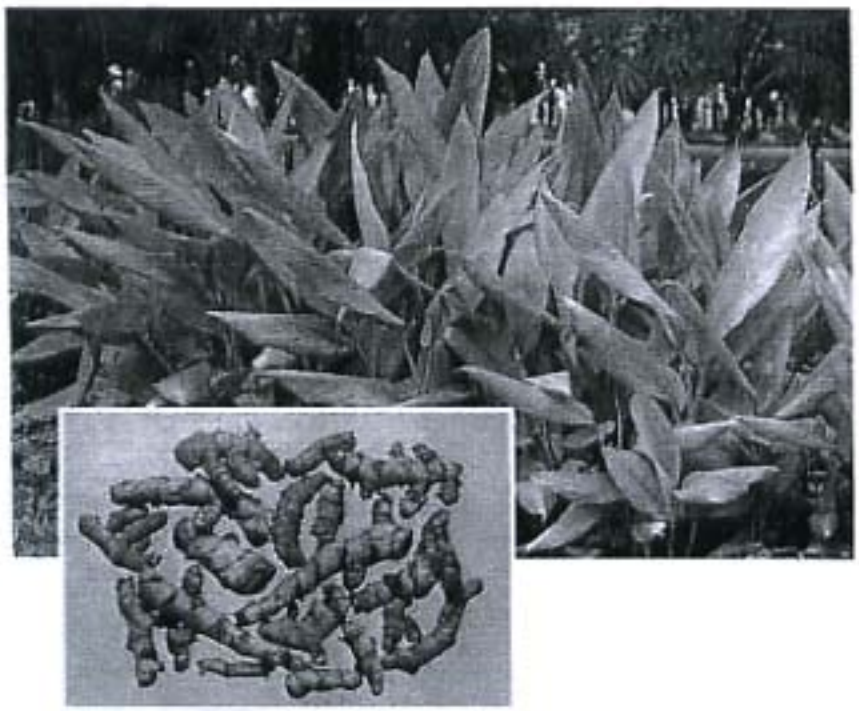
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง



ภาพ 2.1 ต้นและเหง้าของขมิ้นชัน

2.1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma longa* Linn

วงศ์ ZINGIBERACEAE

ชื่ออื่นๆ ทั่วไป : ขมิ้นชัน

ภาคเหนือ : เข้าบิ้น

เชียงใหม่ : ขมิ้นป่า ขมิ้นหัว ขมิ้นหยวก ขมิ้นแกง

ภาคใต้ : หมิ้น ขี้มิ้น

ถิ่นกำเนิด ไทย อินโดนีเซีย มาเลเซีย อินเดีย จีน

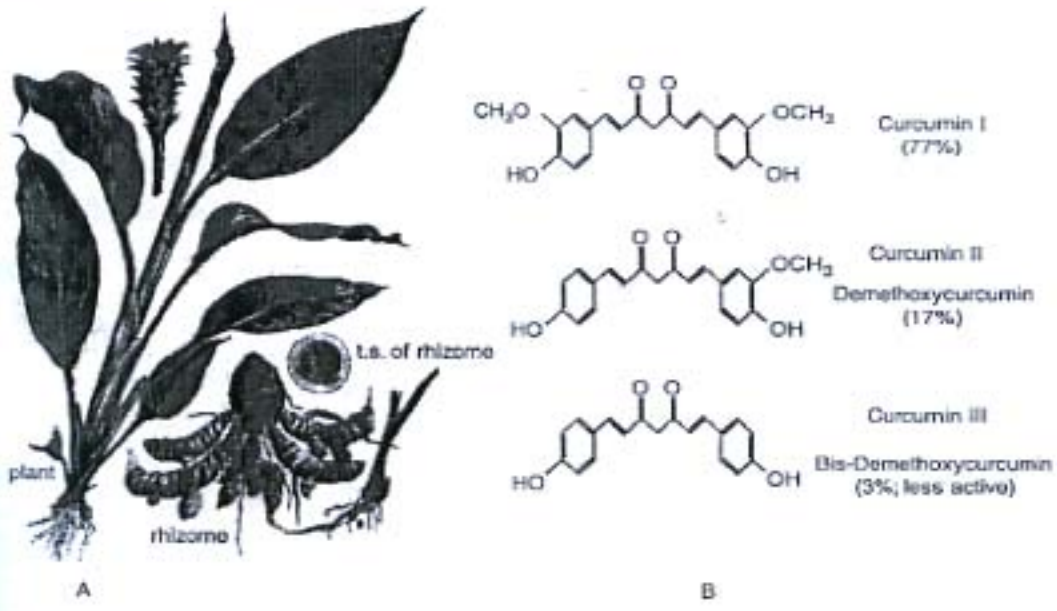
ลักษณะ เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุข้ามปี (perennial) มีเหง้าใต้ดิน เนื้อในสีเหลืองอม ส้ม มีกลิ่นหอม ซึ่งเมื่อสกัดสารจากเหง้าของขมิ้นชันโดยเอทธานอลจะได้ เคอร์คูมิน ที่มีลักษณะ

คล้ายผลึกสีเหลืองส้ม ไม่ละลายน้ำ มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{21}H_{20}O_6$ (Lampe *et al.*) ดอกออกเป็นช่อ ใบประดับสีเขียวอ่อนๆ หรือสีขาว รูปหอกเรียงซ้อนกัน ใบประดับ 1 ใบมี 2 ดอก กลีบดอกสีขาว โคนเชื่อมติดกันเป็นท่อยาว ปลายแยกเป็น 3 ส่วน เกสรตัวผู้คล้ายกลีบดอก มีขน อับเรณูอยู่ใกล้ๆ ปลายท่อเกสรตัวเมียเล็กยาว ยอดเกสรตัวเมียรูปปากแตร เกลี้ยง รังไข่มี 3 ช่อง แต่ละช่องมีไข่อ่อน 2 ใบ

เหง้า (rhizome) ขมิ้นชันที่ซื้อขายมีขนาดยาวตั้งแต่ 2.5–7.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร มีสีแตกต่างกันตั้งแต่เหลืองถึงแดงอมส้ม ขึ้นอยู่กับปริมาณเม็ดสี (ทางการตลาดนิยมเม็ดสีประมาณร้อยละ 2-7) ในเหง้ายังมีน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการบำบัดทางกลิ่นและรส ขมิ้นชันที่ดีควรมีอัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหยต่อเม็ดสี 1 ต่อ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

2.2. สารสำคัญในเหง้าขมิ้นชัน

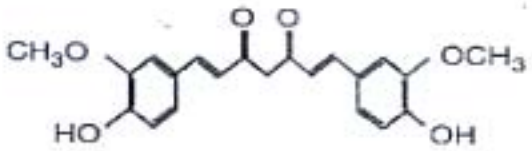
เม็ดสีในเหง้าของขมิ้นชัน ประกอบด้วยสารเคอร์คูมินอยด์ 3 กลุ่ม ใหญ่ คือ เคอร์คูมิน ประมาณร้อยละ 77 ดีเมโทซิวเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) ประมาณร้อยละ 17 และ บิสดีเมโทซิวเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) ประมาณร้อยละ 3 (Bharat *et al.*, 2005) ซึ่งสารเหล่านี้มีการนำมาใช้ประโยชน์มากมายดังที่กล่าวไปแล้ว



ภาพ 2.2 ต้นขมิ้นชัน (A), โครงสร้างของสาระสำคัญทั้ง 3 กลุ่ม (B) (Bharat *et al.*, 2005)

2.2.1. Curcumin

มีคุณสมบัติเป็นตัวต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Antioxidation) ทำลายอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งที่ทางเดินอาหาร และผิวหนังได้ (พรจาม, 2538)

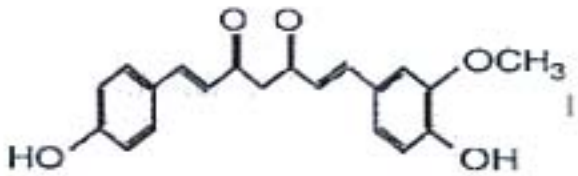


ภาพ 2.3. สูตรโครงสร้างของ Curcumin (Bharat *et al.*, 2005)

- มีน้ำหนักโมเลกุล 368.39 สูตรโมเลกุล คือ $C_{21}H_{20}O_6$
- จุดหลอมเหลว 183 องศาเซลเซียส
- เป็นผงสีเหลืองอมส้ม
- ไม่ละลายน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์
- ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ อะซีโตน ไพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) กรดน้ำส้มเข้มข้น เบนซิน
- มีสีน้ำตาลแดงในด่าง สีเหลืองในกรด ช่วงที่เปลี่ยนแปลงสี คือ ช่วง pH ประมาณ 8-9

2.2.2. Demethoxycurcumin หรือ (p-hydroxycinnamoyl) feruloylmethane

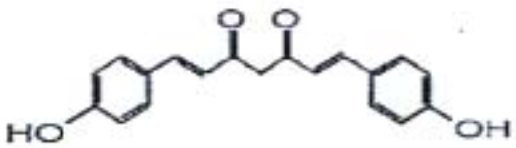
เป็นผงสีเหลืองแดง มีจุดหลอมเหลวประมาณ 168 องศาเซลเซียส สูตรโมเลกุล คือ $C_{20}H_{18}O_5$



ภาพ 2.4. สูตรโครงสร้างของ Demethoxycurcumin (Bharat *et al.*, 2005)

2.2.3. Bisdemethoxycurcumin หรือ Bis (p-hydroxycinnamyl) methane

เป็นผงสีเหลืองส้ม มีจุดหลวมเหลว 224 องศาเซลเซียส สูตรโมเลกุล คือ $C_{19}H_{16}O_4$



ภาพ 2.5. สูตรโครงสร้างของ Bisdemethoxycurcumin (Bharat *et al.*, 2005)

ความต้องการพืชในกลุ่มขมิ้นชันของตลาดโลกอยู่ที่ประมาณ 15,000 ถึง 20,000 ตัน และมีความต้องการสารเคอร์คูมินบริสุทธิ์ ประมาณ 150 ตัน (International Trade Centre, 1982) ตลาดหลักของโลกที่มีต้องการขมิ้นชัน คือ อิหร่าน ยุโรปตะวันออก (International Trade Centre, 1992) (โดยเฉพาะ ยูเค และเยอรมันนี) อเมริกาเหนือ (American Spice Trade Association, 1995) และญี่ปุ่น และประเทศอินเดียเป็นแหล่งส่งออก Madras และ Alleppey ซึ่งเป็นพืชกลุ่มเดียวกับขมิ้นชันมากที่สุดเนื่องจากมีปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์สูงประมาณร้อยละ 4.5-6.5 (United States Department of Agriculture Foreign, 1995) แต่ขมิ้นชันของประเทศไทยมีคุณภาพที่ไม่ดีเนื่องจากมีปริมาณเมือกสีมาก แต่ให้โทนสีที่ไม่ดี ไม่เป็นที่ยอมรับของหลายประเทศในแถบทะเลคาริเบียน อเมริกาใต้ จาไมกา เปรู และ เฮติ (Smith, 1982) ปัจจุบันญี่ปุ่นจึงหันมานำเข้า Rajpuri ซึ่งเป็นพืชในกลุ่มเดียวกับขมิ้นชันที่มีคุณภาพดีเป็นพิเศษจากอินเดียแทน

ปัจจุบันจึงมีความจำเป็นต้องวิจัยและพัฒนาการผลิตและการส่งออกขมิ้นชันเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพดีมีปริมาณเคอร์คูมินสูง และให้โทนสีที่ดี ทัดเทียมกับของประเทศอินเดียทั้งในด้านคุณภาพ และปริมาณ (FAO, 1995)

ในปัจจุบันนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทมากทั้งในด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน การเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรม ซึ่งสามารถจำแนกประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างกว้างๆ ดังนี้ คือ การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในเวลาอันสั้น การผลิตพืชที่ปราศจากโรค การปรับปรุงพันธุ์พืช การผลิตยาและสารทุติยภูมิจากพืช การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา พันธุศาสตร์ และการเก็บรักษาพันธุ์พืช (Robert *et al.*, 1999)

2.3. งานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

Prathanturarug *et al.* (2003) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงตายอดขมิ้นชันในอาหารวุ้นสูตร Murashige and Skoog (MS) (Murashige *et al.* 1962) ที่เติม thidiazuron (TDZ) 18.17 µM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเกิดการชักนำยอดได้ 18.22 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และเมื่อเติม 1-naphthalene acetic acid (NAA) 0.54 µM เปรียบเทียบกับที่ไม่เติม NAA พบว่าการเติม NAA มีผลทำให้จำนวนยอดขมิ้นชันที่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วัชรินทร์ และอรดี (2543) ทดลองเลี้ยงตายอดของขมิ้นชันบนอาหารวุ้น MS ที่เติม 6-benzylaminopurine (BA) 13.3 µM เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำให้เกิดยอดเฉลี่ย 2.7 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วน Salvi *et al.* (2002) พบว่าการเลี้ยงตายอดขมิ้นชันบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 10 µM ร่วมกับ NAA 1 µM เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเกิดยอดเฉลี่ย 4.2 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

Sunitibala *et al.* (2001) รายงานการเพาะเลี้ยงตาเหง้า และปลายยอดของขมิ้นชันบนอาหารวุ้น MS ที่เติม NAA 1 mg/l kinetin 1 mg/l และ 6-benzylaminopurine (BAP) 2 mg/l สามารถขยายพันธุ์ได้เร็วที่สุด ส่วนการชักนำแคลลัสดีที่สุดบนอาหารวุ้น MS ที่เติม 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 2.5-3.0 mg/l

Shetly *et al.* (1992) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนตาของขมิ้น โดยการนำส่วนตาจากเหง้ามาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS ที่มี kinetin ความเข้มข้น 0.2-0.5 mg/l น้ำตาลร้อยละ 4 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มี "green spot" เมื่อย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรอาหารเดิมในสภาพที่มีแสง และย้ายอาหารเลี้ยงหลายๆ ครั้งพบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้น และรากได้

Winnaar (1989) ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจำนวนจากตาของขมิ้น โดยนำตาจากเหง้ามาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นต่างๆ กันภายในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากที่สุดเฉลี่ย 8 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี BA เพียงอย่างเดียว ความเข้มข้น 1.0 mg/l ร้อยละ 2

Nadgauda *et al.* (1978) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเหง้าของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) พันธุ์ Duggirala และ Tekurpeta บนอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว kinetin และ BA และอาหารสูตร Smith ที่เติมน้ำมะพร้าว kinetin BA และ myo-inosital พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก และเกิดรากที่มีความแข็งแรงจำนวนมากเมื่อย้ายยอดเหล่านี้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร White ที่เติมน้ำตาลร้อยละ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนต้นขมิ้นถ้าเลี้ยงไว้ในอาหารอย่างน้อย 4 สัปดาห์

และการเพิ่มปริมาณโดยการย้ายเลี้ยงไว้บนอาหารใหม่สามารถทำได้ตลอดทั้งปีโดยไม่มีการพักตัวเหมือนต้นที่ปลูกในแปลง

สุมนา และคณะ (2542) เลี้ยงตายอดของขมิ้นที่มีขนาด 1 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 22.2 µM สามารถกระตุ้นให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุด 3.3-3.8 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในระยะเวลา 4-8 สัปดาห์ และยอดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 31.1 µM

นพมาศ และคณะ (2546) รายงานว่าการเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดขมิ้นชันในอาหารสูตร MS ที่เติม Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 18.2 µM ทำให้ได้จำนวนยอดเฉลี่ย 18.2 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ในระยะเวลา 12 สัปดาห์

Rahman *et al.* (2004) เลี้ยงชิ้นส่วนตาจากเหง้าขมิ้น ขนาด 1 เซนติเมตร บนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ออกซิน ร่วมกันไซโตไคนินหลายชนิด พบว่า ชุดการทดลองที่เติม BA 10 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด คือ 14.5 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

2.3. การย้ายต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก

พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด จำเป็นต้องมีการปรับสภาพต้นอ่อนก่อนการย้ายออกปลูก(Acclimatization) โดยปรับสภาพต้นอ่อนที่ได้ให้คุ้นเคยกับอากาศ และสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ช่วยเพิ่มโอกาสรอดชีวิตให้กับต้นอ่อน เนื่องจากสภาพในขวดเพาะเลี้ยงมีปริมาณความชื้นสูง ความเข้มแสงน้อย ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ เนื่องจากอัตราการแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างภายในและภายนอกขวดมีน้อย ถ้าไม่มีการปรับสภาพก่อน พืชอาจทนต่อสภาพที่เปลี่ยนไปไม่ได้ ดังนั้นเพื่อให้ต้นพืชสามารถดำรงชีวิตได้เมื่อย้ายออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงในถุงเพาะชำ

Keshavachandram and Khader (1991) ได้ทำการปรับสภาพโดยนำต้นอ่อนของขมิ้น 2 พันธุ์ คือCo. 1 และ BSR. 1 ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ออกปลูกในกระถางที่คลุมด้วย polyethylene ภายใต้ร่ม ต้นอ่อนของขมิ้นสามารถตั้งตัวได้ภายใน 2 สัปดาห์หลังการย้ายออกปลูก

กิตติศักดิ์ (2546) นำขวดที่เพาะเลี้ยงต้นหน่อนวลจายหยากมาคลายเกลียวฝาขวดทิ้งไว้ 1 วัน และเปิดฝาออกอีก 1 วัน แล้วล้างวุ้นออกจากรากให้หมด จากนั้นแช่ต้นอ่อนในน้ำยาฆ่าเชื้อรา คาแบนดาซิน 0.2% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายปลูกในวัสดุปลูก คือ ถ่านแกลบ : ขุยมะพร้าว: ยัดราส่วน 1 :1: 1 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% เช่นเดียวกับ อนล (2547) ได้

ปรับสภาพต้นอ่อนกระชายดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนย้ายออกปลูกในวัสดุปลูกโดยวิธีการเดียวกับ กิตติศักดิ์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100% เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ยังมีการปรับสภาพความชื้นในขวดโดยการเจาะฝาขวดแล้วติดแผ่นกรองขนาดต่างๆ กันคือ 10, 16, 22 และ 40 มม เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซ และความชื้นได้ เปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้เจาะฝาขวด พบว่ากลุ่มของต้นอ่อนที่เลี้ยงในขวดที่เจาะรูและติดแผ่นกรองจะมีความสูงของต้นอ่อนมากกว่า (Gribaudo, 2001)

2.4. การสกัดสาร และการแยกสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร

2.4.1. สารสกัดจากพืช

มนุษย์ตั้งแต่สมัยโบราณจนถึงปัจจุบัน ได้นำพืชสมุนไพร และพืชหอมมาใช้เป็นสารป้องกันศัตรูทางการเกษตร (Insecticide) ใช้เป็นส่วนประกอบของยารักษาโรค เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ทั้งนี้ โดยผ่านวิธีการต่างๆ เพื่อให้ได้สารสกัดจากพืช

สารสกัดจากพืช หมายถึง สารที่ได้จากการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น เปลือก ใบ ต้น ดอก ผล ราก และหัวหรือเหง้า มาสกัดเอาสารในรูปของสารละลาย เพื่อใช้ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร จากการสำรวจพบว่า มีพืชประมาณ 200 ชนิด ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตร พืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มพืชสมุนไพร และพืช หอม ชนิดที่นิยมนำมาใช้ป้องกันกำจัดศัตรูทางการเกษตร ได้แก่ สะเดา ยาสูบ ไพริทัม หางไหล กระเพรา ขมิ้น ตะไคร้หอม เป็นต้น (นภกานต์, 2545)

2.4.2. วิธีการสกัดพืชสมุนไพร

วิธีการหลักที่ใช้ในการสกัดพืชสมุนไพร ได้แก่

2.4.2.1. การหมัก (maceration)

เป็นการทำให้วัสดุอ่อนนุ่มด้วยการแช่น้ำ โดยการเอาตัวอย่างพืชที่บดละเอียดมาแช่ในตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด หมั่นแช่ย่าและคนบ่อยๆ ให้ผสมเข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้องค์ประกอบที่ต้องการ โดยน้ำยาสกัดจะแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมา แล้วจึงกรองแยกกากออกจากน้ำยาสกัด และปรับปริมาตรสารสกัดตามต้องการ

2.4.2.2. การกลั่นด้วยไอน้ำ (stem distillation)

ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติสามารถละลาย และระเหยออกมาพร้อมกับไอน้ำได้ เช่น น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น การสกัดทำได้โดยต้มน้ำให้เดือดแล้วใช้ไอน้ำจากน้ำ

เดือดที่มีความดันสูงที่ปรับความดันคงที่ตลอดเวลา ผ่านลงไปในตัวอย่างพืชที่บดละเอียด สารที่มีอยู่ในตัวอย่างพืชที่สามารถละลายได้ในไอน้ำ จะละลายออกมาพร้อมกับไอน้ำ แล้วผ่านเข้าสู่ท่อทำความเย็น ไอน้ำจะจับตัวควบแน่น แล้วกลายเป็นเป็นหยดน้ำไหลลงสู่ภาชนะรองรับ แล้วนำสารละลายหรือชั้นของน้ำมันหอมระเหยไปทำให้บริสุทธิ์

2.4.2.3. การไหลผ่านของสารสกัด (percolation)

เป็นกระบวนการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากพืชโดยปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายเอาองค์ประกอบจากผงสมุนไพรออกมาด้วย โดยบรรจุผงสมุนไพรที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำยาสกัดใน percolator ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ทรงกระบอก ปลายเปิดทั้งสองด้าน ส่วนปลายล่างมักจะต่อกับท่อยางปิด-เปิดได้ เพื่อที่สามารถควบคุมอัตราการไหลของสารสกัดจาก percolator ได้ แช่ผลสมุนไพรในน้ำยาสกัด และทิ้งไว้เป็นระยะเวลาพอสมควร แล้วจึงปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วที่พอเหมาะ พร้อมกับเติมน้ำยาใหม่ลงไปเรื่อยๆ จนองค์ประกอบที่ต้องการในผงสมุนไพรละลายออกมาจนหมด โดยการตรวจสอบจากสารสกัดส่วนสุดท้าย

2.4.2.4. การสกัดแบบซอกเลท (soxhlet extraction หรือ continuous extraction)

เป็นกระบวนการสกัดองค์ประกอบจากสมุนไพรในทำนองเดียวกับ percolator แตกต่างกันที่ว่ากระบวนการนี้จะต้องใช้ความร้อนเข้าช่วย และใช้เครื่องมือที่เป็นระบบปิด โดยขณะที่ตัวทำละลายไหลผ่านตัวอย่างผงพืชจะสกัดสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในพืชออกมาด้วย แล้วไหลลงมารวมกันในขวดแก้วที่ได้รับความร้อนอยู่ตลอดเวลา ทำให้ตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอผ่านท่อทำความเย็นกลับขึ้นไปใหม่ แล้วควบแน่นจับตัวเป็นหยดน้ำไหลลงในตัวอย่างพืชใหม่ การสกัดวนเวียนอยู่เช่นนี้ จนครบกำหนดเวลาตามต้องการ หรือจนกระทั่งองค์ประกอบในพืชสมุนไพรถูกสกัดออกมาหมด การสกัดแบบนี้ใช้เวลา 8-24 ชั่วโมง วิธีนี้ใช้ได้ผลดีกับตัวอย่างที่เป็นผงละเอียด

2.4.2.5. การสกัดด้วยสารเคมีโดยวิธีการแยกชั้น (partition)

การสกัดแบบนี้มักจะใช้กับตัวอย่างพืชสด โดยนำมาหั่นเป็นท่องสั้นๆ ปั่นกับน้ำยาเคมีในเครื่องปั่น แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง สารละลายที่ได้นำมาสกัดด้วยน้ำยาเคมีอีกชนิดหนึ่งเพื่อทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แล้วนำไปไร้ทดสอบประสิทธิภาพ

2.4.3. การแยกสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพร (กฤษณา และสุรศักดิ์, 2547)

การตรวจหาองค์ประกอบของกลุ่มสาระสำคัญ มีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้คือ โครมาโตกราฟี

2.4.3.1. โครมาโตกราฟี (Chromatography)

เป็นเทคนิคการแยกสารเคมีเนื้อเดียวออกจากกันให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการว่า สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายต่างกัน และถูกดูดซับต่างกัน จึงทำให้สารแต่ละชนิดแยกออกจากกันได้ โดยสารประกอบแต่ละชนิดสามารถแบ่งแยกตัวเอง (partition) อยู่ระหว่างส่วนที่ตรึงอยู่กับที่ (stationary phase) และส่วนที่เคลื่อนที่ไป (mobile phase) ทั้งนี้โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของสารประกอบนั้นๆ ดังนั้นการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี จึงต้องอาศัยสมบัติของสารดังนี้

1. สารต่างชนิดกันมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายชนิดเดียวกันได้ดีไม่เท่ากัน สารที่ละลายได้ดีจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่า
2. สารต่างชนิดกันถูกดูดซับโดยตัวดูดซับได้ดีไม่เท่ากัน สารที่ดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ได้ช้า
3. สารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดี และถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ไปได้ไกล
4. สารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อย และถูกดูดซับมากจะเคลื่อนที่ช้าไปได้ไม่ไกล

2.4.3.2. โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin-layer chromatography)

เป็นกระบวนการแยกสารที่ผสมกัน โดยให้สารเคลื่อนที่ไปบนของแข็งละเอียด ซึ่งเคลือบเป็นชั้นบางๆ บนแผ่นกระจกหรือแผ่นสารอย่างอื่น ซึ่งวิธีการนี้ตัวทำละลายจะซึมผ่านชั้นของสารหรือตัวดูดซับที่เคลือบไว้โดยแรงคาพิลลารี ตัวดูดซับ (stationary phase) ที่นิยมใช้กันมากคือ อลูมิเนียมออกไซด์ และซิลิกาเจล ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็นของเหลว

2.4.4. การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสกัดสารจากขมิ้น และการแยกสารสกัดโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี

รัสมี (2523) ศึกษาหาสารประกอบในขมิ้น โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin-layer chromatography) โดยนำเหง้าขมิ้นมาฝานเป็นชิ้นบางๆ แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70

องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่จึงนำมาบดให้เป็นผงละเอียด สกัดด้วยเอทานอล 70% โดยการสกัดร้อนที่อุณหภูมิจุดเดือดของแอลกอฮอล์ สกัดขมิ้นจำนวนเดียวกัน 10 ครั้ง จะให้ปริมาณสารสกัดได้ตั้งแต่ 9.76-10.33% และเมื่อสกัดสารจากขมิ้นด้วยเอทานอล 95% โดยการสกัดเย็นที่อุณหภูมิห้องในการสกัดขมิ้นจำนวนเดียวกันเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้เท่ากับ 46.30% ซึ่งการสกัดในวันแรกจะให้ปริมาณสารมากที่สุด และต่อจากนั้นปริมาณสารที่สกัดได้จะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งในวันที่ 4 และ 5 เป็นต้นไปปริมาณสารสกัดที่ได้เกือบจะคงที่ และเมื่อแยกสารสกัดด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง พบว่า ขมิ้นมีองค์ประกอบเป็นสารประกอบพวก กรดอินทรีย์ แทนนิน ซัลคาลอยด์ เอไมด์ เอมีน กรดอะมิโน น้ำมันหอมระเหย ฟลาวานอยด์ คีโตน สารประกอบไนโตรเจน สเตอรอยด์ สเตอรอล น้ำตาล เทอร์ปีน สารประกอบที่ไม่อิ่มตัว วิตามินดี โดยไม่มีสารประกอบพวกอัลคีไฮล์ เบส ลิปิด และฟีนอล

การศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสีจากขมิ้น โดยใช้ระบบตัวทำละลายหมุนเวียน มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายสกัดหมุนเวียนเปรียบเทียบระหว่างสกัด 3 ครั้ง 4 ครั้ง และสกัดโดยใช้เครื่องสกัดแบบ Soxlet จากการทดลองพบว่า สกัดด้วยเอทานอล 3 ครั้ง ได้ปริมาณเคอร์คูมิน 4.6% สกัด 4 ครั้ง ได้ปริมาณเคอร์คูมิน 4.7% ถ้าใช้เฮกเซนสกัดก่อน 1 ครั้ง ตามด้วยเอทานอล 3 ครั้ง ได้ปริมาณเคอร์คูมิน 4.4% และถ้าใช้เครื่องสกัดแบบ Soxlet โดยใช้เฮกเซนสกัดก่อนได้ปริมาณเคอร์คูมิน 4.9% การตกผลึกเคอร์คูมินในอีเธอร์ และเฮกเซน จะได้ผลึกสีส้มของเคอร์คูมินปริมาณ 3.4% ของผงขมิ้น (พัชรินทร์, 2528) นอกจากนี้ยังมีการสกัดสี และน้ำมันจากเหง้าขมิ้นชันสด โดยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ตอนที่ 1 การสกัดน้ำมันไอการกลั่นด้วยไอน้ำ ขั้นที่ 2 นำกากที่เหลือไปอบแห้ง และสกัดต่อด้วยเฮกเซน โดยใช้วิธีการสกัดแบบ Soxlet และขั้นตอนที่ 3 นำกากขมิ้นที่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซนมาสกัดด้วยเมทานอลโดยใช้วิธีการสกัดแบบ Soxlet พบว่าน้ำมันที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 1 มีปริมาณ 0.47-0.63% มีสีเหลืองอ่อน และน้ำมันที่สกัดด้วยเฮกเซนในขั้นตอนที่ 2 มีปริมาณ 5.28 % มีสีน้ำตาลปุ่น และการสกัดสีในขั้นตอนที่ 3 โดยการสกัดด้วยเมทานอลได้ปริมาณตะกอนสีส้ม 7.60% และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้โทลูอีน :เอทธิวอะซิเตด (93:7) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ และตรวจสอบผลโดยพ่นด้วยสารละลายผสม 2 ชนิด คือ สารละลายเอทธาโนลิก ซัลฟูริกแอซิด (ethanolic sulphuric acid) 5% และสารละลายเอทธาโนลิกวานิลิน (ethanolic vanillin) 1% โดยนำน้ำมันที่สกัดได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง เทียบกับ ไทมอล พบว่าน้ำมันที่นำมาวิเคราะห์มีไทมอลเป็นองค์ประกอบ โดยไทมอลจะมีจุดสีแดง และน้ำมันที่นำมาวิเคราะห์มีค่า R_f ใกล้เคียงกับ R_f ของไทมอล และมีจุดสีแดง เมื่อนำน้ำมันที่สกัดด้วยเฮกเซนมาวิเคราะห์ด้วย TLC เทียบกับน้ำมันที่สกัดได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่า R_f จะใกล้เคียงกัน สำหรับการแยกส่วนประกอบของน้ำมันหอม

ระเหยโดยใช้โครมาโตกราฟีคอลัมน์นั้นสามารถแยกสารบริสุทธิ์ คือส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนซึ่งมีปริมาณ 18.40% ของน้ำมัน ซึ่งประกอบด้วย zingiberene เป็นองค์ประกอบหลัก และส่วนที่เป็นไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนซึ่งน่าจะเป็น aromatic turmerone (นิภา, 2536)

การศึกษาการแยกเคอร์คูมินบริสุทธิ์จากรงควัตถุในขมิ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีคอลัมน์โดยมีคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย และใช้ คลอโรฟอร์ม: เอทานอล: กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 9.4: 0.5: 0.1 เป็นสารละลายที่ใช้แยกองค์ประกอบสีจากขมิ้น ซึ่งในการทดลองนี้สามารถแยกเคอร์คูมินได้เพียงตัวเดียว ซึ่งมีปริมาณ 44% ของรงควัตถุ ส่วน demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ (วชิราภรณ์, 2538)

น้ำอ้อย (2540) ศึกษาภาวะ และตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสีย้อมธรรมชาติจากขมิ้น แก่นไม้ขนุน และดอกดาวเรืองให้ได้ความเข้มข้นของน้ำสีมากที่สุด พบว่า วัตถุดิบชนิดผงจะสกัดออกมาได้มากกว่าชนิดที่เป็นชิ้นเมื่อต้มในน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และสามารถสกัดสารสีย้อมได้เข้มข้นขึ้นเมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวสกัดรงควัตถุสีเหลืองจากขมิ้น และดอกดาวเรือง ส่วนแก่นไม้ขนุนนั้นสกัดได้ดีโดยใช้น้ำเพียงอย่างเดียว และเมื่อใช้ น้ำ : เอทานอล ในอัตราส่วน 9: 1 โดยปริมาตร พบว่าสามารถสกัดได้ผลใกล้เคียงกับการใช้เอทานอลอย่างเดียว ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรงควัตถุสีเหลืองที่สกัดได้จากวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด โดยโครมาโตกราฟีกระดาษ และโครมาโตกราฟีผิวบาง พบรงควัตถุสีเหลือง 3 ชนิด และ 6 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ในภาวะที่สารสกัดเป็นกรดมากขึ้น รงควัตถุสีเหลืองจากวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด จะมีสีซีดจางลง แต่ในภาวะที่เป็นเบสจะมีสีเข้มข้น

การที่จะสกัดสารให้สี (เคอร์คูมินอยด์) จากผงขมิ้นโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายนั้น ควรสกัดด้วยเฮกเซนก่อนที่จะสกัดผงขมิ้นด้วยเอทานอล โดยใช้อัตราส่วนผงขมิ้น 10 กรัม ต่อเฮกเซน 50 มล สกัด 3 ครั้ง (ครั้งละ 24 ชม) เพื่อกำจัดสารพวก น้ำมัน แวกซ์ ทาร์ และยาง ออกก่อน ปริมาณสารให้สีในผงขมิ้นหลังจากสกัดด้วยเฮกเซนแล้วจะมี 16.17% และหลังจากสกัดด้วยเฮกเซนแล้วนำผงขมิ้นมาสกัดด้วยเอทานอลนั้น เวลาที่เหมาะสมในการสกัด คือ 5 ชั่วโมง และการสกัดด้วยเอทานอลควรใช้การสกัดแบบไหลข้าม โดยใช้อัตราส่วนผงขมิ้น 10 กรัม ต่อเอทานอล 100 มล จะได้สารสกัดให้สี 13.78% ซึ่งคิดเป็น 85.22% ของปริมาณสารให้สีที่มีอยู่ในผงขมิ้น (ลินดา, 2540)

การวิจัยควบคุมคุณภาพของสาระสำคัญกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในวัตถุดิบขมิ้นชัน โดยสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และแยกสารสกัดด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน curcumin โดยใช้ Solvent system คือ n-hexane : chloroform : 95% ethanol = 41:49:10 พบว่า TLC chromatogram ของสารมาตรฐาน curcumin ประกอบด้วย 3 จุด ซึ่งได้แก่สาร curcumin (R_f=0.73), demethoxycurcumin (R_f=0.63) และ bisdemethoxycurcumin (R_f=0.53) ส่วนสารสกัด

จากขมิ้นชันจะประกอบด้วยสารทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว และสารกลุ่ม sesquiterpenes (R_f=0.92) เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม curcuminoid เท่ากับ 21.51% w/w โดยวิธี TLC/densitometry ส่วนการควบคุมคุณภาพของสารสำคัญในวัตถุดิบของสารประกอบกลุ่มน้ำมันหอมระเหย จะใช้วิธี Gas chromatography /Mass spectroscopy ซึ่งพบว่าประกอบด้วยสารกลุ่ม sesquiterpenes หลัก 8 ชนิดซึ่งได้แก่ L-Phellandrene, 1,8-Cineol, α-Terpinolone, Zingiberane, β-Turmerone และ α-Turmerone ซึ่งมี retention time เท่ากับ 9.21, 9.82, 10.95, 17.57, 17.74, 19.88, 19.94 และ 20.20 นาทีตามลำดับ (นพมาศ และคณะ, 2543)

2.4.5. การเปรียบเทียบสารสกัดจากต้นธรรมชาติกับต้นที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กิตติศักดิ์ (2546) ศึกษาเปรียบเทียบสารทุติยภูมิที่ได้จากต้นหนอนตายหยากจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสกัดสารทุติยภูมิจากเนื้อเยื่อ 8 ส่วน คือ ยอด และรากจากธรรมชาติ, ยอด ราก และแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารวุ้น MS และยอด ราก และแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารเหลว MS ด้วย dichloromethane และแยกสารโดยวิธี TLC ซึ่งใช้ Toluene: ethyl acetate อัตราส่วน 80:20 v/v เป็น mobile phase พบว่าเนื้อเยื่อทั้ง 8 ส่วน มีค่า R_f ที่เหมือนกัน 6 แถบ โดยสารสกัดที่ได้จากยอดในธรรมชาติให้จำนวนแถบสูงสุด 11 แถบ ถึงแม้ยอดจากธรรมชาติจะให้จำนวนแถบสูงสุดแต่การใช้สารสกัดที่ออกฤทธิ์เป็นยาฆ่าแมลงมักสกัดจากส่วนราก ซึ่งสามารถแยกสารสกัดออกมาได้ 8 แถบ โดยเหมือนกับในยอด แคลลัส และราก จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MS, แคลลัส และรากจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS อีกทั้งจากการตรวจหาสารในกลุ่ม alkaloid โดยการพ่นแผ่น TLC ด้วย Dragendorff's reagent ยังพบว่าแคลลัส และรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงทั้งในอาหารวุ้น และในอาหารเหลว MS พบแถบสีส้มเหมือนกับที่พบในรากจากธรรมชาติ จึงน่าจะสรุปได้ว่า ยังคงมีสารออกฤทธิ์อยู่ในเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ต่อไป