution และ DPPH solution ให้ผลเป็นบวกคือเกิดสารสีม่วง และสารสีเหลือง ตามลำดับ แสดงว่ามีสารในกลุ่ม Flavonoids เป็นองค์ประกอบ ดังตารางที่ 4.13

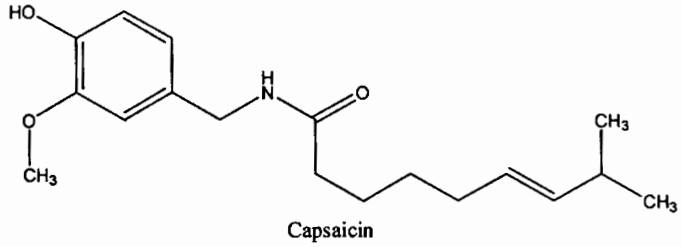
ตารางที่ 4.12 การทดสอบสารกลุ่ม Terpenoids บนแผ่น TLC

ส่วนย่อย ที่	ค่า R_f			
	Vanillin test	Godin reagent	Liebermann Burchard test	Salkowski test
MH52	0.65 (สีม่วง)	0.65 (สีม่วง)	0.65 (สีน้ำตาล)	0.66 (สีน้ำตาล)

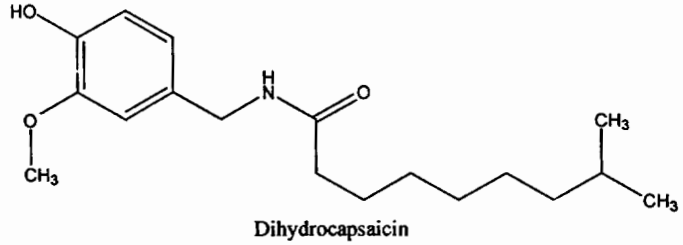
ตารางที่ 4.13 การทดสอบสารกลุ่ม Flavonoids บนแผ่น TLC

ส่วนย่อยที่	ค่า R_f	
	Ferric chloride solution	DPPH solution
MH52	0.67 (สีม่วง)	0.65 (สีเหลือง)

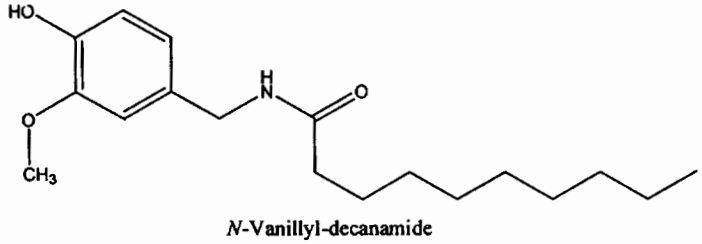
เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับการทดลองของ Schweiggert *et. al.* (2006) ที่แยกสารจากพริกโดยเทคนิค HPLC–MS พบว่า สารที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่า capsaicin คือ *N*-Vanilly-nonanamide, Dihydrocapsicin และ *N*-Vanilly-decanamide ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าสารที่แยกได้เป็นอนุพันธ์ของ capsaicin โดยที่สารเหล่านี้จะให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธี Ferric chloride solution และ DPPH solution เนื่องจากมีหมู่ฟีนอล และจะให้ผลเชิงบวกกับ Vanillin test, Godin reagent, Liebermann Burchard test และ Salkowski test แสดงว่ามีสารในกลุ่ม terpenoids เป็นองค์ประกอบ นั่นคือ อนุพันธ์ของ capsaicin ส่วน side chain มี isoprene unit



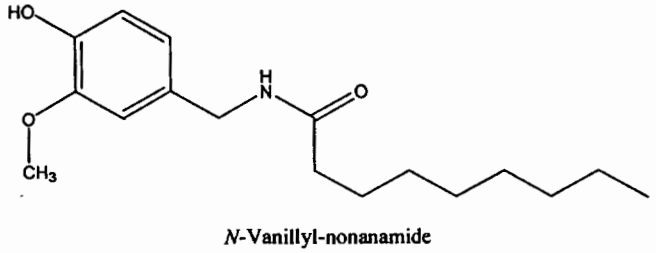
Capsaicin



Dihydrocapsaicin



N-Vanillyl-decanamide



N-Vanillyl-nonanamide