การตรวจสอบพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากใบโคกกะออม

Phytochemical Screening and Pharmacological Activities of Crude Extracts from *Cardiospermum halicacabum* L. Leaves

ชาญชัย สาดแสงจันทร์
สุภิญญา ติ๋วตระกูล
ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
ประเภททุนอุดหนุนนักวิจัยใหม่ ปี 2538

เลขหมู่ QK495.S19 ส62
เลขทะเบียน 2539
3 ส.ค. 2539

Order Key.....
BIB Key.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จเรียบร้อยลงด้วยดี ทั้งนี้เพราะได้รับคำปรึกษาและแนะนำจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรุณพร อิฐรัตน์ อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

นอกจากนี้ขอขอบพระคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ทำให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสิ้นลงด้วยดี และขอขอบใจนักศึกษาเภสัชศาสตร์ชั้นปีที่ 5 ได้แก่ นางสาว กนกพร แกล้วทนงค์ และนางสาว ปิยะนุช เทพรอด ที่ได้ช่วยเหลือและร่วมทำการวิจัยในครั้งนี้ด้วย

และขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ คุณโสภา คำมี คุณสุดใจ ณ นคร และคุณปราณี รัตนสุวรรณ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

1 พฤศจิกายน 2539

บทคัดย่อ

การตรวจสอบเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิยาของสารสกัดจากใบโคกกะออม ได้แก่ สาร petroleum ether, สารสกัด chloroform, สารสกัด ethyl acetate และสารสกัด ethanol พบว่า สารสกัด pet. ether ประกอบด้วยสารกลุ่ม arbutin, flavonoids, essential oils และ coumarin สารสกัด chloroform ประกอบด้วยสารกลุ่ม anthra-glycoside, arbutin, bitter principle, flavonoids และ essential oil สารสกัด ethyl acetate ประกอบด้วยสารกลุ่ม anthra-glycoside, arbutin, cardiac glycosides , bitter principle, alkaloids, saponin และ valepotriates และสารสกัด ethanol ประกอบด้วยสารกลุ่ม anthra-glycoside, arbutin, cardiac glycoside, bitter principle, alkaloids, flavonoid, saponin และ valepotriates และ การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคือ 1) Brine Shrimp toxicity test พบว่า สารสกัด ethyl acetate ให้ค่า LD_{50}=592.2875 µg/ml ส่วนสารสกัด chloroform, สารสกัด petroleum ether และสารสกัด ethanol ให้ค่า LD_{50} ที่สูงมากจนไม่น่าสนใจ 2) Antimicrobial activity test ใช้วิธี Modified-Agar disc diffusion พบว่าสารสกัด ethyl acetate ที่มีความเข้มข้น 10,000 µg/disc มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus pyogens* (clear zone 9 mm) แต่ไม่สามารถต้านเชื้อ *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albican* และ *Staphylococcus aureus* ส่วนสารสกัด petroleum ether, สารสกัด cholroform และสารสกัด ethanol ที่มีความเข้มข้น 10,000 µg/disc และ 5,000 µg/disc และ 1,000 µg/disc ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E.coli, Ps.aeruginosa C.albican, S.pyogens* และ *S.aureus* 3) Mosquito Larvicide test พบว่าสารสกัด petroleum ether, chloroform, ethyl acetate และ ethanol ที่ความเข้มข้น 5000 µg/ml สามารถฆ่าลูกน้ำได้ 95%, 80%, และ 45% ในเวลา 24 ชม.ตามลำดับ

Abstract

Phytochemical Screening and pharmacological activities of crude extacts form *Cardiospermum halicacabum* L. leaves were investigated. The crude extract was separated to be petroleum ether extract, chloroform extract, ethyl acetate extract and ethanol extract. Phytochemical screening found that petroleum ether extract composed with arbutin, flavonoids, essential oil and coumarin, chloroform extract composed with anthra-glycoside, arbutin, bitter principle, flavonoid and essential oil, ethyl acetate extract composed with anthra-glycoside, arbutin, cardiac-glycosides, bitter principle, alkaloid, flavonoids, saponin, essential oil and valepotriates and ethanol extract composed with anthra-glycoside, arbutin, cardiac-glycoside, bitter principle, alkaloid, flavonoids, saponin and valepotriates. The pharmacological activities of crude extract was tested by the following methods. 1) Brine Shrimp toxicty test, the LD_{50} values of petroleum ether extract were 592.2875 μg/ml chloroform extract, ethyl acetate extract and ethanol extract shown very low toxicity 2) Antimicrobial activity test was investigated by using Modified-Agar disc diffusion method, the interested activity of extracts was ethyl acetate extract. (10,000 μg/disc) which inhibited *S.pyogens* (clear zone 9 mm) but could not inhibited *E.Coil, Ps. aeruginosa, C.albican,* and *S. aureus* 3) Mosquito Larvicide test, we found that petroleum ether extract (5000 μg/ml) chloroform extract (5000 μg/ml) ethyl acetate extract (5000 μg/ml) and ethanol extraxt (5000 μg/ml) shown 95%, 80%, 40% and 45% lethality, within 24 hours respectively.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	a
Abstract	b
กิตติกรรมประกาศ	c
สารบัญรูป	f
สารบัญตาราง	g
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ข้อมูลทั่วไป	2
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ	
Phytochemical screening test (TLC)	5
Brine Shrimp Toxicity test	5
Anitimicrobial activity test	6
Mosquito larvicide test	8
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
แผนการดำเนินงาน	9
การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร	10
การสกัดแยกลำดับส่วน	10
การตรวจสอบพฤกษเคมีในผงพืช(Phytochemical screening test)	10
การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา(Pharmacological activities test)	
1)การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดย Brine Shrimp Toxicity test	12

เรื่อง	หน้า
2)การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ(Antimicrobial activity test)	14
3)การทอสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ(Mosquito larvicide test)	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์	
น้ำหนักร้อยละของสารสกัด	17
ผลการตรวจสอบทางพฤกษเคมี(Phytochemical screening test)	17
ผลการทดลองความเป็นพิษต่อ Brine Shrimp(Brine Shrimp Toxicity test)	20
ผลการทดลองฤทธิ์ต้านจุลชีพ(Antimicrobial activity test)	22
ผลการทดลองฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ(Mosquito larvicide test)	24
ภาคผนวก	27
เอกสารอ้างอิง	29

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1. โคกกะออม *Cardiospermum halicacabum* Linn 3 .

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการตรวจสอบพฤกษเคมีโดยThin Layer-Chromatography	19
2	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อ Brime Shrimp (Brime Shrimp Toxicity test)	20
3	สรุปผลความเป็นพิษต่อ Brine Shrimp	21
4	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ(Antimicrobial activity test)	22
5	ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ(Mosquito larvicide test)	24
6	Spray reagents ที่ใช้สำหรับ TLC(Thin-Layer Chromatography)	28

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สังคมในยุคโลกาภิวัฒน์ทุกวันนี้ ได้มีการพัฒนาในด้านต่าง ๆ หลายด้านด้วยกัน อาทิเช่น ด้านเทคโนโลยีและคอมพิวเตอร์ แต่ในขณะเดียวกันการพัฒนาทางด้านการใช้สมุนไพร หรือสารจากธรรมชาติ เพื่อมาใช้เป็นยาก็ไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากัน แต่ละประเทศต่างเล็งเห็นความสำคัญของสารจากธรรมชาติ ซึ่งมักจะไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมดังเช่นยาที่ได้จากการสังเคราะห์ อีกทั้งความเป็นพิษค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบกับยาปัจจุบัน ดังนั้นจึงได้มีการเสาะแสวงหาพืชพันธุ์สมุนไพรที่มีอยู่อย่างอุดมสมบูรณ์นานาชนิดบนพื้นโลก เพื่อนำมาวิจัยและพัฒนา เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ในการบำบัดรักษาโรคและผลิตออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

ปัจจุบันนี้ประเทศไทยมีการนำเอาพืชสมุนไพรหลายชนิดมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พื้นบ้านที่ใช้ในการรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง ตัวอย่างเช่น ว่านหางจระเข้เตรียมในรูปเจลใช้รักษาแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรม เทียนบ้านซึ่งมี "Lawsone" มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา เสลดพังพอนหรือพญายอที่ใช้ในการรักษาเริม และยังมีพืชหลายชนิดที่เหมาะแก่การนำมาศึกษาวิจัยหาสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา(Pharmacological actions) เช่น โคกกะออม(*Cardiospermum halicacabum* Linn วงศ์ Sapindaceae)ซึ่งจัดเป็นวัชพืชชนิดหนึ่งเป็นไม้เลื้อยขึ้นตามที่รกร้างทั่วไป มีการใช้ในการแพทย์แผนไทยโดยใช้ใบสดตำละเอียดพอกฝีหนองโดยเฉพาะโรคผิวหนังในเด็ก รักษาภาวะประจำเดือนขาด(amenorrhea) รักษาหอบหืด(asthma) เป็นต้น จึงน่าที่จะทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป และถ้ามีฤทธิ์ในการรักษาก็น่ามีการพัฒนาต่อไป เพื่อใช้เป็นยาแผนปัจจุบันในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบหากลุ่มสารสำคัญในใบโคกกะออม(Phytochemical screening test)
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสารสกัดใบโคกกะออม คือ
   ก. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้น
   ข. ฤทธิ์ทางจุลชีพโดยวิธีการประยุกต์
   ค. ฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีของใบโคกกะออม
2. ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากใบโคกกะออม โดยวิธี "Brine Shrimp Toxicity test"
3. ทราบถึงฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบดคกกะออม โดยวิธี " Modified agar disc diffusion"
4. ทราบถึงฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำของสารสกัดจากใบโคกกะออม โดยวิธี "Mosquito larvicide test"
5. เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาต่อไป

ข้อมูลทั่วไป

ชื่อทั่วไป : โคกกะออม

ชื่อพ้อง ; Ballon vine, Heart pea, Heart

; หมายแข้งโผ (อีสาน), โพออม (ปัตตานี), ลูกลีบเครือ (เหนือ),

; วิวี, วิหวี่ (ปราจีนบุรี), ตุ้มต้อก (แพร่), ติ้นโข่ไหน (จีน)

ชื่อวิทยาศาสตร์ ; *Cardiospermum halicacabum* Linn

วงศ์ ; Sapindaceae

ลักษณะทั่วไป ;เป็นไม้เถาขนาดกลาง เถาและใบสีเขียวอมเหลือง ใบเป็นใบประกอบก้านใบยาว ใบย่อยมีใบ 3 ใบ ขอบใบหยักลึก มีมือเกาะสั้น ๆ ที่ ปลายยอดอยู่ระหว่างซอกเถาที่มีก้านช่อดอก ดอกช่อขนาดเล็ก มี 3 - 4 ดอกย่อย ดอกย่อยมีสีขาว มีขนาดเล็กผลเป็นรูปสามเหลี่ยมกว้าง 1 - 2 เมตร เปลือกผลบางสีเขียวอมเหลือง ข้างในมีเมล็ดกลม 3 เมล็ด สีเขียวอ่อนค่อนข้างนิ่ม ถ้าแก่จัดจะเป็นสีดำ(ดังรูปที่ 1)

ข้อมูลการใช้ในหมอพื้นบ้าน(*Ethanopharmacological data*)

;ตำรายาไทยใช้ใบสดตำพอกฝี คั้นน้ำรักษาหอบหืด

;ประเทศอินเดียใช้ใบสดรักษาหวัด(fever with cough) ขับประจำเดือน(ennemagogue) รักษาหอบหืด อาการประจำเดือนขาด(amenorrhea)

;ประเทศออสเตรเลียและอินเดียตะวันออก ใช้รักษาอาการประจำเดือนขาด(amenorrhea)

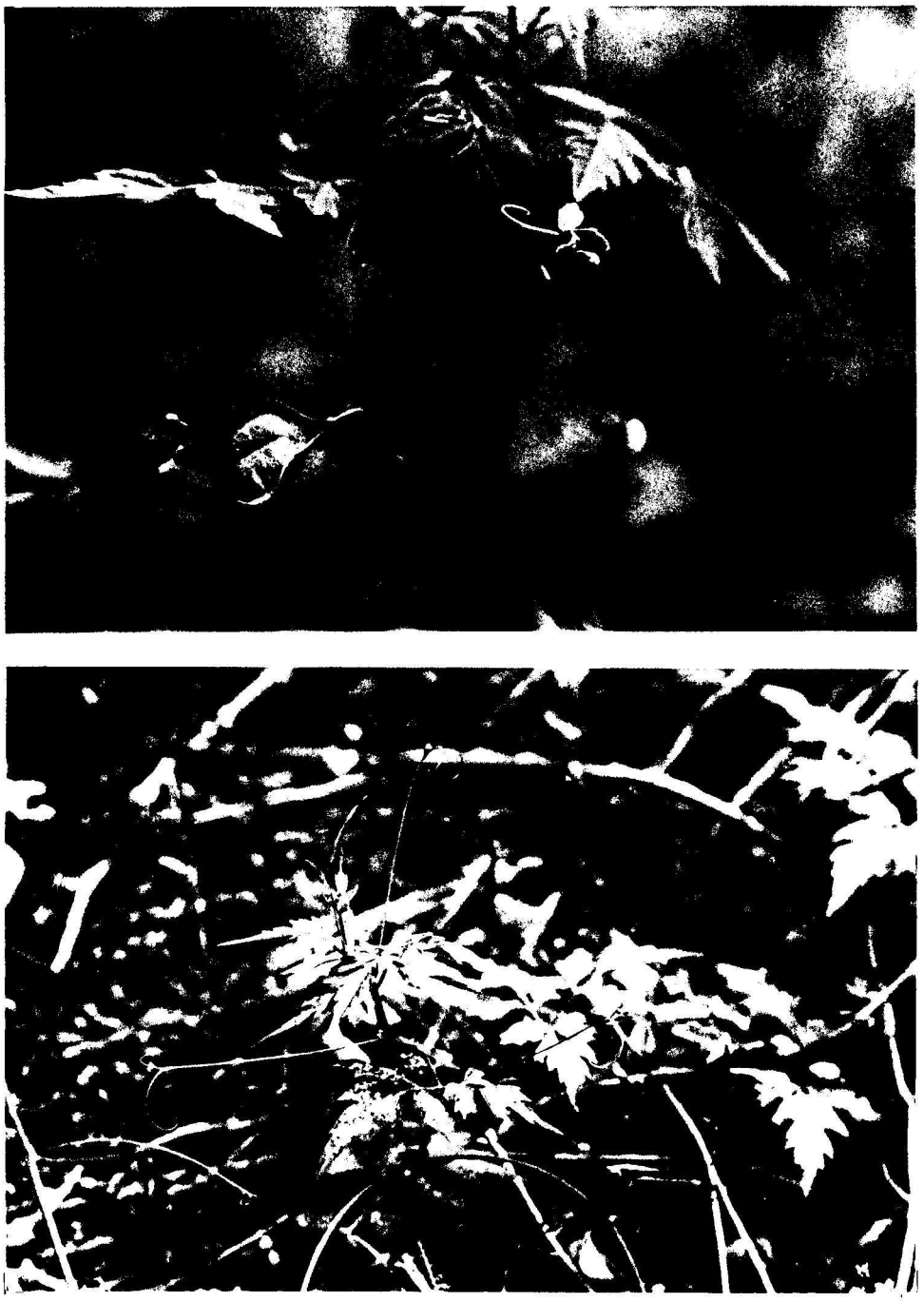
;ประเทศฟิลิปปินส์ใช้ใบแห้งรักษาโรคไขข้อ(rheumatism)

;ประเทศศรีลังกาใช้ใบแห้งรักษาโรคไขข้อ(rheumatism) โรคทางระบบประสาท(nervous disease) รักษาอาการขาดประจำเดือน(amenorrhea)

;ประเทศอเมริกา ใช้ใบขับประจำเดือน(ammeagogue)

;ประเทศมาดากาสคาร์ใช้รักษาอาการประจำเดือนขาด(amenorrhera)

;ประเทศบันกลาเดสใช้ใบรักษาหอบหืด(asthma)



รูปที่ 1 โคกกะออม *Cardiospermum halicacabum* Linn.

ข้อมูลรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological actions)

;ประเทศจีนพบว่าสารสกัดน้ำมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ(antimicrobial activity) ตัวอย่างเช่น *Salmonella typhi*

;ประเทศอินเดียพบว่าสารสกัดเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 มีฤทธิ์ยับยั้ง enzyne phospolipase A2 สารสกัด methanol (80%) มีฤทธิ์ antisickling สารสกัด alkaloid มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) ต้านเชื้อ *Aerobactat aerogenes, Escherichia coil, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Samonella paratyphi B, Salmonella typhosa, Shigella bysenteriae, Staphylococcus aureus, Vibrio cholera* สารสกัดเอทานอล 95% มีฤทธิ์ analgesic activity, anti-inflammatory activity, cardiac depressant activity, hypotensive activity, spasmodic activity, vasodilator activity

ข้อมูลรายงานสารสำคัญในใบโคกกะออม

;ประเทศอินเดีย มีการรายงานพบสารกลุ่ม steroid(beta-sitosterol, beta-galactoside sitosterol, protein (glutamic acid, lysine, tyrosine, valine, proline), flavonoid (apigenin), lipid (arachinodic acid) และsaponin

;ประเทศไทยมีการรายงานพบสารกลุ่ม tannin, cyanogenic glycoside

บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

Phytochemical Screening test(TLC)

อุปกรณ์

ขวดขนาดเล็ก

แผ่น TLC

Tank สำหรับ develope แผ่น TLC

หลอด capillary

หัว spray

hair dryer

สารเคมี

petroleum ether

chloroform

ethyl acetate

ethanol

methanol

toluene

water

spraying reagent

เครื่องมือ

UV - detector

Hot plate

Brine Shrimp Toxicity test

อุปกรณ์

เครื่องชั่ง (Analytical balance)

โคมไฟ

ขวดน้ำเกลือขนาด 1000 ml

กล่องพลาสติกสำหรับเลี้ยง Brine Shrimp

ถาดพลาสติก

ลูกยาง

ผ้าขาวบาง

กล้องจุลทรรศ์

96 - well microplates

rack

stirring rod

beaker ขนาด 50, 100, 500 ml

micropipet 10, 50, 100 ml

plasteur pipet

vial

spatula

สารเคมี

1. sea water
2. dried yeast
3. DMSO
4. formalin

เครื่องมือ

Soinicator

Antimicrobial activity test

เชื้อที่ใช้ทดสอบ

1. *Escherichia coil*
2. *Candida albicans*
3. *Staphylococcus aureus*
4. *Steptococcus pyogens*
5. *Pseudomonas aeruginosa*

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Muller-Hinton Agar Medium

2. Muller-Hinton Broth Medium (MHB)

อุปกรณ์

เครื่องชั่ง (analytical balance)

ถาดพลาสติด

ขวดแก้ว

ตะเกียงแอลกอฮอล์

Micropipet ขนาด 10,100 ml

flask ขนาด 500,1000 ml

petri disc

hiar dryer

papar disc

ampicillin disc

amikacin disc

gentamicin disc

tetracyclin disc

test tube

rack

loop เขี่ยเชื้อ

Cylinder ขนาด 25,100 ml

beaker ขนาด 10, 50, 500, 1000 ml

sterile cotton swab

forceps

pipet 1 ml, 5 ml, 10 ml

สารเคมี

distilled water

95% ethanol

Mc Farland No. 0.5

เครื่องมือที่ใช้

autoclave

hot plate

incubator

laminar air flow

sonicator

Mosquito larvicide test

อุปกรณ์

beaker 50 ml

beaker 100 ml

beaker 500 ml

stirling rod

marking pen

Measuring cylinder 25 ml

ช้อนตักลูกน้ำ

กระดาษตะกั่ว

สารเคมี

distilled water

acetone

ethanol

เครื่องมือ

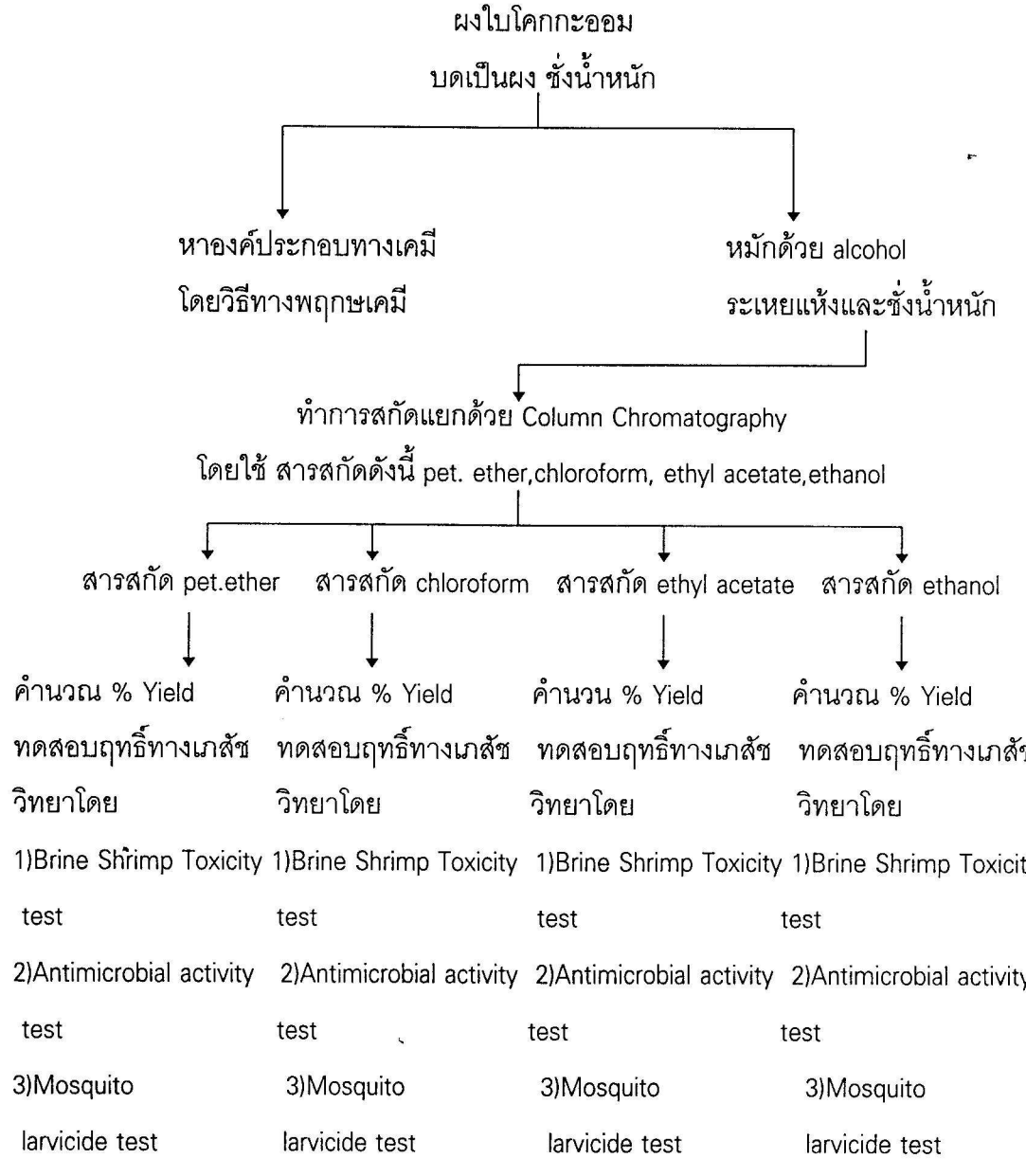
sonicator

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

แผนการดำเนินงาน

นำใบโคกกะออมที่เก็บมาหลังจากการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้ว ทำการล้าง ผึ่งให้แห้ง อบ บดและชั่งน้ำหนัก ตามลำดับ



การเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร

1 ทำการเก็บตัวอย่างพืช และพิสูจน์เอกลักษณ์

2 ล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง และอบจนใบแห้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศา

3 นำมาบดให้เป็นผงละเอียด

การสกัดแยกลำดับส่วน

นำผงพืชที่ได้มาหมักด้วย alcohol จนการสกัดเสร็จสิ้นสมบูรณ์ จึงนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้ง จากนั้นนำมาแยกเป็นส่วนๆอีกทีโดยวิธีทาง chromatography ในการสกัดแยกจะเริ่มสกัดจากสารสกัด (solvent) ที่มี polarity น้อยก่อน และเพิ่ม polarity ขึ้นไปเรื่อย ๆ ตามลำดับดังนี้ pet. ether, chloroform,ethyl acetate และ ethanol เมื่อได้สารสกัดแต่ละส่วนแล้วทำการระเหยแห้งด้วยระบบสูญญากาศ(in vacuum) โดยใช้เครื่องระเหยแห้งระบบสูญญากาศ(Vacuum vaporator) คำนวณ %yield ของสารสกัดแต่ละส่วน

การตรวจสอบพฤกษเคมีในผงพืช

(Phytochemical screening test)

นำผงของใบโคกกะออมมาทำการตรวจสอบหาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี Thin Layer Chormatography โดยกลุ่มสารที่จะทำการตรวจสอบคือ cardiac glycosides, flavonoids, anthraquinone, arbutin, bitter principle, alkaloid, saponin, essential oils, valepotriates และ coumarins

การตรวจสอบพฤกษเคมีด้วย TLC(Phytochemical screening test)

1.การเตรียม แผ่น TLC

เตรียมแผ่น TLC 10 แผ่น จาก aluminium sheets silica gel 60/kieselgur F254, layer thickness = 0.2 mm ซึ่งเป็นแผ่นสำเร็จรูป และทำการ spot แผ่น TLCแผ่นด้วย pet.ether extract,chloroform extract, ethyl acetate extract และ ethanol extract

2.การเตรียม solvent system

1 Ethyl acetate-methanol-water 100 : 13.5 : 10

ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม 1. Anthra-glycosides

2. Arbutin

3. Cardiac glycosides

4. Bitter principle

5. Alkaloids
6. Flavonoids
7. Saponins

2 Toluene-ethyl acetate 93 : 7

ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม 1. Essential oils
2. Valepotriates
3. Coumarins

3. การตรวจสอบ

นำแผ่น TLC ทั้ง 10 ที่ develope แล้วไป spray ด้วยน้ำยาต่าง ๆ ตามลำดับ ดังนี้

TLC แผ่นที่ 1 spray ด้วย Brontrager reaction (10 % Ethanolic KOH)
เห็นผลเป็นสีแดง(vis)หรือเรืองแสงสีแดง เมื่อใช้ UV-365 nm
แสดงว่าเป็น anthraquinone
เห็นผลเป็นสีแดง(vis)หรือเรืองแสงสีเหลือง เมื่อใช้ UV-365 แสดงว่า
เป็น anthrone

TLC แผ่นที่ 2 spray ด้วย Berlin blue
สารกลุ่ม arbutin จะให้สีน้ำเงิน เมื่อมองด้วยตาเปล่า

TLC แผ่นที่ 3 spray ด้วย $SbCl_3$ reagent
สารกลุ่ม cardenolide จะให้สีชมพู หรือน้ำเงินอมม่วง
สารกลุ่ม Bufadienolides จะให้สีน้ำเงิน หรือเรืองแสง
เหลืองอมเขียว (ที่ UV- 365 nm)

TLC แผ่นที่ 4,5,6 spray ด้วย vanillin-sulphuric acid
สารกลุ่ม bitter priciple จะให้สีแดง-น้ำตาล,สีเหลือง
น้ำตาล หรือ เขียวเข้ม
สารกลุ่ม saponin จะให้สีน้ำเงินเมื่อมองด้วยตาเปล่า
สารกลุ่ม essental oil จะให้สีแดง เหลือง น้ำเงิน หรือ
น้ำตาล เมื่อมองด้วยตาเปล่า

TLC แผ่นที่ 7 spray ด้วย Dragendroff reagent
จะให้สีส้มกับสารกลุ่ม alkaloids ซึ่งสีจะปรากฏทันที
เมื่อ spray

TLC แผ่นที่ 8 spray ด้วย FBS (Fast Blue Salt reagent)
สารกลุ่ม flavonoids จะให้สี เหลือง หรือเขียว หรือส้ม

ที่ UV-365 nm

TLC แผ่นที่ 9 spray ด้วย Hydrochloric acid-acetic acid reagent
สารกลุ่ม valepotriates (iroidoid) จะให้สีน้ำเงิน
หรือน้ำตาลเมื่อมองด้วยตาเปล่า

TLC แผ่นที่ 10 spray ด้วย NH_4OH หรือ KOH
สารกลุ่ม coumarins จะเรืองแสงสีน้ำเงิน หรือเขียว
ที่ความยาวคลื่น 365 nm

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological activities test)

ทำโดยนำสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้คือ petroleum ether extract, chlorotform extract, ethyl acetate extract และ ethanol extract มาตรวจสอบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1)การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดย Brine Shrimp Toxicity test

Brine Shrimp Toxicity Test เป็นการทดสอบว่าสารนั้นมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือไม่ โดยใช้ Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach) เป็นการทดสอบเบื้องต้นของสารจากธรรมชาติ(natural product) โดยผลการทดสอบจะออกมาในรูปของค่า LD_{50} ในหน่วย µg/ml ซึ่งวิธีนี้จะให้ผลค่อนข้างกว้าง การนำวิธี Brine Shrimp Toxicity test มาทดสอบกว้างๆ(screen)ก่อนที่จะนำสารซึ่งมีฤทธิ์มาแยกให้บริสุทธิ์ทำให้ประหยัดเวลาและงบประมาณได้มาก นอกจากนี้ไข่ของ Brine Shrimp สามารถหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก และไข่จะฟักเป็นตัวอ่อน (nauplii) จำนวนมาก ซึ่งไข่ของ Brine Shrimp นำมาทดสอบ โดยวิธีดังต่อไปนี้

วิธีการทดสอบ

1.เพาะไข่ Brine Shrimp ซึ่งเป็นสัตว์ทดลอง ในน้ำทะเล (อาจเป็น artificial sea water หรือ sea water) 0.3 g ในน้ำทะเล 200 ml ก่อนเริ่มการทดลองประมาณ 48 ชั่วโมง ภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นภาชนะก้นตื้นที่มีแผงกั้นให้ภาชนะนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน และเจาะรูที่แผงที่กั้น โดยให้แนวที่เจาะรูต่ำกว่าน้ำทะเลที่บรรจุอยู่ในภาชนะ ในการเพาะให้โปรยไข่ Brine Shrimp ลงในช่องของภาชนะนั้นเพียงด้านเดียว และปิดช่องที่เพาะนั้นให้มืด ฉายไฟให้กับอีกส่วนที่เหลือ หลังจากที่ตัวอ่อนของ Brine Shrimp ฟักออกจากไข่ ตัวอ่อนจะถูกกระตุ้นด้วยแสงไฟ และว่ายน้ำผ่านรูที่เจาะไว้มาสู่ด้านที่สว่างกว่า และเปลือกไข่จะแยกอยู่ในอีกส่วนของภาชนะที่ยังถูกปิดให้มืดอยู่ควรไม่มี Brine Shrimp ตายในภาชนะที่ใช้เพาะ จากนั้นจึงนำมาทำการทดลองต่อไป

2. เตรียมสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในน้ำทะเล 1000,100,10 µg/ml ดังนี้

2.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 mg ใส่ใน Vial

2.2 เตรียม stock solution A โดยละลายสารตัวอย่างด้วยน้ำทะเล ถ้าไม่ละลายจะใช้ DMSO ช่วยในการละลายโดยเติม DMSO ปริมาตรไม่เกิน 500 µl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 3 ml อาจใช้ ultrasonic bath ช่วยให้สารตัวอย่างละลายได้ดีและเร็วขึ้น stock solution A จะมีความเข้มข้น 1000 µg/ml

2.3 ปิเปต stock solution A 100 µl ลงใน appendorff tube เติมน้ำทะเล 900 µl (สารละลายมีความเข้มข้น 100 µg/ml)

2.4 ปิเปต stock solution A 10 µl ลงใน appendorff tube เติมน้ำทะเล 990 µl (สารละลายมีความเข้มข้น 10 µg/ml)

3. ปิเปต Brine Shrimp จากภาชนะที่เพาะมาใส่ในน้ำทะเล ที่มีสารละลายของ yeast 1 ml โดยให้มี Brine Shrimp 10-15 ตัว (0.1 ml) ใส่ใน microwell ถ้าจำนวนมากเกินไป เจือจางโดยเติมน้ำทะเลใน beaker ก่อนปิเปต

4. ปิเปต สารละลายตัวอย่าง แต่ละความเข้มข้น 100 µl ลงใน microwell(ทำ triplicate)

5. วาง microwell ไว้ที่อุณหภูมิ 22-29 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. ทำ solvent control โดยใช้ DMSO ในปริมาณที่เท่ากับที่ใช้ละลายสารตัวอย่าง เติมน้ำทะเลจนครบ 200 µl

7. ทำ blank control ที่เป็น น้ำทะเลเท่านั้น

8. นับจำนวน Brine Shrimpที่ตายในแต่ละหลุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100

9. ฆ่า Brine Shrimp ที่เหลือโดยเติม formalin หลุมละ 1 หยด

10. นับจำนวน Brine Shrimp ที่ตาย และ คำนวณหาค่าLD_{50} โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Finney's probit Analysis ซึ่งสามารถคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

ค่า CHI-SQUARE (X^2)

ค่า LD_{50}

ค่า Upper limit ของค่า LD_{50} (UL)

ค่า Lower limit ของค่า LD_{50} (LL)

$$\% \text{ การตาย} = \frac{(\text{จำนวนสัตว์ทดลองที่ตายใน sample} - \text{จำนวนสัตว์ทดลองที่ตายใน blank}) \times 100}{\text{จำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด}}$$

2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ(Antimicrobial activity test)

เป็นการทดสอบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อทางผิวหนังบางชนิดได้หรือไม่โดยใช้วิธี Modified agar disc diffusion(Kirby-Bauer method)

เชื้อที่ใช้ทดสอบ

1. *Escherichia coli*
2. *Candida albicans*
3. *Staphyococcus aureus*
4. *Streptococcus pyogenes*
5. *Pseudomonas aeruginosa*

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) การเตรียม Muller-Hinton Agar Media (MHA) โดยเตรียม 1000 ml เพื่อใช้ในการเตรียม culture plate

Muller-Hinton Agar 38 g

Distilled - water 1000 ml

เติม Muller-Hinton Agar 38 g ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้มจน MHA ละลายหมดแล้วนำเข้า autoclave(121 องศา) เป็นเวลา 15 นาที

2) การเตรียม Muller - Hinton Broth media (MHA) โดยเตรียม 1000 ml เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (subculture)

Muller - Hinton Broth 21 g

Distilled water 1000 ml

เติม MHB 21 g ให้น้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปอุ่นจน MHB ละลายหมด แล้วนำไปเข้า autoclave (121 องศา) เป็นเวลา 15 นาที

3) การเตรียม MC Farland standard No. 0.5 เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่เพาะเลี้ยง

1.175 % w/v $BaCl.\ 2H_2O$ 0.05 ml

1 % v/v H_2SO_4 9.95 ml

ความขุ่นของสารแขวนตะกอนนี้ จะมีค่าเทียบเท่ากับเชื้อประมาณ 0.5×10^8 cells/ml

การเตรียม disc

control disc : ปิเปต petroleum ether, chloroform, ethyl acetate และ ethanol อย่างละ 20 µl ใส่ใน sterile paper disc ใช้ hair dryer เป่าให้แห้ง

positve control disc : Amikacin disc, Ampicillin disc, Gentamicin disc,Tetracyclin disc

sample disc

1. ชั่ง pet. ether extract, chloroform extract, ethyl acatate extract และ ethanol extract, มา 100 mg ใส่ในขวดยาขนาดเล็ก

2. ละลายสารสกัดที่ชั่งมาแต่ละอย่าง ด้วย solvent ที่ใช้ 2 ml เขย่า นำไปเข้าเครื่อง sonicator เพื่อช่วยในการละลายจะได้ความเข้มข้น 1000 µg/ 20µl

หมายเหตุ ในสารสกัด ethanol ให้ใช้ DMSO เป็น solvent เนื่อง DMSO ช่วยเพิ่มค่าการละลายของสารสกัดได้มากกว่า

3. นำสารละลาย ที่ได้มาปิเปต โดยใช้ micropipet 20 µl ดูดสารละลายที่เตรียมไว้ ใส่ลงในแผ่น disc วางทิ้งไว้ให้แห้งบน plate หรือใช้ hair dryer เป่าให้แห้ง โดยเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 10,000 µg/ 20µl ,5000 µg/ 20µl และ 1,000 µg/ 20 µl (โดยการดูดสารละลายความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 µg/ 20µl) ใส่ disc และเป่าให้แห้งก่อน)

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

1. ใช้ loop เขี่ยเชื้อบริเวณที่แยกเป็น colony เดี่ยว ๆ ประมาณ 1- 2 colony ใส่ในหลอดทดลองที่มี Muller-Hinton Broth Medium อยู่ 5 ml นำไป incubate ที่ 37° C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. นำเชื้อจากข้อ 1 มา subculture โดยเลี้ยงใน MHB แล้วนำไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3. นำเชื้อจากข้อ 2 มาเจือจางให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่น 10^{7} - 10^{8} cells/ml โดยเทียบกับ MC Farland standard No. 0.5

4. Spread เชื้อที่ได้จากข้อ 3 บน plate ที่บรรจุ Muller-Hinton Agar 20 ml โดยใช้ sterile cotton-swab

5. วาง sample disc และ positive control disc บน plate ในข้อ 4 แล้วนำไป แช่ ตู้เย็น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. หลังจากนั้น นำ plate เหล่านั้นมา incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. วัด clear zone โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (mm)

3)การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ(Mosquito larvicide Test)

การเตรียมสารทดสอบ

ชั่ง petroleum ether extract, chloroform extract, ethyl acetate extract และ ethanol extract มาอย่างละ 250 มิลลิกรัม ใส่ใน beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาละลายด้วย DMSO 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร

การเตรียมลูกน้ำ

2.1 แบ่งลูกน้ำจำนวนประมาณ 200 ตัว ใส่ใน beaker ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ 250 มิลลิลิตร

2.2 เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ลงใน beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร

2.3 ตักลูกน้ำขนาดเท่า ๆ กัน จำนวน 10 ตัว จาก 2.1 ลงใน 2.2

การทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำด้วยสารสกัด

3.1 เติมสารละลายที่ได้จากข้อ 1 ลงใน 2.3 เขย่าให้เข้ากัน ปิดปาก beaker ด้วยกระดาษตะกั่วทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

3.2 ทำการทดสอบควบคุม (control) โดยหยด DMSO 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร เทผสมกับข้อ 2.3 เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระดาษตะกั่ว

3.3 ระยะเวลาในการทดลองให้อ่านผลโดยตั้งทิ้งไว้ 1, 2 ,3 และ 24 ชั่วโมง แล้วทำการนับลูกน้ำ

3.4 การนับลูกน้ำ ให้เคาะ beaker กับโต๊ะ 3 ครั้ง ลูกน้ำที่นอนอยู่กัน beaker ถือว่าตาย (dead)

3.5 การคำนวณหา % การตายโดย

$$\% \text{ การตาย} = \frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย} \times 100}{\text{จำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด}}$$

บทที่ 4 ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์

น้ำหนักร้อยละของสารสกัด

ผงใบแห้ง	1	kg		
ethanol extract	252.5	g	คิดเป็น	25.25 % yeild ของผงแห้ง

หลังจากการผ่าน Column chromatography เพื่อแยกเป็นส่วน ๆ (fractions)

petroleun ether	34.8	g	คิดเป็น	3.45 % yeild ของผงแห้ง
chloroform	20.0	g	คิดเป็น	2.00 % yeild ของผงแห้ง
ethyl acetate	9.5	g	คิดเป็น	0.95 % yeild ของผงแห้ง
ethanol	18.6	g	คิดเป็น	1.86 % yeild ของผงแห้ง

ผลการตรวจสอบทางพฤกษเคมี(Phytochemical screening test)

ผลจากการวิเคราะห์ สารสกัดจากใบโคกกะออม ในส่วนสกัดต่าง ๆ คือ petroleum ether extract, chloroform extract, ethyl acetate extract และ ethanol extract โดยการตรวจสอบ ด้วยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography) และตรวจหากลุ่มสารด้วยแสงเหนือม่วง (ultraviolet light) หรือ การตรวจสอบโดยใช้ reagent ต่าง ๆ ไปทำปฏิกิริยา โดยการพ่นเป็นละอองฝอยบนแผ่น TLC (Thin Layer Chromatography) ซึ่งทำให้เกิดสีต่าง ๆ แสดงผลดังตารางที่ 1 พบว่า ใน pet.ether extract มีสารกลุ่ม Arbutin, Flavonoids, Essential oil และ Coumarin chloroform extract มีสารกลุ่ม Anthra-glycoside, Arbutin, Bitter principle, Flavonoids และ Essential oil, ethyl acetate extract มีสารกลุ่ม Anthra-glycoside, Arbutin, Cardiac glycoside, Bitter principle, Alkaloid, Flavonoids, Saponin, Essential oil และ Valepotriates และ ethanol extract ประกอบด้วยสารกลุ่ม Anthra-glycoside, Arbutin, Cardiac glycoside, Bitter principle, Alkaloid, Flavonoids, Saponin และ Valepotriates

เมื่อนำผลการทดลองไปเปรียบเทียบกับผลการวิจัยที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ พบว่าการวิจัยในครั้งนี้ ได้พบสารสำคัญกลุ่มใหม่ ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน จากส่วนสกัดของใบโคกกะออม ได้แก่ arbutin (hydroquinone-beta-O-glucoside), bitter principle, essential oil, valepotriates และ coumarins. ส่วนสารสำคัญที่เคยมีการรายงานแล้วคือ anthra - glycosides,

cardiac glycoside, alkaloid, flavonoids และ saponin และจากการทดลองพบว่าในแต่ละสารสกัดของใบโคกกะออม จะไม่ได้พบสารเหมือนกันทุกชนิด โดยทั้งนี้จะขึ้นกับว่า สารนั้นมีองค์ประกอบของสารสำคัญเป็นอะไร ซึ่งจะส่งผลให้สารมีขั้วมากหรือน้อย หรือไม่มีขั้ว ดังนั้นจึงถูกสกัด ด้วย solvent ต่าง ๆ ได้ไม่เหมือนกัน การตรวจสอบด้วย TLC จึงทำให้แยกและทราบได้ว่าสารสำคัญใด ถูกสกัดโดย solvent ชนิดใดได้ดี

วิจารณ์ผลการทดลอง

การใช้เทคนิค TLC (Thin-Layer Chromatoqraphy) แม้ว่าจะมีความถูกต้อง แม่นยำสูง แต่จากการทดลอง ทำได้เพียงตรวจสอบอย่างคร่าวๆว่า พบกลุ่มสารสำคัญใดบ้างในสารสกัดจากใบโคกกะออม แต่ไม่ได้มีการเปรียบเทียบกับสารอ้างอิงมาตรฐาน (standard referance) ดังนั้นค่า Rf ที่ได้จากการทดลอง จึงนำไปเปรียบเทียบกับ Rf มาตรฐานไม่ได้ เนื่องจากสภาวะแวดล้อม เช่น ความชื้น และอุณหภูมิต่างกัน เพราะฉะนั้นควรใช้สารอ้างอิงมาตรฐานมา run TLC เพื่อเทียบกับสารสำคัญที่พบในสารสกัดใบโคกกะออม เพื่อจะศึกษาในรายละเอียดของสารสำคัญต่างๆได้อย่างแม่นยำ และถูกต้องยิ่งขึ้น

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบพฤษเคมีโดย Thin layer - Chromatography

สารสกัด	ผลการทดสอบสาร																			
	Anthra-glycoside		Arbutin		Cardiac-glycoside		Bitter principle		Alkaloids		Flavonoids		Saponins		Essential oil		Valepotriates		Coumarins	
	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)	สีหรือการเรืองแสง	Rf (cm)
Petroleum ether extract	-	-	+ blue (vis)	0.70	-	-	-		-	-	+orange (UV-365nm)	0.86	-	-	+ blue (vis)	0.57	-	-	+ brown (UV-365nm)	0.6 0.71
Chlorofrom extract	+ red (UV-365nm)	0.56	+ blue (vis)	0.46	-	-	+red-brown (vis)	0.5	-	-	+ orange (UV-365nm)	0.48	-	-	+yellow,blue (vis)	0.14 0.86	-	-	-	-
Ethyl acetate extract	+ yellow (UV-365nm)	0.4	+ bule (vis)	0.46	+ (green) (UV-365nm)	0.46	+yellow-brown (vis)	0.43	+ orange (vis)	0.38 0.64	+orange,green (UV-365nm)	0.45 0.87	+ bule (vis)	0.43 0.67	+ yellow (vis)	0.17	+ blue (vis)	0.35	-	-
Ethanol extract	+ yellow (UV-365nm)	0.16	+ bule (vis)	0.14	+ (green) (UV-365nm)	0.13	+yellow-brown (vis)	0.13	+ orange (vis)	0.14	+orange,green (UV-365nm)	0.13 0.21 0.3	+ bule (vis)	0.21	-	-	+ blue (vis)	0.08	-	-

ผลการทดลองความเป็นพิษ Brine Shrimp(Brine Shrimp Toxicity test)

ผลการทดลองความเป็นพิษต่อ Brine Shrimp เพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดใดน่าจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อ Brine Shrimp(Brine Shrimp Toxicity Test)

สารสกัด	ความเข้มข้น(µg/ml)	จำนวนตาย(%)
petroleum ether extract	500	0
	50	0
	5	0
chloroform extract	500	0
	50	0
	5	0
ethyl aetate extract	500	50.0
	50	3.03
	5	2.44
ethanol extract	500	12.19
	50	0
	5	0
blank (น้ำทะเล)	-	0

การวิเคราะห์ผลการทดลอง Brine Shrimp Toxicity Test

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ด้วยวิธี Brine Shrimp Toxicity Test สามารถบันทึกผลการทดลองได้เป็นจำนวนของ Brine Shrimp ที่ตาย (ตัว) และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

1. ค่า CHI-SQUARE (X^2)
2. ค่า LD_{50}
3. ค่า Upper limit ของค่า LD_{50} (UL)
4. ค่า Lower Limit ของค่า LD_{50} (LL)

โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Finney's Probit Analysis ซึ่งแปลผลในการทดลองนี้ ได้ผลการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปผลความเป็นพิษต่อ Brine Shrimp

สารสกัด	X^2	LD_{50}	UL	LL	G
petroleum ether extract	-	-	-	-	-
chloroform extract	-	-	-	-	-
ethyl acetate extract	14.4926	592.2875	1072.9480	393.8309	0.0794
ethanol extract	-	-	-	-	-

การแปลผล

ค่า LD_{50} หมายถึง ค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง ของจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด มีหน่วยเป็น µg/ml

จากผลการคำนวณ พบว่าสารสกัดที่นำมาทำการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดย Brine Shrimp Toxicity Test มีฤทธิ์มากน้อยแตกต่างกันไป เมื่อพิจารณาจากค่า LD_{50} โดยสารสกัดที่ให้ผลการวิเคราะห์ค่า LD_{50} น้อยกว่า 20 µg/ml. ถือว่า สารนั้นมีฤทธิ์ที่น่าสนใจมาก ค่า LD_{50} 20 - 1000 µg/ml ถือว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ที่น่าสนใจ และค่า LD_{50} มากกว่า 1000 µg/ml. แสดงว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ไม่น่าสนใจ

สรุปผลการทดลอง

จากตารางบันทึกผลการทดลองแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์น่าสนใจ คือ สารสกัดที่ให้ค่า LD_{50} < 1000 µg/ml ซึ่งได้แก่สารสกัด ethyl acetate (LD_{50} = 592.2875 µg/ml.) เมื่อได้เปรียบเทียบกับสารสกัด pet. ether, สารสกัด chloroform, และสารสกัด ethanol ซึ่งโปรแกรมสำเร็จรูป Finney's Probit Analysis ไม่สามารถคำนวณผลการทดลองออกมาได้ เนื่องจากผลการทดลองมีค่าไม่อยู่ในช่วง ของค่าที่โปรแกรมตั้งเอาไว้

วิจารณ์ผลการทดลอง

ถึงแม้ว่า สารสกัด ethyl acetate (500 µg/ml) จะให้ค่า LD_{50} = 592.2875 µg/ml. ซึ่งถือว่ามีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดอื่น ๆ (pet.ether extract, chloroform extract และ ethanol extract) ในการทดลองนี้ แต่ก็ยังถือว่าสารสกัด ethyl acetate จากใบโคกกะออม ยังมีความเป็นพิษต่อ cell

น้อยอยู่ ดังนั้นผลจากการวิจัยนี้ อาจจะเป็นแนวทางในการพิจารณาว่าควรจะนำสารสกัดนี้ มาศึกษาต่อไป โดยการหาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้านอื่นๆที่น่าสนใจ

ผลการทดลองฤทธิ์ต้านจุลชีพ(Antimicrobial activity test)

การทดลองเพื่อหาฤทธิ์ต้านจุลชีพ ในการวิจัยใช้เชื้อ bacteria gram positive คือ *Streptococcus pyogens* และ *Staphylococcus aureus* เชื้อ bacteria gram negative คือ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ส่วนเชื้อราที่ใช้คือ *Candida albicans.* ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังที่พบได้บ่อยๆ และใช้ Ampicillin และ Tetracyclin เป็น positive control ของ bacteria gram positive Amikacin และ Gentamicin เป็น positive control ของ bacteria gram negative ส่วนเชื้อราจะใช้ Ampicillin และ Teracyclin เป็น positive control (ซึ่งเป็น positive control ที่ยังไม่ดีนัก เนื่องจากไม่สามารถหา positive control คือตัวยา Nystatin หรือยากลุ่ม imidazole ได้)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ(Antimicrobial activity test)

ชนิดของ disc	ปริมาณ	Clear zone (mm)				
	(µg/disc)	*E. coli*	*Ps. auruginosa*	*C.albican*	*S.pyogens*	*S.aureus*
Sample disc						
petroleum ether	10000	-	-	-	-	-
extract	5000	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
Chloroform extract	10000	-	-	-	-	-
	5000	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
ethyl acetate extract	10000	-	-	-	9	10
	5000	-	-	-	-	10
	1000	-	-	-	-	10
ethanol-extract in	10000	-	-	-	-	10
DMSO	5000	-	-	-	-	10
	1000	-	-	-	-	10
Positive control disc						
Ampicillin	(10)	*	*	-	-	25
Amikacin	(30)	13	12	*	*	-
Gentamicin	(10)	14	9	*	*	-
tetracyclin	(30)	*	*	-	14	16

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ(Antimicrobial activity test)(ต่อ)

ชนิดของ disc	ปริมาณ (µg/disc)	Clear zone (mm)				
		E. coli	*Ps. auruginosa*	*C.albican*	*S.pyogens*	*S.aureus*
Control disc						
petroleum ether extract		-	-	-	-	-
chloroform extract		-	-	-	-	-
ethyl acetate extract		-	-	-	-	10
DMSO		-	-	-	-	10

หมายเหตุ 1) เส้นผ่าศูนย์กลาง disc เท่ากับ 6 mm

(-) หมายถึงไม่เกิด clear zone

2) การวัด clear zone วัดผ่านเส้นผ่าศูนย์กลาง (mm) ของ disc

3) Ampicillin และ Tetracyclin เป็น positive control ของ *S.aureus* และ *S. pyogens*

Amikacin และ Gentamicin เป็น Positive control ของ *E.coli* และ *Pseudo. aeruginosa*

4) ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางจากการทำการทดลอง แบบ duplicate

5) * หมายถึง ไม่ได้ทำการทดลอง

การแปลผล

สารสกัดจากใบโคกกะออม ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ bacteria หรือเชื้อราได้ จะเกิด clear zone หรือ inhibition zone รอบ ๆ แผ่น disc จะวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง โดยวัดรวมแผ่น disc ด้วย

สรุปผลการทดลอง

พบว่า สารสกัดจากใบโคกกะออม คือ petroleum ether extract(10,000, 5,000 และ 1,000 µg/disc), ethanol extract (10,000, 5,000, 1,000 µg/disc) ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E.coli, Pseudo.aeruginosa, C.albican* และ *S.aureus* แต่ ethyl acetate extract ที่ความเข้มข้น 10,000 µg/disc. จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.pyogens* โดยเกิด clear zone = 9 mm. ซึ่งเมื่อพิจารณาจาก control ที่ใช้คือ ethyl acetate ซึ่งไม่เกิด clear zone แสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ แสดงว่าฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพนี้เป็นฤทธิ์ของ crude extract. ส่วน ethyl acetate extract ที่ความเข้มข้น 5,000 และ 1,000 µg/disc เกิด clear zone ต่อเชื้อ *S.aureus* แต่เป็นผลมาจาก solvent คือ ethyl acetate ที่ใช้ ดังนั้นจึงถือว่า ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

วิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดใบโคกกะออมใน ethyl acetate แม้ว่าจะมีฤทธิ์ต่อเชื้อ *S.aureus*. แต่ก็เกิด clear zone หรือ inhibition zone น้อยมาก คือ 9 mm. ในขณะที่ความเข้มของสารสกัดสูงถึง 10,000 µg/disc เมื่อเทียบจากการทดลองที่เคยมีผู้ทดลองมาก่อน คือสารสกัดใบโคกกะออมใน ethanol พบว่า เกิด clear zone 20 mm. ต่อ *S.aureus* เกิด clear zone ต่อ 30 mm. *C.albicans* และเกิด clear zone 17 mm. ต่อ *S.pyogenes* โดยมีความเข้มข้นเพียง 1,000 µg/disc เพราะฉะนั้น เมื่อนำมาสกัดต่อด้วย solvent ต่าง ๆ อาจเป็นไปได้ว่า สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ ส่วนใหญ่จะอยู่ใน สารสกัด ethanol และมีบางส่วนมาอยู่ในสารสกัด ethyl acetate และการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบโคกกะออม อาจต้องอาศัยสารสำคัญในการเสริมฤทธิ์กัน (synergism) เมื่อนำมาศึกษาต่อจากการทดลองที่เคยมีผู้ทำการทดลองมาก่อน โดยแยกสกัดเป็นส่วนๆ กับทำให้มีฤทธิ์ลดต่ำลง (ดูจาก clear zone) เพราะฉะนั้นสารสกัด ethanol extract จึงน่าสนใจมากกว่าในการนำไปพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพ ต่อไป

ผลการทดลองฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ(Mosquito larvicide test)

ในการทดลองนี้ เป็นการทดสอบฤทธิ์ของโคกกะออมว่า สารสกัดใดของโคกกะออม จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำมากกว่ากัน และสามารถนำผลที่ได้มาประยุกต์ใช้ เพื่อทดแทนสารเคมีที่ใช้กันอยู่อย่างมากมาย ซึ่งสารเคมีเหล่านั้น มักจะมีฤทธิ์ตกค้าง และเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ(Mosquito larvicide test)

สารสกัด	ความเข้มข้น	จำนวนลูกน้ำที่ตาย (ตัว) (คำนวณเป็น %)							
	(µg/ml)	1 ชม.		2 ชม.		3 ชม		24 ชม.	
petroleum ether extract	5000	0	(0)	1.5	(15)	2.5	(25)	9.5	(95)
chloroform extract	5000	1.5	(1.5)	1.5	(15)	2.5	(25)	8	(80)
ethyl acetate extract	5000	0	(0)	0	(0)	2	(20)	4	(40)
ethanol extract	5000	10	(1)	1	(10)	1.5	(15)	4.5	(45)
control DMSO	20µl/ml	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

หมายเหตุ - จำนวนลูกน้ำที่ใช้ เป็นตัวอย่างที่ใช้ เป็นตัวอย่างแต่ละการทดลอง 10 ตัว

- ใช้ DMSO เป็น control เนื่องจาก DMSO เป็น Co-Solvent ที่ละลายสารสกัดทั้ง 4 อย่างได้เป็นอย่างดี ทำให้สารสกัดที่ไม่ละลายน้ำ หรือละลายได้น้อย คือ pet. ether extract และ chloroform extract เข้ากันได้กับน้ำ

การแปลผล

สารสกัดจากใบโคกกะออม ที่มีฤทธิ์ทำลายหรือฆ่าลูกน้ำได้ เมื่อครบเวลาที่กำหนด คือ 1,2,3 และ 24 ชม. จะมีลูกน้ำนอนอยู่ที่ก้น beaker ไม่เคลื่อนไหว ซึ่งถือว่าเป็นลูกน้ำที่ตาย

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำ พบว่า

- Control จะใช้ DMSO ซึ่งเป็น solvent ที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่า DMSO ไม่มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ แสดงว่าฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำเกิดจาก crude extracts

- สารสกัด petroleum ether extract จะมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชม (15%) และจำนวนลูกน้ำตายเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชม. (25 %) และ 24 ชม. (95 %)

- สารสกัด chloroform extract จะมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 (15 %) และในชั่วโมงที่ 2 จะมีจำนวนลูกน้ำตายเท่าเดิม (15 %) แต่เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชม. (25 %) และ 24 ชม. (80 %) จะมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำได้มากขึ้น จะพบว่า % ลูกน้ำที่ตายมีค่าน้อยกว่าเมื่อใช้ pet. ether extract.

- สารสกัด ethyl acetate extract จะมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำได้เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชม (20 %) และ 24 ชม. (40 %) จะเห็นว่าจำนวน % ลูกน้ำที่ตาย จะน้อย เมื่อเทียบกับ pet.ether extract และ chloroform extract

- สารสกัด ethanol extract จะมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำได้เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชม. (10 %) ส่วน ชม. ที่ 2 จะมีจำนวนลูกน้ำตาย จำนวนเท่าเดิม (10 %) และจะฆ่าลูกน้ำได้เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชม. (15 %) และ 24 ชม. (45 %) และเช่นเดียวกับ ethyl acetate extract จำนวนลูกน้ำที่ตายจะน้อยเมื่อเทียบกับ pet. ether extract และ chloroform extract

วิจารณ์ผลการทดลอง

พบว่า pet.ether extract และ chloroform extract ที่ความเข้มข้น 5000 µg/ml ให้ผลอยู่ในระดับที่น่าสนใจมากกว่า ethyl acetate extract และ ethanol extract ซึ่งถ้าหากว่าสารมีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำได้ ก็ควรจะมีฤทธิ์ทำลายหรือฆ่าแมลงชนิดอื่น ๆ ที่มีช่วงชีวิตที่เป็น larva อาศัยอยู่ในน้ำจืดได้เช่นกัน

ข้อมูลจากผลการทดลองนี้ สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาวิจัยขั้นต่อไปได้ เพื่อพัฒนาเป็นยาฆ่าแมลงต่อไป โดยควรแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ ประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงจะได้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล : 2535 : สมุนไพรสวนสิริรุกชาติ : หน้า 124
2. ชาญชัย สาดแสงจันทร์ ; สุภิญญา ติ๋วตระกูล และ คณะ : 2538 : การศึกษาสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อทางผิวหนัง : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. เต็ม สมิตินันท์ : 2533 : ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย : กรุงเทพมหานคร กรมป่าไม้
4. พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ : 2534 : คู่มือการใช้สมุนไพร : เมดิคัลมีเดีย กรุงเทพมหานคร : หน้า 306
5. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาสงขลานครินทร์ : 2532 : คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา และ ปริสิตวิทยา 326 - 401, หน้า 6.1 - 6.9
6. ALAM, MK : 1992: MEDICINAL ETH NO BOTANY OF THE MARMA TRIBE OF BANG LADESH : ECON BOT 463 : PAGE 330 - 335
7. ANON : 1903 : DESCRIPTION OF THE PHILIPPINESS . PART 1 : BUREAU OF PUBLIC
8. ARBAIN, D : CANNO, JR : AFRIASTINI : KARTAWINATA, K : DJAMAL, R : BUSTARI, A : ROSMAWATY : RIVAI, H : ZAHERMAN : BASIR, D : ET AL : 1989 : SURVER OF SOME WEST SUMATRAN PLANTS FOR ALKALOIDS : ECON BOT 43 : PAGE 73 - 78 PRINTING MANILA :
9. ARSECULERATINE, SN : GUNATILAKA, ALL : PANABOKKE, RG : 1985 : STUDIES ON MEDICAL PLANTS OF SRI CANKA : PART 14 : J.ETONPHARMACOL 133 : PAGE 323 - 335
10. BAQUAR, SR : TASNIF, M : 1967 : MEDICINAL PLANTS OF SOUTHERN. WEST PAKISTAN : PAK P C S I R BULL MONOGR 3 : PAGE -
11. CHOPRA, RN : 1933 : IDIGENOUS DRUGS OF INDIA : THE ART PRESS, CALCUTTA, INDIA : PAGE 550-.
12. DHAR, ML : DHAR, MM : DHAWAN, BN : MEHROTRA, BN : RAY, C : 1968 : SCREENING OF INDIAN PLANTS FOR BIOLOGICAL ACTIVITY. PART 1 : INDIAN J. EXP BIOL G : PAGE 232 - 247
13. HECKEL, E : 1903 : LES PLATES MEDICINALS ET TOXIQUES DE MADAGASCAR : A. CHALLAMEL, PARIN : PAGE -
14. KAPUR, RD : 1948 : ACTION OF SOME INDIGENOUS DRUGS ON UTERUS : A

PRELIINARY NOTE : INDIAN J. MED RES 36 : PAGE 47

15. KHAN, MSY : ARYA, M : , JAVED, K : KHAN ,MH : 1990 : CHEMICAL EXAMINATION OF CARDIOSPERMUM HALICACABUM LINN : INDIAN DRUGS 274 : PAGE 257 - 258.
16. MENG, ZM : SAKI,Y : OSE, Y : OSE,Y : SATO,T : NAGASE, H : KITO, H : SATO, M : ONO, K : NAKANE, H : 1990 : MUTAGENIC ACTIVITY BY THE MEDICIN. PLANT IN TRADITIONAL CHINESE MEDICINES : SHOYA ZASSHI 443 : PAGE 225 - 229
17. PANTHONG, A : KANJANAPOTHI, D: TALOR, WC : 1986 : ETHOBOTIAICAL REVIEW OF MEDICINAL PLANTS FROM THAI TRADITIONAL BOOKS , PART 1 : J. ETHNOPHARMACOL
183 : PAGE 213 - 228
18. PILLAI, NR: VIJAYAMMA, N: 1985 : SOME PHARMACOLOGICAL STUDIES ON CARDIOSPERMUM HALICACABUM : ACIENT SCI LIFE 51 : PAGE 32 - 36
19. SADIQUE , J : CHANDRA, T : THEMOZHI,V : ELAGO, V: 1987 : BIOCHEMICAL HODES OF ACTION OF CASSIA OCCIDENTALIC AD CARDIOSPERMUM HALICACABUM IN INFLAMMATION : J ETHNOPHARMACOL 192 : PAGE 201 - 212
20. SAHA, JC : SAVINI, EC : KASINATHA, S : 1961 ECBOLIC PROPERTIES OF INDIAN MEDICINAL PLANTS. PART 1 : INDIAN J. MED RES 49 : PAGE 130 - 151.
21. SEIGLER, DS : 1976 : PLANTS OF THE NORTHESTERN UNITED STATES THAT PRODUCE CYANOGENIC COMPOUDS : ECON. BOT 30 : 295 - 407
22. SHUKLA,SD : MODI,NT : DESHMANKAR, BS : 1973 : PHARMACOLOGICAL ACTIONS OF AN. ALUALOIDAL FRACTION FROM CADIOSPERMUM HALICACABUM : INDIAN J : PHARMACY 35 : PAGE 40

ตารางที่ 6 Spray reagents ที่ใช้สำหรับ TLC (Thin Layer Chromatography)

Reagent	ส่วนประกอบ	วิธีทดลอง	ผลการตรวจสอบ
Antimony (III) chloride ($SbCl_3$)	สารละลาย $SbCl_3$ 20% ใน choroform	สเปรย์ plate ด้วย reagent 15-20 ml หลังจากนั้นให้ความร้อน 100 °C เป็นเวลา 5-6 นาที ดูผลด้วยตาเปล่า หรือ UV-365nm	**candenolides**: pink and blue-violet (vis) **bufadienolides** : blue (vis) or yellow-green fluorescent (UV - 365 nm)
Berlin blue (BB)	ละลาย 10 g ของ iron (III) chloride และ 0.5 g.ของ potassium hexacya-noferrate ในน้ำ 100 ml	สเปรย์ plate ด้วย reagent 5-8 ml. และดูผลด้วยตาเปล่า	**arbutin** : blue (vis)
Conc.hydrochloric acid-glacial acetic acid(HCl/AA)	ผสม Conc.HCl 8 ส่วน กับ glacial acetic acid 2 ส่วน	สเปรย์ plate ด้วย reagent และให้ความร้อน 110 °C เป็นเวลา 10 นาที ดูผลด้วยตาเปล่า หรือ UV-365 nm.	**valepotriates** : blue or brown(vis)
Dragendorff	ละลาย 0.85 g ของbasic bismuth nitrate ในน้ำ 40 ml. และ 10 ml. ของ glacial acetic acid และเติม 8 g ของ KI ที่ละลายในน้ำ 20 ml. ลงไป	สเปรย์ plate ด้วย reagent	**alkaloids** : red-brown(vis)
Fast Blue Salt (FBS)	ละลาย 0.5 g. ของ Fast blue salt B ในน้ำ 100 ml.	สเปรย์ plate ด้วย reagent 6-8 ml ทำให้ แห้ง และดูผลด้วยตาเปล่า อาจจะสเปรย์ plate ซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ 0.1 M NaOH และดูผลด้วยตาเปล่า	**flavonoids** : yellow or green or orange (UV-365 nm)
Potassium hydroxide (KOH)	5% หรือ 10 % Ethanolic KOH	สเปรย์ plate ด้วย reagent 10 ml และ ดูผลด้วยตาเปล่า หรือ UV-365 nm.	**anthraquinones**: red(vis); red fluorescent(UV-365 nm) **anthrones** : yellow(vis); yellow-fluorescent (UV-365 nm) **coumarins** : blue (UV-365 nm)
Vanillin - Sulphuric acid (VS)	5% Ethanolic sulphuric acid(solution I) 1% Ethanolic vanillin (solution II)	สเปรย์ plate ด้วย solution I 10 ml และตามด้วย solution II 5-10 ml หลังจากนั้นให้ความร้อน 110 °C เป็นเวลา 5-10 นาทีดูผลด้วยตาเปล่า	**saponin** : blue (vis) **bitter principle** : red - brown, yellow-brown or dark - green (vis) **essential oil** : blue, brown or red(vis)