บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมา

ในอดีตเปล้าน้อยเป็นพืชที่ไม่มีคนรู้จักมากนัก และเป็นวัชพืชที่ชาวไร่ต่างโค่นทิ้งไม่ให้มีอยู่ในที่เพาะปลูก อย่างไรก็ตามเปล้าน้อยเป็นพืชที่รู้จักกันมานาน ในฐานะยาสมุนไพรแผนโบราณ ในตำรายาแผนโบราณของไทย มีการจำแนกการใช้ประโยชน์ของเปล้าน้อยตามส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ส่วนของต้น และ ใบ ใช้ยับยั้งอาการโรคท้องร่วง ใช้บำรุงธาตุ และยังสามารถใช้เป็นตัวยาสำหรับช่วยให้รอบเดือนเป็นปกติ ในขณะที่ส่วนของดอกใช้เป็นยาสำหรับถ่ายพยาธิ เปลือกและกระพี้ช่วยย่อยอาหาร แก้เลือดร้อน แก่นขับเลือดหนองให้ตก รากขับผายลมโดยเฉพาะรากมีรสร้อนและเมาเอียนเล็กน้อย แก้โรคน้ำเหลืองเสีย แก้โรคผิวหนังผื่นคัน แก้โรคเรื้อน มะเร็ง คุดทะราด กระจายลม ทำให้น้ำเหลืองแห้ง ใช้เป็นยารักษาและป้องกันโรคผิวหนัง (22-27) มีผู้นำใบเปล้าน้อยมาใช้เป็นส่วนประกอบยาแก้โรคกระเพาะชื่อ มหาวัทฒโนทัยมหาราช (28) และไม้จากต้นเปล้าน้อยจะนำไปทำฟืน (2, 29) นอกจากนี้ยังมีรายงานกล่าวถึง การใช้ประโยชน์ของเปล้าน้อยร่วมกับใบเปล้าใหญ่เป็นยาสมุนไพรควบคู่กันไปเรียกว่า "เปล้าทั้งสอง" มักพบอยู่ในรูปของลำต้นและกิ่งก้านตากแห้งตามร้านขายยาสมุนไพรไทยและจีนเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ เช่น ยาช่วยย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร ยาถ่ายพยาธิ ยาเร่งประจำเดือน ยารักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อ ยาขับลมในกระเพาะอาหาร และ ยากล่อมประสาท เป็นต้น (1, 30)

ในปี ค.ศ. 1978 Ogiso และคณะ (31) ทำการศึกษาสารที่สกัดได้จากใบเปล้าน้อย คือเปลาโนทอล พบว่ามีฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ได้ (32) โดยพบว่าส่วนของใบเป็นส่วนที่ให้เปลาโนทอลในปริมาณมากที่สุด (33) เปลาโนทอลมีคุณสมบัติในการรักษาแผลโรคกระเพาะอาหารและลำไส้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปราศจากอาการข้างเคียงหรือมีความเป็นพิษ เนื่องจากตัวยาเปลาโนทอลสามารถถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารได้ดี ส่วนใหญ่ถูกออกซิไดซ์ในตับและขับออกทางปัสสาวะและอุจจาระ (4, 34) เมื่อสารดังกล่าวออกฤทธิ์ จะทำให้อัตราการไหลเวียนโลหิตในเยื่อบุกระเพาะอาหารเพิ่มมากขึ้น ตลอดจนเพิ่มการสร้างเมือกและสารโพรสตาแกลนดินในกระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้เยื่อบุผนังของกระเพาะอาหารสามารถต้านทานกรดและน้ำย่อยได้ดี และช่วยลดการหลั่งของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น (35) ป้องกันการ

แตกสลายของชั้นเยื่อเมือก (mucous barrier) และมีฤทธิ์โดยตรงต่อตำแหน่งเยื่อเมือก (mucosal site) (36, 37)

ต่อมาบริษัทซังเกียวได้มีการผลิตเปลาโนทอลในระดับอุตสาหกรรม ออกวางจำหน่ายในชื่อ เคลแนค (Kelnac) ซึ่งผ่านการจดทะเบียนรับรองโดยองค์การอนามัยโรค หรือ World Health Organization (WHO) ภายใต้โค้ด CS-684 (11, 38) ตัวยาเปลาโนทอลนี้ได้จดทะเบียนเป็นยารักษาโรคกระเพาะอาหารและลำไส้ที่ผลิตได้จากสมุนไพรเป็นชนิดแรกของโลก ส่วนตัวยาชนิดอื่นที่ถูกผลิตออกมาก่อนตัวยาเปลาโนทอลคือ gefarnate, cetraxa และ sucralfate ซึ่งใช้เป็นยาแก้โรคกระเพาะเช่นเดียวกัน แต่เป็นยาประเภทสังเคราะห์ (39) จากประโยชน์ของเปลาโนทอลดังกล่าว จึงมีผู้พยายามศึกษาหาวิธีการสังเคราะห์เปลาโนทอลในทางเคมีขึ้น เพื่อทำการผลิตเปลาโนทอลแทนการสกัดจากใบเปล้าน้อย แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ ทำให้ปัจจุบันนี้การผลิตเปลาโนทอลยังคงอาศัยใบเปล้าน้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยบริษัทซังเกียวจากประเทศญี่ปุ่นได้ทำการปลูกเปล้าน้อยในพื้นที่มากกว่า 7,000 ไร่ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เพื่อนำใบเปล้าน้อยไปใช้ทำการผลิตเปลาโนทอลในระดับอุตสาหกรรม (11)

2.2 เปล้าน้อย

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (39, 40)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Croton sublyratus* Kurz.

วงศ์ Euphorbiaceae

ลำต้น : เป็นไม้พุ่มที่มีใบคล้ายเปล้าใหญ่แต่มีขนาดเล็กและก้านใบสั้นกว่า มีความสูงประมาณ 2 -3.5 เมตร ตามยอดอ่อนปกคลุมด้วยรังแคสีสนิม

ใบ : เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ใบเป็นรูปไข่หัวกลับแกมรูปหอก ปลายใบเรียวแหลมกว่า และขอบใบหยักน้อยกว่าเปล้าใหญ่ โคนใบสอบแคบ มีขนละเอียด มีขนาดความกว้าง 4– 6 เมตร ยาว 10 -15 เซนติเมตร ใบมี 8 -12 คู่ โคนใบแคบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบจักเล็กๆ ไม่สม่ำเสมอ ปลายใบแหลม หรือ ทู่ เนื้อใบค่อนข้างบาง ใบแก่เกลี้ยงหรือมีขนาดรูปดาวตามเส้นใบด้านล่าง ก้านใบยาว 6 -12 มิลลิเมตร

ดอก : ดอกมีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อเหนือรอยแผลหรือที่ยอดอ่อน มีสีขาว ก้านดอกมีขนรูปดาว ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน ลักษณะของดอกเพศผู้จะมีกลีบรองดอกได้ตั้งแต่ 4–6 กลีบ แต่ส่วนมากมี 5 กลีบ ลักษณะของกลีบรองดอกจะเป็นรูปหอกค่อนข้างกว้าง มีปลายแหลมด้านนอกมีขนสีน้ำตาลอมเหลือง กลีบดอกมีประมาณ 5 กลีบ ขอบกลีบมีขน ฐานของดอกมีขนยาว เกสรตัวผู้มีประมาณ 15-20 อัน ลักษณะดอกเพศเมียจะมีกลีบรองดอกที่มีลักษณะเหมือนดอกเพศผู้ แต่อาจมีจำนวนกลีบมากกว่า ไม่มีกลีบดอก รังไข่มีขนรูปดาวหนาแน่น ขนมีสีน้ำตาลอมเหลือง ปลายเกสรตัวเมียสั้น

ผล : ผลมีลักษณะเป็นลูกกลม ๆ โดยมี 3 ผลเล็ก ๆ อยู่รวมกัน ความยาวของผลประมาณ 3–5 มิลลิเมตร ปลายเกสรตัวเมียสั้น

เมล็ด : ขนาดเมล็ดยาวประมาณ 2–3 มิลลิเมตร มีผิวเรียบ มีลายตามยาวเป็นสีขาวปนน้ำตาล

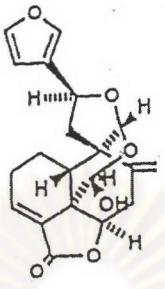
2.2.2 นิเวศวิทยา

เปล้าน้อยเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เขตศูนย์สูตร ได้แก่ อินโดนิเซีย มาเลเซีย พม่า ไทย และพื้นที่ทางตอนใต้ของประเทศจีน สำหรับในประเทศไทยสามารถพบเปล้าน้อยได้ในพื้นที่ 2 จังหวัดเท่านั้นคือ ปราจีนบุรีและประจวบคีรีขันธ์ และยังพบอีกว่าเปล้าน้อยในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีเปลาโนทอลอยู่ในปริมาณสูงกว่าเปล้าน้อยในจังหวัดปราจีนบุรี (33) พืชสกุลเปล้ามีอยู่หลายชนิด ได้แก่ เปล้าน้อย เปล้าใหญ่หรือเปล้าหลวง เปล้าเลือด เปล้าน้ำเงินหรือเปล้ากระดาษ และเปล้าใบแหลม พบกระจายทั่วไปตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยปะปนอยู่กับไม้ชนิดอื่น ๆ ในปัจจุบันพบว่ามีอยู่ประมาณ 3 ชนิดได้แก่ *Croton sublyratus*, *Croton joufa* และ *Croton kerii* การขยายพันธุ์เปล้าน้อยทำได้หลายวิธีได้แก่ การเพาะเมล็ด, การตอนกิ่ง, การทาบกิ่ง (41) และการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (42)

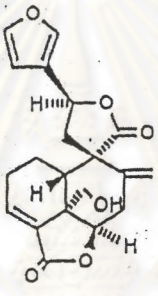
2.2.3 สารสำคัญในใบเปล้าน้อย

นอกจากการค้นพบเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อยแล้ว ยังมีรายงานการค้นพบสารประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิดดังต่อไปนี้

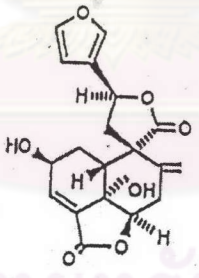
2.2.3.1 กลุ่มสาร Diterpene lactone พบ plaunol A, plaunol B, plaunol C, plaunol D และ plaunol E ดังรูปที่ 2.1–2.5 ตามลำดับ



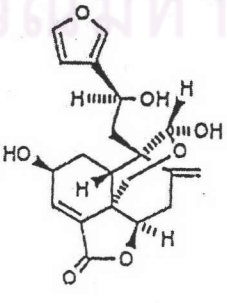
รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ plaunol A (43, 44)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ plaunol B (43, 44)

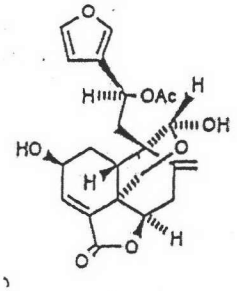


รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ plaunol C (43, 44)



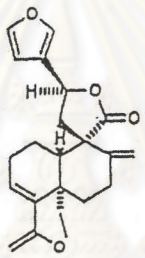
รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ plaunol D (43, 44)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

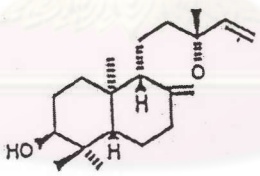


รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ plaunol E (43, 44)

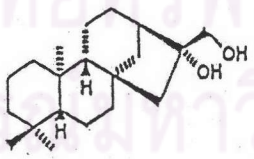
2.2.3.2 กลุ่มสาร furanoid diterpene พบ plaunolide, ent-13α- hydroxyl -13-epimanool และ ent-16β, 17-dihydroxykaurane ดังรูปที่ 2.6–2.8 ตามลำดับ



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของ plaunolide (45)

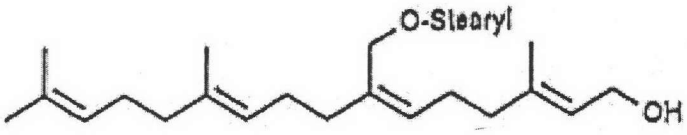


รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ ent-13α- hydroxyl -13-epimanool (46)

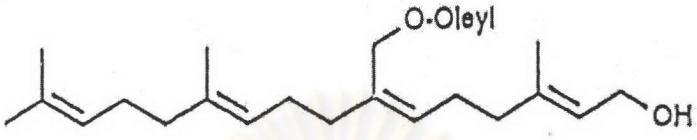


รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ ent-16β, 17-dihydroxykaurane (46)

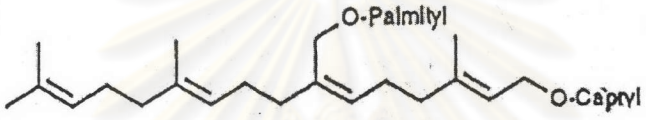
2.2.3.3 กลุ่มสาร ester of 18-hydroxygeranylgeraniol พบ stearic acid, oleic acid, caprylic acid-palmitic acid, caprylic acid-oleic acid, 2-palmitic-oleic acid และ linoeic acid-linolenic acid ดังรูปที่ 2.9–2.14 ตามลำดับ



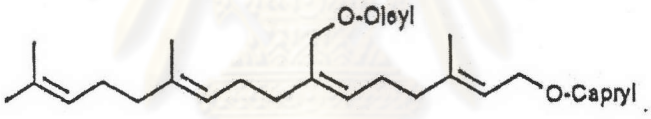
รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของ stearic acid (47)



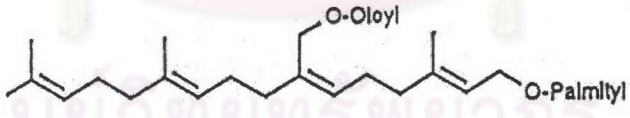
รูปที่ 2.10 โครงสร้างทางเคมีของ oleic acid (47)



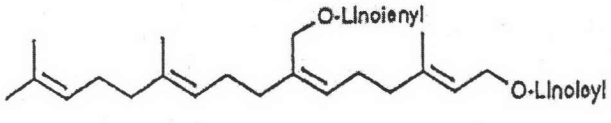
รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ caprylic acid-palmitic acid (47)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของ caprylic acid-oleic acid (47)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของ 2-palmitic-oleic acid (47)

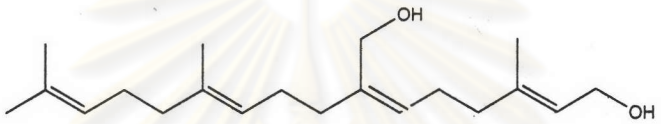


รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของ linoeic acid-linolenic acid (47)

2.3 เปลาโนทอล

2.3.1 โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมี

เปลาโนทอลเป็นสารสำคัญที่อยู่ในใบเปล้าน้อย จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่อยู่ในรูปอะไซคลิกไดเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ (acyclic diterpene alcohol) มีชื่อทางเคมีคือ (E,E,E)-7-hydroxymethyl-3,11,15-trimethyl-2,6,10,14-hexadecatetraen-1-ol (18-hydroxygeranylgeraniol) มีสูตรทางเคมีคือ $C_{20}H_{34}O_2$ และมีน้ำหนักโมเลกุลของสารเท่ากับ 306.256 (3, 45) สูตรโครงสร้าง ดังรูปที่ 2.15



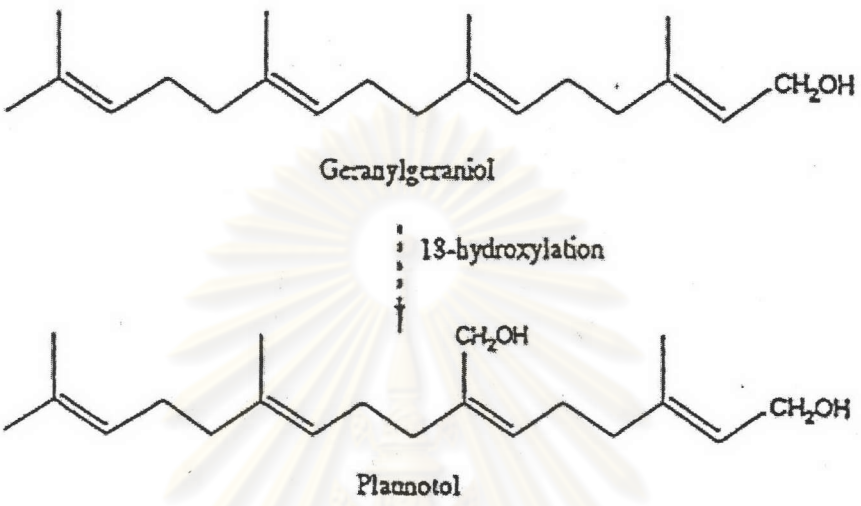
รูปที่ 2.15 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเปลาโนทอล (3)

สมบัติทางเคมีของเปลาโนทอลจากรายงานของ Department of Medicinal Information, Sankyo Co., Ltd (1993) (48) เปลาโนทอลมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น มีสีเหลืองถึงสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเฉพาะตัว รสขม นอกจากนี้สมบัติของการละลายพบว่าไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) หลายชนิด ได้แก่ เมทานอล (methanol), เอทานอล (ethanol), อะซีโตน (acetone), เอทิลอะซีเตต (ethylacetate), ไดออกเซน (dioxane), อีเธอร์ (ether), คลอโรฟอร์ม (chloroform), โทลูอีน (toluene) และน้ำมันพืช (vegetable oil) เป็นต้น

2.3.2 การสังเคราะห์เปลาโนทอลด้วยชีววิธี (Biosynthesis of plaunotol)

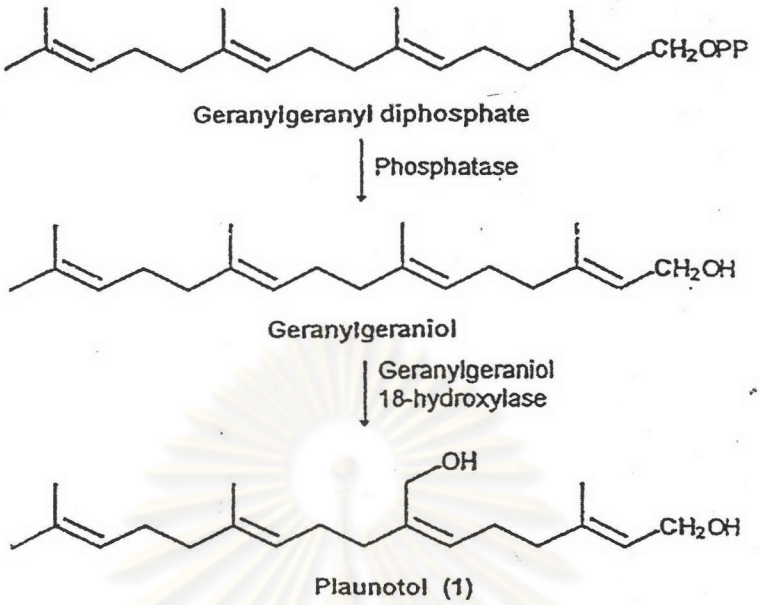
กระบวนการสังเคราะห์เปลาโนทอลในธรรมชาติเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในใบเปล้าน้อย โดยยังไม่มีรายงานใด แสดงให้เห็นถึงขั้นตอนในการสังเคราะห์เปลาโนทอลในธรรมชาติ มีเพียงรายงานที่แสดงถึงสมมติฐานของการเกิดเปลาโนทอล ได้แก่ รายงานของ KItaoka, Nagashima and Kamimura (1989) อ้างใน Tansakul and De-Eknamkul (1998) (49) ได้รายงานการค้นพบเจอรานิลเจอรานิออล (geranylgeraniol, GGOH) ซึ่งเป็นสารที่มีการสะสมในขณะทำการทดลองเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ของเปล้าน้อย สารดังกล่าวมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับรูป

อย่างง่ายของเปลาโนทอลคือ 18-hydroxygeranylgeraniol โดยเมื่อนำเจอรานิลเจอรานิออลมาผ่านกระบวนการ 18-hydroxylation จะได้ 18-hydroxygeranylgeraniol (50) ดังรูปที่ 2.16



รูปที่ 2.16 สมมติฐานการเกิดเปลาโนทอลจากเจอรานิลเจอรานิออล (49)

การศึกษาข้างต้นเป็นสมมติฐานที่อาจนำไปสู่การสังเคราะห์เปลาโนทอลด้วยกระบวนการชีวสังเคราะห์ที่อาจเป็นไปได้ เนื่องจากมีความสอดคล้องกับรายงานของ Loomis and Croteau (1981) อ้างใน Tansakul and De-Eknamkul (1998) กล่าวถึงสารที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่นำไปสู่การสร้างไดเทอร์พินอยด์ (diterpenoid) ที่มีอยู่ในธรรมชาติทุกชนิด สารตั้งต้นเหล่านั้นเป็นอนุพันธ์ของสาร GGOH เมื่อทำการศึกษาเกี่ยวกับสาร GGOH พบว่า GGOH เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นในธรรมชาติ และเป็นสารที่จะนำไปสู่วิถีทางของการเกิดเทอร์พินอยด์ (terpeniod) โดยมีเจอรานิลเจอรานิลไดฟอสเฟต (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) เป็นสารตั้งต้นของการเกิดเทอร์พินอยด์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เปลาโนทอลจะถูกสังเคราะห์จาก GGPP โดย GGPP จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัวแรกที่มาเข้าทำปฏิกิริยา โดยการดึงหมู่ฟอสเฟส (dephosphorelation) ออกเพื่อให้ได้ GGOH จากนั้นเอนไซม์ตัวที่สองจะเข้าปฏิกิริยาเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ที่ C_{18} จะได้เปลาโนทอล จากรายงานของ Tansakul and De-Eknamkul (1998) พบว่าเอนไซม์ตัวที่สองที่มีความเหมาะสมกับปฏิกิริยานี้ควรเป็นเอนไซม์ geranylgeraniol-18-hydroxylase โดยได้ทำการทดลองเพื่อแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ geranylgeraniol-18-hydroxylase มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยานี้ โดยสกัดได้จากใบเปล้าน้อย และมีผลทำให้ได้สารที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเปลาโนทอล (50) ดังรูปที่ 2.17



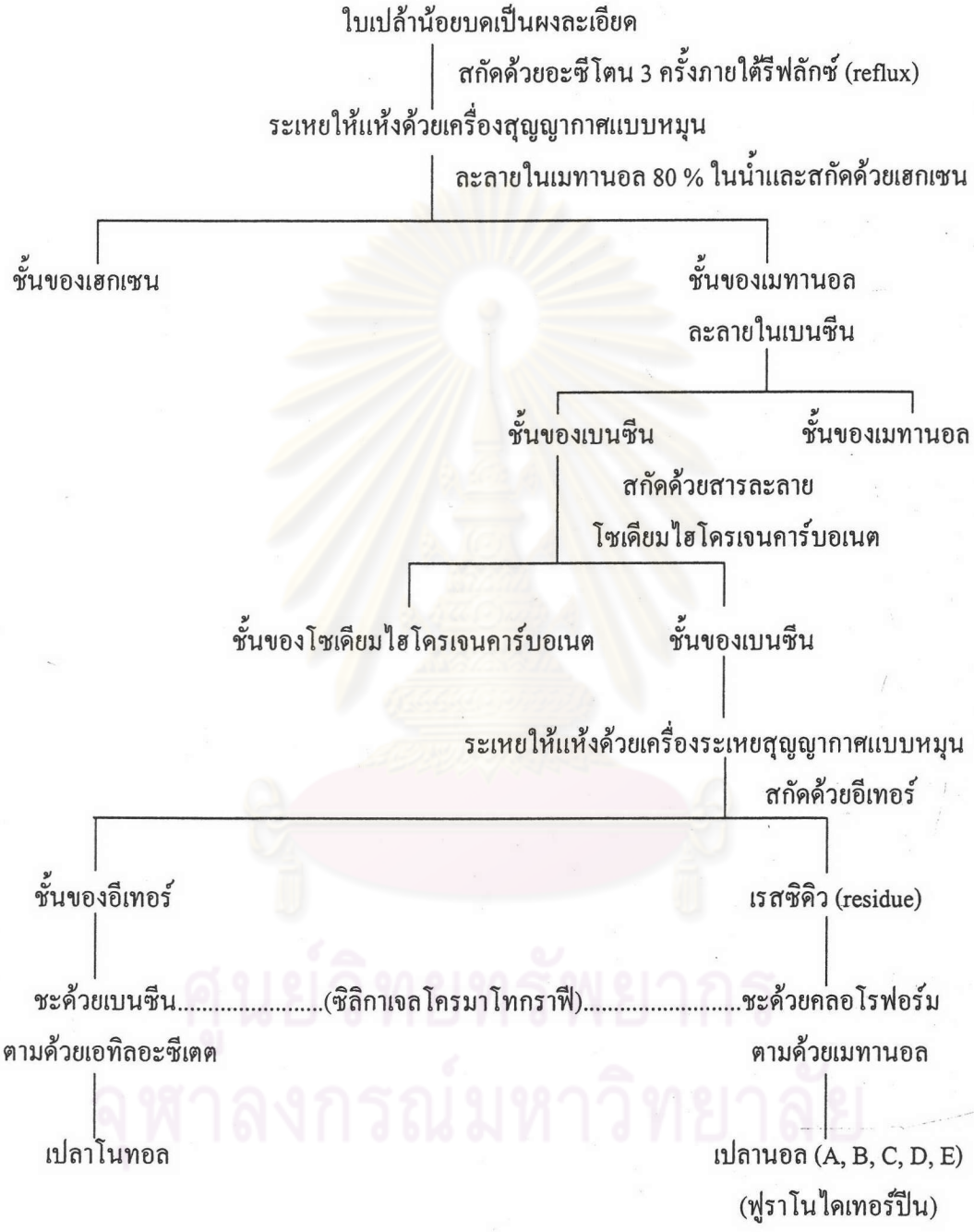
รูปที่ 2.17 กระบวนการสังเคราะห์เปลาโนทอลด้วยกระบวนการชีวสังเคราะห์ (49)

2.3.3 การสกัดเปลาโนทอลและทำให้บริสุทธิ์

เนื่องจากเปลาโนทอลมีประโยชน์ในการใช้เป็นตัวยารักษาโรคกระเพาะอาหารและมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ดังที่กล่าวไปแล้วจึงมีผู้สนใจและศึกษาวิธีหาการสกัด และการวิเคราะห์ปริมาณของเปลาโนทอล วิธีการสกัดเปลาโนทอลและทำให้บริสุทธิ์ของบริษัทซังเกียว ดังแผนภาพที่ 2.18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 2.18 ขั้นตอนการสกัดเปลาโนทอลของบริษัทซังเกียว (3)



จากแผนภาพที่ 2.18 นี้ จะเห็นได้ว่าขั้นตอนในการสกัดแยกและทำเปลาโนทอลให้มีความบริสุทธิ์มีความยุ่งยากซับซ้อนคือต้องทำการสกัดหลายครั้งด้วยตัวทำละลายต่างชนิด ก่อนที่จะทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี (3)

เนื่องจากเปลาโนทอลและฟูราโนไดเทอร์ปีน (furanoditerpene) ที่แยกได้จากสกัดตามแผนภาพที่ 2.18 เป็นสารพวกเทอร์ปีนอยด์ ซึ่งโครงสร้างของสารประเภทนี้จะมีความแตกต่างกันมาก สารกลุ่มนี้เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำและไม่มีขั้ว ดังนั้นในการสกัดจึงใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เช่น เบนซิน อีเทอร์ สกัดแยกออกมา แต่จะมีไขมัน กรดเทอร์ปีนอยด์ (terpennoid acid) และเอสเทอร์พวกขี้ผึ้งต่างๆ ปนออกมาด้วย ซึ่งสามารถกำจัดออกได้โดยปฏิกิริยา saponification กับสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างในแอลกอฮอล์แล้วสกัดต่อด้วยอีเทอร์ สารปนเปื้อนจะถูกกำจัดออกไปในชั้นน้ำ ซึ่งจะมีกรดแอลกอฮอล์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ชั้นอีเทอร์จะพบเทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ แอลกอฮอล์น้ำหนักโมเลกุลสูง และ non-terpenoid hydrocarbon (51, 52)

การทำเทอร์ปีนอยด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำให้บริสุทธิ์ขึ้นจะใช้การกลั่นด้วยไอน้ำ แล้วทำการกลั่นลำดับส่วน สารที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ซึ่งระเหยได้จะแยกโดยปฏิกิริยา saponification การทำให้บริสุทธิ์ต่อไป อาจใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี มักใช้อะลูมินาเป็นสารดูดซับ ไม่นิยมใช้ florisil เป็นสารดูดซับพวก sterols เพราะจะทำให้มีสีโดยเกิดเป็นสารประกอบ urethane รวมทั้งไม่นิยมใช้ activated alumina ดูดซับแคโรทีนอยด์ (carotenoids) เพราะจะทำให้เกิดการสลายตัวได้ นอกจากนี้สารดูดซับอื่น ๆ ที่นิยมใช้คือ แคลเซียมคาร์บอเนต, ซิลิกาเจลสำหรับเทอร์ปีนอยด์ (51, 52)

สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารประเภทเทอร์ปีนอยด์ ทำโดยใช้อินฟาเรดสเปคโตรสโคปี (IR) ซึ่งสามารถบอกได้ว่าสารประกอบเทอร์ปีนอยด์ใดเป็นอะโรมาติกหรืออะลิฟาติก สารประกอบเทอร์ปีนอยด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะวิเคราะห์ดูหมู่ฟังก์ชันมากกว่าการตรวจพิจารณาโครงสร้างทั้งหมด โครมาโทกราฟีแบบผิวบางนิยมใช้กับเทอร์ปีนอยด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ และพวกน้ำมันหอมระเหยลำดับส่วนที่ผ่านจากโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ตรวจองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยคือ แก๊สโครมาโทกราฟี และ แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography–mass spectrometry, GC–MS) (51, 52)

เทอร์ปีนอยด์ทุกชนิดมีวิธีตรวจวิเคราะห์คล้าย ๆ กัน ส่วนมากจะใช้โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performannce liquid chromatography, HPLC) , แก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่กับการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ เช่น จุดหลอมเหลว, จุดเดือด, ค่า optical rotation และการใช้ GC-MS, อินฟาเรดสเปคโตรสโคปี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (nuclear magnetic resonance, NMR) (51, 52)

จากแผนภาพที่ 2.18 จะเห็นได้ว่านอกจากเปลาโนทอลแล้วในสมุนไพรเปล้าน้อย ยังมีสารซึ่งมีฤทธิ์สมานแผลอีกคือ เปลานอล A, B, C, D และ E (43, 44) แล้วยังมีผู้รายงานการสกัดแยกเปลาโนลายด์ (plaunolide) ซึ่งเป็น furanoid diterpene เช่นเดียวกับเปลาโนทอล (45, 53) และมีผู้สกัดแยกเอสเทอร์ของ diteric acid กับ oleic acid และ diester ของ 18-hydroxygeranylgeraniol คือ caprylic acid – palmitic acid, caprylic acid – oleic acid , 2 – palmitic acid – oleic acid และ linoleic acid – linolenic acid (32)

2.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อย

Ogiso et al (1981) (54) ทำการพิสูจน์เปลาโนทอลที่สกัดได้ตามวิธีของบริษัทซังเกียว (3) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้แผ่น silica gel 60 - F254 ระบบตัวทำละลายที่ใช้ (developer) ประกอบด้วยเบนซีน:เอทิลอะซีเตต (benezene:ethlyacetate, 1:1) ตรวจสอบจุดของเปลาโนทอลเพื่อทำให้เกิดสี ด้วยการพ่นสารละลายวานิลลิน-กรดซัลฟูริก (vanilin-sulfuric acid) ในเอทานอล วิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ที่ประกอบด้วยแพคคอลัมน์ชนิด OV-225 (2 %) ใน Chromosorb G ใช้ไนโตรเจน (N_2) เป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) และดีเทคเตอร์ (detector) ชนิด FID ตรวจสอบ

Sununta Cajesanun (1991) (55) ทำการพิสูจน์เปลาโนทอลที่สกัดได้ ตามวิธีของบริษัทซังเกียว (3) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้แผ่น silica gel 60 - F254 (54) ระบบตัวทำละลายที่ใช้ประกอบด้วย ether 20% ใน คลอโรฟอร์ม ตรวจสอบจุดของเปลาโนทอลเพื่อทำให้เกิดสีด้วยการพ่นสารละลายวานิลลิน-กรดซัลฟูริกในเอทานอล วิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอล โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่ประกอบด้วยแพคคอลัมน์ ชนิด OV-17 uniport HP ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพา และดีเทคเตอร์ชนิด FID ตรวจสอบ

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานใดที่กล่าวถึงวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลในเลือดทั้งที่อยู่ในรูปของพลาสมาและซีรัม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลในพลาสมาและซีรัมให้เหมาะสม ซึ่งควรเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และให้ผลของการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เพื่อศึกษาถึงการเอื้อประโยชน์สมมูลย์ และใช้เป็นวิธีมาตรฐานของการวิเคราะห์เปลาโนทอลในเลือดต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสมา

การวิเคราะห์ปริมาณยาหรือสารใด ๆ ก็ตามในพลาสมาซึ่งเป็นเมทริกซ์ (matrix) ที่ซับซ้อน นั้นจำเป็นที่จะต้องทราบถึงองค์ประกอบที่มีอยู่ในพลาสมานั้นก่อน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วพลาสมาจะประกอบไปด้วยน้ำประมาณ 90 % ส่วนที่เหลืออีก 10 % ประกอบไปด้วยสารต่าง ๆ มากมายละลายอยู่ (56) สารที่มีปริมาณมากที่สุดคือโปรตีนซึ่งเป็นสารมหโมเลกุล (macromolecule) โดยมีมากถึง 7 % ของพลาสมา ดังนั้นในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา ถ้าสามารถแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาได้ ก็น่าจะเป็นการกำจัดสิ่งรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ออกไปได้

ขั้นตอนสำคัญของการกำจัดสิ่งรบกวน (interference compounds) และสารธรรมชาติ (endogenous substances) ในพลาสมาต้องมีการเตรียมตัวอย่างพลาสมาให้สะอาดมากพอที่จะทำการวิเคราะห์ ปราศจากสิ่งรบกวนต่างๆ โดยเฉพาะโปรตีนและสารอื่น ๆ ที่อาจไปมีผลรบกวนต่อการตรวจวัดปริมาณยาที่ต้องการได้ ทั้งนี้ควรให้ผลของการวิเคราะห์ที่ดีและมีประสิทธิภาพ มีความรวดเร็ว ถูกต้อง (57) ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีการ (21, 58, 59, 60) แต่อาศัยหลักการใหญ่ๆ เพียง 2 หลักการคือการใช้สารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา และการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมมาสกัดแยกตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมา ซึ่งทั้งสารที่ใช้สำหรับตกตะกอนพลาสมาโปรตีน และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดนั้น จะทำให้พลาสมาโปรตีนตกตะกอนและแยกออกจากส่วนที่เป็นน้ำในพลาสมาตัวอย่าง ทำให้พลาสมาตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นตะกอนนอนก้นของพลาสมาโปรตีน และส่วนที่เป็นน้ำซึ่งมีความใส นำส่วนที่เป็นน้ำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น แก๊สโครมาโทกราฟี หรือ ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ต่อไปได้ทันที

2.4.1 การวิเคราะห์ยาโดยใช้สารแยกตะกอนพลาสมาโปรตีน

การใช้สารแยกตะกอนพลาสมาโปรตีนนั้นค่อนข้างจะเป็นวิธีที่สะดวก ง่าย ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายมากกว่าหลักการสกัด ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากแต่ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดี สารแยกพลาสมาโปรตีนบางชนิด ยังสามารถแยกสารอื่น ๆ ในพลาสมาได้ทำให้ตัวอย่างพลาสมาสะอาดมากยิ่งขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาให้มีความถูกต้องมากขึ้น การใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนเพื่อเตรียมตัวอย่างพลาสมาให้สะอาดนั้นมีสิ่งที่ควรคำนึงถึงคือ การจับของยากับพลาสมาโปรตีน เนื่องจากตามธรรมชาติยาจะอยู่ในภาวะสมดุลกับ

พลาสมาโปรตีนในร่างกาย (61) ในระดับของการใช้ยาขนาดหนึ่งอัตราการจับของยากับพลาสมาโปรตีนค่อนข้างคงที่ ยาแต่ละชนิดมีความสามารถในการจับ (binding) กับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 3 ระดับคือ (20)

1. จับอย่างหลวม (weakly bound) จับกับพลาสมาโปรตีน น้อยกว่า 50 %
2. จับปานกลาง (moderately bound) จับกับพลาสมาโปรตีนได้ 50 – 80 %
3. จับอย่างเหนียวแน่น (highly bound) จับกับพลาสมาโปรตีนได้ 80 – 100 %

สารที่มีคุณสมบัติในการแยกพลาสมาโปรตีน มีหลายประเภท แบ่งตามกลุ่มสารได้แก่ (59, 62, 63)

1. กรด เช่น กรดเปอร์คลอริก, กรดทังสติก, กรดเมตาฟอสฟอริกและกรดไตรคลอโรอะซิติกจะจับกับไอออนบวกของโปรตีน เกิดเกลือที่ไม่ละลายในน้ำ แยกตัวออกจากตัวอย่างพลาสมา

2. เกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมคาร์บอเนต ทำให้โปรตีนเกิด salting out แยกออกจากตัวอย่างพลาสมา

3. ไอออนของโลหะ เช่น สังกะสี (Zn^{2+}), ทองแดง (Cu^{2+}) และเหล็ก (Fe^{2+}) จะจับกับไอออนลบของโปรตีนเกิดเกลือที่ไม่ละลายน้ำแยกออกจากตัวอย่างพลาสมา

4. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถรวมกับน้ำได้ เช่น อะซีโตน, แอซีโตรไนไตรล์, เมทานอล และเอทานอล ทำให้เกิดการละลายของโปรตีนในพลาสมาลดลง โปรตีนจึงตกตะกอนออกจากตัวอย่างพลาสมา

Bye และ Brewn (1977) (63) และ Smith และ Steward (1981) (21) กล่าวถึงการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณยาว่า ยาบางส่วนอาจตกตะกอนร่วมไปกับโปรตีน ส่วน Lim (1989) (57) กล่าวถึงปัญหาสำคัญสำหรับการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน ทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณยาไม่ถูกต้อง แม่นยำเท่าที่ควร

Burke และ Thenot (1985) (64) กล่าวถึงการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ยากันโรคลมบ้าหมู (antiepileptic drugs) ว่าค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของยาที่มีการจับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่นจะมีค่าต่ำเนื่องจากการตกตะกอนร่วมไปกับโปรตีน รายงานอื่น ๆ เช่น การควบคุมระดับยาปฏิชีวนะในเลือด (65) การวิเคราะห์หาปริมาณไพรมาควิน (primaquin) ในพลาสมา (66) การวิเคราะห์หาปริมาณเมโททรีเซตในพลาสมา (67-69), การวิเคราะห์หาปริมาณแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquinone glycoside) ในพลาสมา (70) และการวิเคราะห์หา

ปริมาณยาเซฟเมนอกไซม (cefmenoxime) ในพลาสมา (71) ก็ได้กล่าวถึงการตกตะกอนของยาร่วมไปกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น แต่ไม่มีการกล่าวรายละเอียดผลการทดลองหรือรายงานเพิ่มเติมแต่อย่างใด

อย่างไรก็ดีจากการศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา โดยอาศัยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา ที่ปรากฏในวารสารต่าง ๆ พบว่ายังมีความคลุมเครือในด้านการรายงานผลการวิเคราะห์ซึ่งไม่ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (validation method) ที่ใช้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะกับยากลุ่มที่จับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณโพรพาโนลอลไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา (72,73) ไม่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของยา รายงานความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ไม่แสดงค่าเฉลี่ยแต่ละอัน เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิวบิวทาโซน (phenylbutazone) (74) ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างพลาสมาให้สะอาดโดยใช้สารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนนั้น ต้องคำนึงถึงความสามารถในการจับของยากับพลาสมาโปรตีนตลอดจนการเลือกใช้ชนิดของสารตกตะกอนที่เหมาะสม และอาศัยข้อมูลอื่น ๆ ที่ให้ผลของการวิเคราะห์ที่ดี มีประสิทธิภาพ ซึ่งในปัจจุบันข้อมูลดังกล่าวมีรายงานการวิจัยอยู่น้อย

2.4.2 การวิเคราะห์ยาโดยใช้ตัวทำละลายกัดตัวยาจากพลาสมา

การใช้สารหรือตัวทำละลายที่เหมาะสมมาสกัดแยกตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมา วิธีที่ใช้หลักการนี้ได้แก่ Liquid-liquid phase extraction (LLE) ในอดีตการใช้สารหรือตัวทำละลายที่เหมาะสมมาสกัดแยกตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมานั้นจะใช้วิธี LLE ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมานาน ตัวทำละลายที่ใช้มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ (water immicible organic solvent) ยาสามารถละลายได้ดีมากเมื่อเทียบกับสารต่าง ๆ ที่อยู่ในพลาสมา และมีจุดเดือดไม่สูงมากเพื่อให้ระเหยง่าย แต่ปัญหาที่สำคัญสำหรับเทคนิค LLE นี้คือการเกิดอิมัลชันระหว่างการสกัด ซึ่งเมื่อเกิดแล้วแก้ไขได้ยาก ตัวยาบางส่วนจะเข้าไปรวมอยู่ในอิมัลชัน ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของยาต่ำ (59) นอกจากนี้ยังต้องทำการสกัดหลาย ๆ ครั้ง ทำให้เสียเวลาต้องใช้ตัวทำละลายมาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และยังอาจเป็นพิษต่อผู้ใช้เพราะตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพิษมีอันตรายต่อสุขภาพ บางอย่างติดไฟและระเบิดได้ง่าย จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวัง

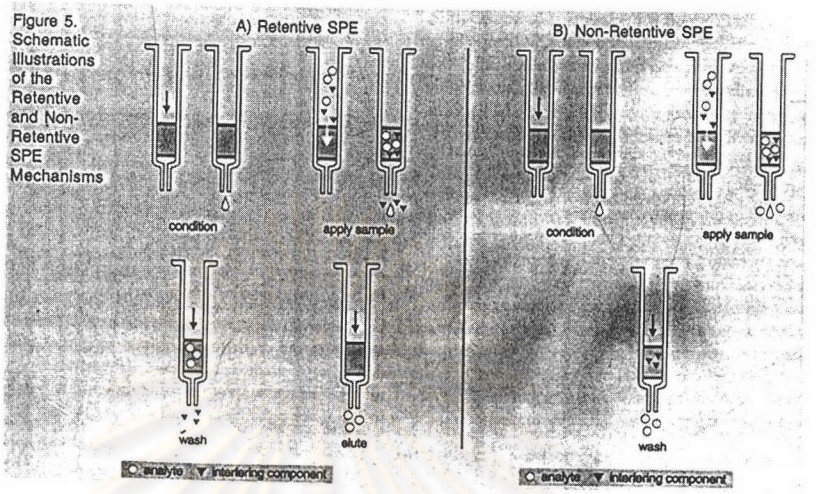
2.4.3 การวิเคราะห์ยาโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง

จนกระทั่งราวทศวรรษที่ 1970 ได้แก้ปัญหาที่เกิดจากการสกัดด้วยเทคนิค LLE โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่สำหรับการเตรียมสารเพื่อทำการสกัดแยกสารที่ต้องการออกจากเมทริกซ์ที่ซับซ้อน (complex matrices) เช่น น้ำหมัก (broth) ที่ได้จากกระบวนการหมัก (fermentation process), ตัวอย่างเลือดในรูปของพลาสมาหรือซีรัม, ตัวอย่างน้ำหรือดินจากภาวะแวดล้อมต่าง ๆ (environmental condition), ผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เครื่องดื่ม (beverages) น้ำนมและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนม (milk and dairy products) ตลอดจน การสกัดสารพันธุกรรม (genetic material) ในรูปของ synthetic oligonucleotides เพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) เป็นต้น (75)

หลักการของเทคนิคนี้อาศัยกลไกการแยกสาร เช่นเดียวกับลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) โดยการนำตัวอย่างเลือดที่อยู่ในรูปของซีรัมหรือพลาสมา นำมาผ่านลงไปในคอลัมน์ที่บรรจุของแข็งหรือตัวดูดซับ (adsorbent) ตามชนิดและขนาดของรูพรุน ให้เหมาะสมกับชนิดของสารหรือยาที่ต้องการจะแยก (analytes) จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวชะ (eluant) ดึงยาออกจากตัวดูดซับนั้น ตัวดูดซับซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) จะสกัดยาออกจากตัวอย่างพลาสมาได้ โดยการใช้ตัวชะที่เหมาะสมซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ให้เกิดการหลุดจับกัน (desorption) ระหว่างยากับหมู่ทางเคมีที่อยู่บนผิวหน้าของอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารหรือยาจึงผ่านออกไปจากคอลัมน์ได้ (75)

ทั้งนี้สารประกอบแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ผ่านไปตามคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยกสารประกอบหรือยาที่ต้องการออกจากสารรบกวนอื่น ๆ ได้ โดยยาจะยังคงถูกดูดซับและค้าง (retention) อยู่บนผิวหน้าของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ ในขณะที่สารรบกวนอื่น ๆ จะผ่านออกมาจากคอลัมน์ก่อน หลังจากนั้นจึงใช้ตัวชะซึ่งมีความแรง (solvent strength) ที่เหมาะสม มาชะสารหรือยาที่ต้องการออกภายหลัง เรียกการสกัดในลักษณะนี้ว่า "retentive solid phase extraction" แต่ถ้าทำการสกัดในลักษณะที่ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมดึงยาออกจากตัวดูดซับให้ผ่านออกมาจากคอลัมน์โดยตรงเลย ในขณะที่สารรบกวนอื่น ๆ ยังคงดูดซับและค้างอยู่ที่ผิวหน้าของตัวดูดซับ เรียกการสกัดในลักษณะนี้ว่า "non-retentive solid phase extraction" ดังรูปที่ 2.19 (76) การสกัดด้วยวิธีนี้ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดี จึงมีการพัฒนาให้ง่ายและสะดวกต่อการใช้ โดยทำเป็นคอลัมน์สำเร็จรูปขนาดเล็ก ภายในบรรจุ solid supports ซึ่งเป็น bonded phase silica เลียนแบบโคร

มาโทกราฟีคอลัมน์ เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด และทำให้สารที่ต้องการจะแยกมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย (76)



รูปที่ 2.19 การสกัดสารด้วยเทคนิค LSE ในลักษณะ retentive และ non-retentive (76)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าสารประกอบแต่ละชนิดที่อยู่ในพลาสมาหรือเมทริกซ์นั้น จะเคลื่อนที่ผ่านไปตามคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน โดยอัตราเร็วของการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพ (affinity) ของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ เช่น สารประกอบ A มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ เมื่อสารดังกล่าวเคลื่อนที่ผ่านไปตามคอลัมน์ ดังสมการ (75)

$$A_m \underset{}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} A_s$$

เมื่อ A_m คือ สารประกอบ A ในเฟสเคลื่อนที่

A_s คือ สารประกอบ A ในเฟสที่อยู่กับที่

ค่า distribution coefficient สำหรับสารประกอบที่สอดคล้องกับสมการข้างบนคือ

$$K = [A]_s / [A]_m = \text{คงที่}$$

เมื่อ K คือ distribution constant ของสาร A

$[A]_s$ คือ ความเข้มข้นของสาร A ในเฟสที่อยู่กับที่

$[A]_m$ คือ ความเข้มข้นของสาร A ในเฟสเคลื่อนที่

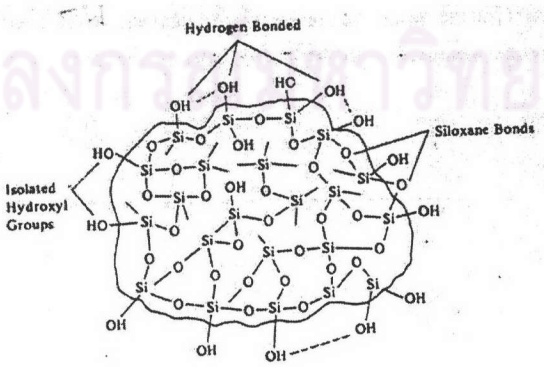
ถ้าค่า K มีค่ามาก แสดงว่าสารประกอบชอบที่จะละลายในเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้น สารประกอบดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้า แต่ถ้าค่า K มีค่าน้อย สารประกอบนี้ก็จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสเคลื่อนที่และจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้อย่าง

รวดเร็ว ซึ่งการแยกโดยใช้เทคนิคนี้มี ตัวแปรที่สำคัญที่มีผลต่อการแยกคือ retention factor และ separation factor (selectivity) (77)

retention factor (k) เป็นการวัดจำนวนโมเลกุลของตัวอย่างใน stationary phase และ mobile phase ภายใต้เงื่อนไขที่สมดุล โดยเทียบกับ unretain component (V_0) เมื่อ V_0 คือ column void volumn เป็นปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์หลังจากหักปริมาตรของอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ออกแล้ว ซึ่งหมายถึงปริมาตรรอบ ๆ อนุภาค รวมกับปริมาตรของรูพรุนที่อยู่ในอนุภาคด้วย ซึ่งตัวอย่างที่หลุดออกมาจาก void volume นี้จะไม่เกาะกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์เลย ตัวอย่างที่มีค่า k ต่ำ หมายถึงสารประกอบนั้นเกาะกับคอลัมน์ได้น้อยมาก และถูกชะออกมาพร้อมกับตัวชะทำให้แยกได้ไม่ดี แต่ถ้าค่า k สูงการแยกจะดีขึ้น แต่ใช้เวลานานกว่า (77)

separation factor เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของตัวดูดซับในการแยกสารหรือยาที่ต้องการออกจากสารรบกวนอื่นๆ ซึ่งละลายอยู่ในเมทริกซ์ตัวอย่าง ค่านี้พิจารณาได้จากปัจจัย 3 ประการได้แก่ โครงสร้างทางเคมีของยาที่ต้องการสกัด, คุณสมบัติและชนิดของตัวดูดซับ และองค์ประกอบทั้งหมดที่มีอยู่ในเมทริกซ์ตัวอย่าง ค่านี้จะมีค่ามากที่สุด (maximum selectivity) เมื่อสารหรือยาที่ต้องการจะแยก ถูกดูดซับอยู่บนผิวหน้าของตัวดูดซับได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น ในขณะที่สารรบกวนอื่น ๆ ไม่สามารถถูกดูดซับได้โดยตัวดูดซับเลย (77)

โดยทั่วไปวัสดุที่นำมาใช้สำหรับบรรจุในคอลัมน์เพื่อสกัดสารด้วยเทคนิคนี้ จะต้องเป็นของแข็งที่มีรูพรุนและมีพื้นที่ผิวมาก เช่น ผงซิลิกา (silica gel , SiO_2), อะลูมินา (alumina , Al_2O_3) หรือถ่าน (activated charcoal) ทั้งผงซิลิกาและอะลูมินาจัดเป็นวัสดุพื้นฐานสำหรับพวก bonded phase แต่ที่นิยมใช้มากคือผงซิลิกาซึ่งมีลักษณะโครงสร้าง ดังรูปที่ 2.20 (75)

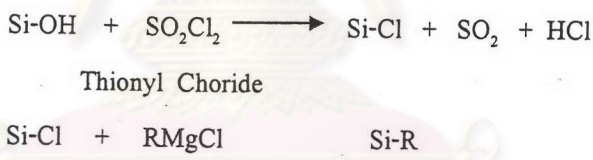


รูปที่ 2.20 โครงสร้างของผงซิลิกาซึ่งแสดงให้เห็นพันธะต่างๆ และหมู่ซิลานอล (75)

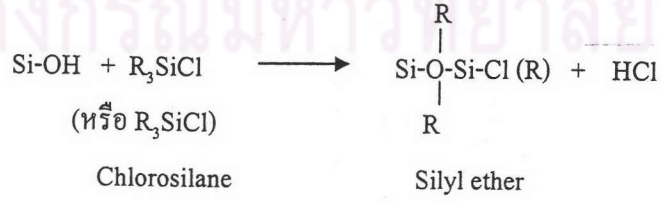
ผงซิลิกานี้จะมีหมู่ทางเคมีที่ยึดติดกับหมู่ซิลานอล (silanol, Si-OH) บนผิวหน้าของผงซิลิกา หมู่เคมีดังกล่าวจะมีสภาพความเป็นขั้วที่หลากหลาย ตามชนิดของหมู่เคมีที่เข้าไปเกาะ (attached) กับหมู่ซิลานอล ดังนั้นคุณสมบัติของผงซิลิกาที่ใช้เป็นตัวดูดซับนี้จึงขึ้นอยู่กับหมู่ทางเคมีที่เข้าไปเกาะอยู่กับหมู่ซิลานอล ที่อยู่บนผิวของผงซิลิกา ส่วนที่ไม่มีขั้วที่อยู่ในโมเลกุลนั้นจะมีอิทธิพลน้อยมาก หมู่ซิลานอลมีคุณสมบัติเป็นกรดเล็กน้อย และมีบทบาทที่สำคัญมากในการแยกสาร การทำปฏิกิริยาเคมีระหว่าง หมู่ซิลานอลที่อยู่บนผิวหน้าของตัวดูดซับให้เกิดการเชื่อมจับกับหมู่เคมีต่าง ๆ นั้นมีอยู่ 3 วิธี ซึ่งทุกวิธีจะเกิดปฏิกิริยาที่หมู่ซิลานอลบนพื้นผิวของผงซิลิกา ดังต่อไปนี้

1. เป็น bonded phase ชนิดแรกแต่ไม่ค่อยดีนักเพราะ ether bond (esterlike linkage) Si-O-R ที่เกิดขึ้น สามารถ hydrolyse ได้ง่ายใน aqueous acidic condition

2. เป็นวิธีที่สะดวกเพราะ organic group จะ bond กับ silica โดยใช้ Si-C bond ซึ่ง silica choloride จะทำปฏิกิริยากับ Grignard หรือ organolithium reagents เกิดเป็น Si-C bond ที่คงทนต่อการแตกตัว

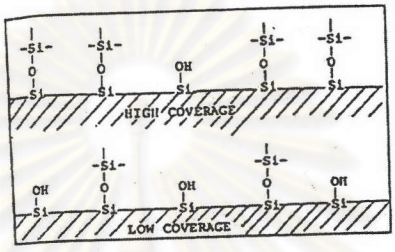


3. Silylation หรือ silanisation เป็นวิธีที่ใช้กันมากในปัจจุบัน โดยใช้สารประกอบพวก monofuntional reagents หรือ trifunctional reagents ทำปฏิกิริยากับหมู่ซิลานอลที่มีอยู่มากมายบนผิวของผงซิลิกาเกิดเป็นพันธะ siloxane (Si-O-Si-C) แต่นิยมใช้ trifunctional reagents เนื่องจากพันธะ siloxane ที่ได้จะมีความเสถียรและคงทนมากกว่า (75)

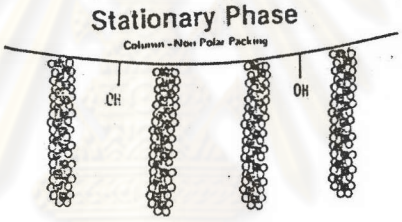


วิธีนี้สิ่งที่สำคัญคือเปอร์เซ็นต์การคลอบคลุม (coverage) ของพื้นที่ผิว ซึ่งหมายถึงจำนวนหมู่ซิลานอลที่ทำปฏิกิริยากับ organoalkoxysilanes ดังรูปที่ 2.21

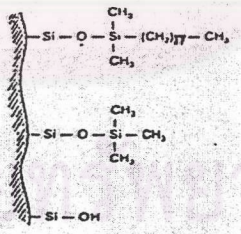
ในทางปฏิบัติจะได้ค่าการคลอบคลุมนี้ประมาณ 45 % เท่านั้น แต่ถ้าค่าเปอร์เซ็นต์นั้นสูงขึ้น ค่า retention factor และ separation factor ก็จะสูงตามด้วยหมู่ซิลานอลที่เหลือเนื่องจากทำปฏิกิริยาไม่หมดจะเรียกว่า uncapped column ดังรูปที่ 2.22 ซึ่งมักจะเกิด adsorption effect ได้กับสารประกอบที่มีขั้วมากหรือเป็นด่าง แต่ถ้าถูก hydrolyse และทำปฏิกิริยากับ TMSCl (trimethyl silyl chloride) แล้วจะเกิดเป็น TMS ethers ขึ้น ดังรูปที่ 2.23 จะเรียกว่า end-capped column ดังรูปที่ 2.24 (75)



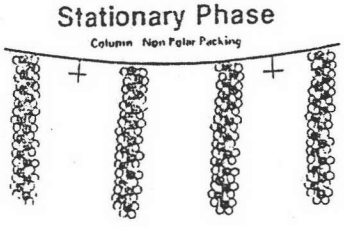
รูปที่ 2.21 การคลอบคลุม (surface coverage) (75)



รูปที่ 2.22 เฟสที่อยู่กับที่ในลักษณะ uncapped column (75)



รูปที่ 2.23 TMSCl ที่เกิดพันธะเคมีกับพื้นผิวของผงซิลิกา (75)



รูปที่ 2.24 เฟสที่อยู่กับที่ในลักษณะ end-capped column (75)

พันธะ siloxane ที่ได้นี้จะเสถียรทุกภาวะที่ใช้ในการสกัด แต่ไม่เหมาะเมื่อใช้ pH ที่ต่ำกว่า 2 และที่ pH สูงกว่า 7.5 การเตรียม siloxane จากภาวะที่ปราศจากน้ำ (anhydrous condition) จะได้ homogeneous phase หรือ heterogeneous phase แล้วแต่ภาวะของการควบคุมเพื่อให้ได้ phase ชนิดนั้น ๆ แต่โดยทั่วไป homogeneous phase จะให้ประสิทธิภาพในการแยกและค่าเปอร์เซ็นของการคืนกลับของสารที่สูงกว่า heterogeneous phase เนื่องจากสมดุลระหว่างตัวถูกละลายและเฟสคงที่ของนั้น homogeneous phase จะเกิดได้เร็วกว่า (75)

หมู่เคมีที่เกาะอยู่กับหมู่ซิลานอลบนผิวของตัวดูดซับจะเกิดอันตรกิริยากับสารที่ต้องการจะแยกด้วยแรงหลายประเภทด้วย เช่นเกิดการกระจายเป็นแบบแรงแวนเดอร์วาล อันตรกิริยาเกี่ยวกับคู่ขั้วถาวร (permanent dipole) หรืออันตรกิริยาเกี่ยวกับการให้และรับอิเล็กตรอน (electron donor-acceptor interaction) การหน่วงเหนี่ยวสารที่ต้องการจะแยกให้เคลื่อนที่ช้าลงโดยผงซิลิกาหรืออะลูมินานั้น ส่วนใหญ่แล้วจะเกิดจากอันตรกิริยากับหมู่ฟังก์ชันนัลที่มีขั้วของสารที่ต้องการจะแยก ดังนั้น สารประกอบที่มีสมบัติทางเคมีต่างกัน เช่น สารไฮโดรคาร์บอนและแอลกอฮอล์จะถูกแยกออกจากกันได้ง่ายมากด้วยเทคนิคนี้ พวกที่เกิดอันตรกิริยาเล็กน้อยก็จะทำให้แยกได้ยาก (75)

อันที่จริงอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นใน SPE จะเกี่ยวข้องกับการแข่งขัน (competition) ระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับโมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่เพื่อเข้าเกาะกับตำแหน่งดูดซับ ถ้าเป็นการดูดซับเฟสเคลื่อนที่ที่ดีกว่าจะมีผลทำให้การดูดซับของตัวถูกละลายลดลง ตัวทำละลายจะแบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ เพื่อสอดคล้องกับความสามารถในการดูดซับของมัน ในการแบ่งนี้จะพิจารณา elutropic series ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งเป็น elutropic series สำหรับดูดซับอะลูมินา แต่การจัดแบ่งนี้สามารถนำไปใช้กับตัวดูดซับที่มีขั้วตัวอื่น ๆ เช่น ผงซิลิกาได้เช่นเดียวกัน (77)

Elutropic series สามารถนำไปใช้กับตัวชะซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความแรง (strength) ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสารที่ต้องการจะแยกแต่ละชนิดในการทำ isocratic elution กล่าวคือถ้าตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มีความแรงสูงเกินไป ทำให้ค่า k สำหรับตัวถูกละลายจะมีค่าน้อย ดังนั้นตัวทำละลายที่มีความแรงน้อยกว่าจะถูกนำมาใช้แทน ในทำนองเดียวกัน ถ้าตัวทำละลายเริ่มแรกในเฟสเคลื่อนที่มีความแรงน้อย ทำให้ค่า k สำหรับตัวถูกละลายจะมีค่ามาก ดังนั้นตัวทำละลายที่มีความแรงสูงจะถูกนำมาใช้แทน การทดลองในลักษณะนี้ก็เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสารที่ต้องการจะแยก ในสารละลายผสมหรือเมทริกซ์ตัวอย่าง ในบางกรณีการใช้ตัวทำละลายเพียงตัวเดียวเป็นเฟสเคลื่อนที่อาจไม่เหมาะสม ในการแยกสารทั้งนี้เนื่องจากค่าพารามิเตอร์

ความแรงของตัวทำละลาย (solvent strength parameter) ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดหรือมากกว่านั้นผสมกันเป็นเฟสเคลื่อนที่ เพื่อปรับให้ได้ค่า solvent strength parameter ที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารชนิดนั้น ๆ ตลอดจนการเพิ่มค่า retention factor และ separation factor อย่างไรก็ตาม ต้องคำนึงถึงการเกิดอันตรกิริยาชนิดต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจน สภาพความเป็นกรด-เบส และอื่น ๆ ซึ่งล้วนส่งผลต่อการเปลี่ยนค่า retention factor และ separation factor ด้วย (77)

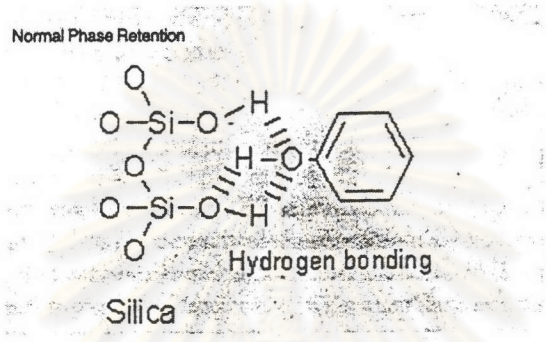
ตารางที่ 2.1 Elutropic series สำหรับอะลูมินา (77)

ตัวทำละลาย	Solvent-Strength Parameter (ϵ°)
n-Pentane	0.00
Isooctane	0.01
Cyclohexane	0.04
Carbon tetrachloride	0.18
Xylene	0.26
Toluene	0.29
Benzene	0.32
Ethyl ether	0.38
Chloroform	0.40
Methylene chloride	0.42
Tetrahydrofuran	0.45
Acetone	0.56
Methyl acetate	0.60
Aniline	0.62
Acetonitrile	0.65
i-Propanol, n-propanol	0.82
Ethanol	0.88
Methanol	0.95
Ethylene glycol	1.11
Acetic acid	มาก

สำหรับตัวดูดซับที่ทำจากผงซิลิกา (bonded phase silica) แบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามสภาพความเป็นขั้วของเฟสเคลื่อนที่และเฟสที่อยู่กับที่ ดังนี้

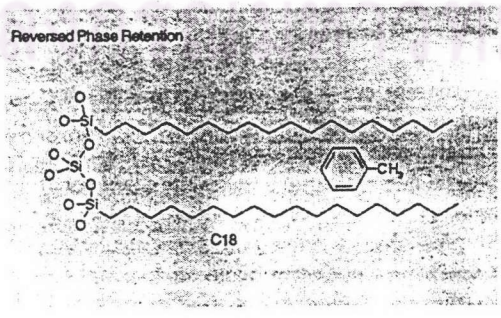
1. Normal phase chromatography ใช้เมื่อเฟสที่อยู่กับที่มีสภาพมีขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารที่มีความเป็นขั้วมากจะออกจากคอลัมน์ได้ช้า ตัวอย่าง bonded phase ที่เป็น normal phase เช่น อะมิโน ($-NH_2$), ไซยาโนหรือไนโตร (-CN) และไดออล เป็นต้น ส่วนตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ได้แก่ เฮกเซน, เมทิลีนคลอไรด์ (methylene chloride) และเตตราไฮโดรฟูแรน

(tetrahydrofuran, THF) นอกจากนี้ถ้าสารที่วิเคราะห์มีแนวโน้มที่จะแตกตัวเป็นอิออน (ionize) เมื่อใช้ normal phase chromatography เช่น อะมิโน ควรแก้ไขโดยการเติมกรดอะซิติกลงไปในเฟสเคลื่อนที่เพื่อยับยั้งการแตกตัว นอกจากนี้เมื่อใช้ packing ที่มี fuctional group เป็น $-NH_2$ และ –CN อาจเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลุ่มสารเหล่านี้กับสารที่วิเคราะห์ได้ ทำให้คอลัมน์เปลี่ยนแปลงไปอย่างถาวร กลไกการแยกสาร ดังรูปที่ 2.25 (76)



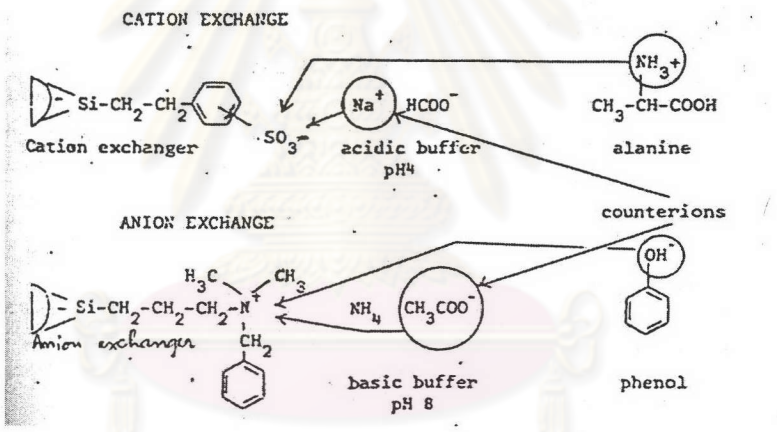
รูปที่ 2.25 กลไกการแยกสารเมื่อใช้ normal phase เป็นเฟสที่อยู่กับที่ (76)

2. Reverse phase chromatography จะใช้เมื่อเฟสที่อยู่กับที่เป็นพวกที่ไม่มีขั้ว เช่น octadecyl silane และเฟสเคลื่อนที่เป็นพวกมีขั้วเช่น น้ำ เมทานอล แอซิโตรไนไตรล์ เป็นต้น ลำดับของการชะล้างตัวถูกละลายมีลักษณะตรงกันข้ามกับที่เกิดขึ้นใน normal-phase BPC ดังนั้น สารประกอบที่มีขั้วจะถูกชะล้างออกมาก่อน เนื่องจากมันชอบที่จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ ส่วนสารประกอบที่ไม่มีขั้วจะถูกยึด (retentive) อยู่ในคอลัมน์ทำให้ถูกชะล้างออกมาทีหลัง เทคนิคนี้จะเหมาะสมอย่างมากกับสารประกอบที่ไม่ละลายหรือละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆที่ละลายน้ำในน้ำได้ดี เนื่องจากสารประกอบอินทรีย์เป็นจำนวนมากมีพฤติกรรมของการละลายในลักษณะนี้ ดังนั้นเฟสชนิดนี้จึงมีการใช้กันอย่างกว้างขวางมาก กลไกการแยกสาร ดังรูปที่ 2.26 (76)



รูปที่ 2.26 กลไกการแยกสารเมื่อใช้ reserve phase เป็นเฟสที่อยู่กับที่ (76)

3. Ion exchange chromatography หลักการของการแยกสารโดยเทคนิคนี้จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพของไอออนในสารละลายกับไอออนที่มีประจุตรงกันข้าม ซึ่งอยู่ที่ผิวของเฟสที่อยู่กับที่ ion exchanger ประกอบด้วยของแข็งที่มีรูพรุนซึ่งปกติแล้วจะเป็นพวกเรซิน (resin) ที่มี ionic group ต่ออยู่ด้วยพันธะทางเคมี เฟสเคลื่อนที่ปกติแล้วจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) ซึ่งประกอบด้วย counter-ion ที่มีประจุตรงกันข้ามกับ group ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่บรรจุอยู่ กล่าวคือ ไอออนในเฟสเคลื่อนที่จะมีประจุเหมือนกับไอออนที่ต้องการจะแยก ซึ่งไอออนดังกล่าวนี้จะรวมกับหมู่เคมีที่อยู่บนผิวของเรซินในลักษณะที่เป็น ion pair เพื่อทำให้ประจุทั้งหมดอยู่ในภาวะสมดุล การแข่งขันกันระหว่างไอออนในสารละลายกับ counter-ion เพื่อเข้าครอบครองตำแหน่งที่มีประจุบนผิวของเรซินจะมีผลทำให้เกิดการยึดเกาะขึ้นเทคนิคนี้เหมาะสมมากต่อการแยกพวกไอออนของโลหะ และยังใช้ประโยชน์ในการแยกสารประกอบทางชีวภาพ (biological sample) ที่ละลายในน้ำได้อีกด้วย เช่น โปรตีน และกรดอะมิโน กลไกการแยกสาร ดังรูปที่ 2.27



รูปที่ 2.27 กลไกการแยกสารเมื่อใช้ ion-exchange resin เป็นเฟสที่อยู่กับที่ (76)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย