



เลขที่อนุสิทธิบัตร 25420

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถ้อยสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ

2203001655

วันขอรับอนุสิทธิบัตร

4 กรกฎาคม 2565

ผู้ประดิษฐ์

นายทิวธวัฒน์ นาพิรุณ และคณะ

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการสกัดสารที่มีส่วนผสมของเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากใบพังแฟร

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ



ออกให้ ณ วันที่ 19 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2568

หมดอายุ ณ วันที่ 3 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2571



รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

- หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นสุดอายุ
 2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
 3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นสุดอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 ครั้ง มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
 4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่



Ref.256801023936270

25420

รายละเอียดการประดิษฐ์ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการสกัดสารที่มีส่วนผสมของเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากใบพังแหร

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 ชีววิทยา พืชเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพเกี่ยวกับกระบวนการสกัด

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- Trema orientalis* (Linn.) หรือเป็นที่รู้จักในชื่อไทยว่า “พังแหร” เป็นทรัพยากรธรรมชาติอย่างหนึ่งที่สามารถพบได้ในประเทศไทย มีชื่อท้องถิ่นอื่นๆ เช่น ปอ (เชียงใหม่), พังแหร (แพร่), พังแหรใหญ่ พังแหรใหญ่ ตายไม่ทันเผ่า (ยะลา), ขางปอยป่า ปอแฟน ปอหุ ปอแหก ปอแฮก (ภาคเหนือ), ตะกาย (ภาคกลาง) เป็นต้น
- 10 พังแหร เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในวงศ์กัญชา (Cannabaceae) เป็นไม้เถาเลื้อยตามธรรมชาติพบทั้งในพื้นที่ป่าพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่เสื่อมโทรม มีเขตการกระจายพันธุ์ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน ญี่ปุ่น โมลด์คาร์ล นิวกินี และประเทศเขตร้อนในทวีปแอฟริกา ในประเทศไทยมักพบขึ้นตามที่โล่งแจ้ง ป่าเบญจพรรณ และตามชายป่าดงดิบ พังแหรเป็นไม้ยืนต้น ไม้ผลัดใบที่มีขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 4 – 12 เมตร เป็นไม้เนื้ออ่อนที่โตเร็ว ส่วนยอดโปร่งเป็นพุ่มแผ่กว้าง กิ่งก้านออกในแนวขนานกับพื้นดิน ปลายกิ่งงุ้มลง ตามกิ่งอ่อนจะมีขนขึ้นปกคลุม เปลือกต้นเป็นสีเขียวอมเทาอ่อนหรือสีน้ำตาลผิวบางเรียบเกลี้ยงหรือมีรอยแตกตามยาวบ้าง และมีรูอากาศมาก ส่วนเปลือกชั้นในนั้นจะเป็นสีเขียวสด พังแหรถูกนำมาใช้งานที่หลากหลาย เปลือกต้นนำมาลอกออกใช้สำหรับทำเชือกมัดสิ่งของ ผลสุกใช้เป็นอาหารของนก ไม้พังแหรเป็นไม้เนื้ออ่อน ไม้ทนทาน แต่สามารถนำมาใช้ในงานก่อสร้างชั่วคราวหรือใช้ก่อสร้างโรงเรือนขนาดเล็กที่ไม่ต้องการความแข็งแรงมากนัก
- 15 ได้ รวมถึงเครื่องจักสาน เครื่องใช้สอย และอุปกรณ์ทางการเกษตร ใช้ปลูกเป็นไม้เบิกนำได้ดีเพราะโตเร็ว เหมาะ
- 20 สำหรับปลูกฟื้นคืนสภาพป่าในที่ชุ่มชื้น นอกเหนือจากนี้ยังใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการรักษาโรค รวมถึงการรักษาโรคทางเดินหายใจ โรคอัมพาต และโรคหอบหืด (Medthai, 2017)

- จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ใบของพังแหรมีสารแทนนิน (tannin), ซาโปนิน (saponin), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids), ออกตาโคซานอิก แอซิด (Octacosanoic acid), วัน-ออกตาโคซานิล อะซิเตท (1-octacosanyl acetate), ซิมิอะรีโนน (simiarenone), ซิมิอะรีโนล (simiarenol),
- 25 อีพิสิมิอะรีโนล (episimiarenol), และแอลกอฮอล์ไตรเทอร์พีนชนิดใหม่ (new alcohol triterpenes) และทรีมาทอล (tremetol) ยังสามารถแยกได้จากเปลือกต้น จากการศึกษาอื่นๆ ยังรายงานการพบสารเมทิลสเวิร์เทียนิน (methylswertianin), ดีคัสซาทิน (decussatin), ไกลโคไซด์ของดีคัสซาทิน (glycoside of decussatin), สเวโรไซด์ (sweroside), สโคโปเลติน (scopoletin), อีพิกาคาเทชิน (epicatechin), ลูปีโอล (lupeol), กรดพารา-ไฮดรอกซีเบนโซอิก (p-hydroxybenzoic acid), เอเดียน-ไฟว์-เอ็น-ทรี-โอน (adrian-5-en-3-one), กรดทุ

- แอลฟา, ทรีเบต้า-ไดไฮดรอกซียูร์ส-ทเวล์ฟ-เอ็น-ทเวนต์เอท-โออิก (2α , 3β -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid) ในเปลือกต้น จากการตรวจสอบทางเคมีของสารสกัดจากเปลือกรากของพืชชนิดนี้พบสารประกอบ เช่น กรดเฮกซะโคซานอิก (hexacosanoic acid), ทรี-ออริโท-เบต้า-กลูโคไพราโนซิล-เบต้า-ซิโตสเตอรอล ($3\text{-O-}\beta$ -glucopyranosyl- β -sitosterol), ซิมิอะรีโนน (simiarenone), กรดทรี,โฟร์-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ($3,4$ -dihydroxybenzoic acid),
- 5 ทูแอลฟา, ทรีแอลฟา, กรดทเวนต์ทรี-ไตรไฮดรอกซียูร์ส-ทเวล์ฟ-เอ็น-ทเวนต์เอท-โออิก (2α , 3α , 23 -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid) และเบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) และนอกจากนี้ในช่อดอกสามารถพบสาร Cannabinoid ที่สามารถพบได้ในพืชสกุลกัญชาและมีการกระจายอยู่ในพืชวงศ์กัญชาเช่นเดียวกัน (Napiroon et al., 2021) เนื่องจากพืชมนี้มีสารสำคัญทางพิษวิทยาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด พืชมจึงมีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพร ใช้ในการรักษาโรคและอาการต่างๆ เกือบทุกส่วนของพืชถูกใช้เป็นยาแตกต่างกันไปในแต่ละวัฒนธรรม
- 10 (Accra, 1992) ใบ ช่อดอก เปลือกไม้ และเมล็ดของพืชม แสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ ทั้งลดน้ำตาลในเลือด ต้านไข้ ยาแก้ปวด ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการหดเกร็ง และการต้านพลาสโมเดียม (Adinortey et al., 2013) จากการสืบค้นฐานข้อมูล และรายงานการตีพิมพ์ทางวิชาการ พบว่าพืชชนิดนี้ยังไม่เคยมีการศึกษา เกี่ยวกับกระบวนการแยกสารสำคัญ หรือระบุชนิดสารจากใบ การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการรายงานการศึกษาครั้งแรกสำหรับกระบวนการผลิตสารเบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) ด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Flash Column Chromatography : FCC) ซึ่งเป็นสารที่พบในส่วนใบของพืชชนิดนี้
- 15 สารเบต้า-ซิโตสเตอรอล(β -sitosterol)
- สารเบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -Sitosterol) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{29}H_{50}O$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 414.718 กรัมต่อโมล (g/mol) มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 136 ถึง 140 องศาเซลเซียส เป็นสารสำคัญในกลุ่ม ไฟโตสเตอรอล (phytosterol) ซึ่งพบในธัญพืช ผักและผลไม้ ไฟโตสเตอรอลเป็นสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์พืชตามธรรมชาติ โดยมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับคอเลสเตอรอลที่ได้จากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
- 20 มีมากในพืชที่มีไขมันสูง เช่น ถั่ว เมล็ดพืช พืชตระกูลถั่ว และน้ำมันมะกอก ในบรรดาไฟโตสเตอรอลหลายชนิด เบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) เป็นสารประกอบหลักที่พบมากในพืช มีการพิสูจน์ในการศึกษาในหลอดทดลอง และในร่างกายหลายครั้งว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ลดความวิตกกังวลและยากล่อมประสาท ยาแก้ปวด สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ยาด้านจุลชีพ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ลดไขมัน ปกป้องตับ และป้องกันโรคไขมันพอก
- 25 ตับ (Nonalcoholic Fatty Liver Disease : NAFLD) และโรคระบบทางเดินหายใจ รักษาบาดแผล ด้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Shyamaladevi Babu et al, 2021) เบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -sitosterol) เป็นส่วนประกอบโครงสร้างที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการไหลและการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผนังสิ่งมีชีวิตที่มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับคอเลสเตอรอล แต่ยังมีกลุ่มเอทิลที่มี C-24 (Soodabeh Saeidnia et al, 2014) เรียกอีกอย่างว่า ((ทรีเบต้า)-สติกมาส-ไฟว์-เอ็น-ทรี-โอล ((3β)-stigmast-5-en-3-ol), ทเวนต์ทู-ทเวนต์ทรี-ไดไฮโดร สติกมาสเตอรอล (22:23-dihydro stigmasterol), แอลฟา-ไดไฮโดรฟูโคส
- 30

เตอรอล (α -dihydrofucosterol), ซินโคล (cinchol), คูพรีโอล (cupreol), แรมนอล (rhamnol), ควิบราโคล (quebrachol) และซิโตสเตอริน (sitosterin) ตามจำนวนน้ำโมเลกุลที่เติมเข้าไปจะพบได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ แอนไฮดรัส เอมีไฮเดรต และโมนไฮเดรต (M.S. Bin Sayeed *et al*, 2016) ในการประดิษฐ์นี้เป็นการศึกษากระบวนการแยกสารสำคัญเบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -Sitosterol) ปริมาณสูงจากใบพังแห (Trema orientalis (Linn.)) ผลการศึกษาดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาต่อยอดในการหากรรมวิธีในการผลิตสารเบต้า-ซิโตสเตอรอลปริมาณสูงจากแหล่งของสารในธรรมชาติ

- สำหรับงานวิจัยด้านกระบวนการผลิต และการแยกสารเบต้า-ซิโตสเตอรอลนั้น มีรายงานเกี่ยวกับการสกัดสารกลุ่มไฟโตสเตอรอล มักใช้วิธีการสกัดเหมือนกับการสกัดไขมัน โดยใช้ตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้น้อยอย่างแพร่หลายมากที่สุดสำหรับการสกัดไฟโตสเตอรอลคือ เอ็น-เฮกเซน, ปีโตรเลียมอีเทอร์, เอทานอล และเมทิลีนคลอไรด์ (Uddin MS *et al*, 2018) อาจถูกนำมาใช้เพื่อสกัดทั้งไฟโตสเตอรอลอิสระและเอสเทอร์ที่เอสเทอร์กับส่วนประกอบอื่นๆ (Temelli *et al*, 2012) วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการสกัดและวิเคราะห์สารกลุ่มไฟโตสเตอรอล Roaini และคณะในปี 2016 ได้ศึกษาผลกระทบของวิธีการสกัดไฟโตสเตอรอลต่างๆ เช่น ซอกซ์เลต (Soxhlet) อัลตราโซนิค (Ultrasonic) คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (Super critical carbondioxide) และ คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดด้วยตัวทำละลาย (Super fluid critical carbondioxide) ผู้เขียนรายงานว่าปริมาณไฟโตสเตอรอลสูงสุด ได้รับจากวิธีการคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดกับตัวทำละลายร่วม มีการรายงานการสกัดสารเบต้า-ซิโตสเตอรอลด้วยวิธีซอกซ์เลต (Soxhlet) โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (Rand a zeez *et al*, 2018) การสกัดด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล สำหรับขั้นตอนในการแยกสารบริสุทธิ์มีการใช้งานการใช้เทคนิคการแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง (Preparative Thin Layer Chromatography : PTLC) หรือใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography : CC) โดยใช้ซิลิกาเจล (70-230 เมช) คอลัมน์ถูกบรรจุและชะด้วยส่วนผสม 4:1 เอ็น-เฮกเซนและเอทิล อะซิเตต (Aliba *et al*, 2018) และตรวจสอบสารเบต้า-ซิโตสเตอรอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC) โดยการพ่นแผ่น TLC ด้วยกรดวานิลลิน-ซัลฟิวริก รีเอเจนต์ ที่มีความจำเพาะต่อสารกลุ่มเทอปีน (Rand a zeez *et al*, 2018) มีการรายงานการวิเคราะห์ทางเคมีของสาร ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) ลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS) และไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เป็นต้น ซึ่งแตกต่างกับกระบวนการที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ โดยพบว่ากระบวนการผลิตสารเบต้า-ซิโตสเตอรอลที่ใช้ จะใช้กับพืชต่างชนิดกันกับการวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในใบพังแห ทั้งยังใช้ตัวอย่างของพืชในปริมาณน้อย ได้สารเบต้า-ซิโตสเตอรอลปริมาณสูงเมื่อเทียบปริมาณในหน่วยเดียวกันกับพืชอื่น

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- กรรมวิธีการสกัดสารที่มีส่วนผสมของเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากใบพังแห สามารถอธิบายวิธีการสกัดโดยสังเขปได้โดย ใช้ส่วนใบที่ผ่านการตากแห้งในที่ร่มมาบดแช่ตัวอย่างด้วยเมทานอลหรือเอทานอลในขวดแก้ว ปิดฝาให้สนิทนำไปแช่บนเครื่องและนำไปเก็บไว้ นำตัวอย่างดังกล่าวมากรองแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายด้วยกระดาษกรอง สารละลายที่ได้นำไปกลั่นระเหยแบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบเป็นของแข็งกึ่งเหลวติดที่ขวดก้นกลม

แล้วนำมาละลายแยกส่วนของสารสกัด ด้วยคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยการเติมน้ำกลั่น (distilled water: 18 MΩ/cm Millipore) และคลอโรฟอร์ม (chloroform; CHCl₃) ไซแยกส่วนของสารสกัดที่ละลายในคลอโรฟอร์มมาระเหยแห้งอีกครั้ง แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปชั่งบนตีกน้ำหนัก เก็บสารสกัดในขวดสีชาในตู้ควบคุมอุณหภูมิ แล้วนำสารสกัดนี้ไปศึกษาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography : TLC) เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) และทำการแยกสารสำคัญเบต้า-ซิโตสเตอรอลด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Flash Column Chromatography : FCC) ผลึกของสารเบต้า-ซิโตสเตอรอลที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการล้างผลึก (recrystallized) ด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ บันทึบน้ำหนักของสารบริสุทธิ์ที่ได้ และตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคป (Nuclear Magnetic Resonance : NMR)

- 10 ความมุ่งหมายของการประดิษฐ์นี้คือ กรรมวิธีการสกัดสารที่มีส่วนผสมของเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากใบพังแหรโดยใช้ตัวอย่างจากใบพังแหรในปริมาณน้อย และได้สารเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากกรรมวิธีการผลิต

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

กรรมวิธีการสกัดสารที่มีส่วนผสมของเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากใบพังแหร ประกอบด้วย

- 15 ก. นำใบของพังแหร (*Trema orientalis* (Linn.)) เลือกเก็บใบรอบๆ โดยไม่ทำลายหรือตัดต้นไม้ทั้งต้นเด็ดขาด เพื่อให้พืชสามารถฟื้นตัว แตกกิ่งและใบได้ต่อไป
- ข. ใบ จากข้อ ก. มาตากให้แห้งในที่ร่ม อากาศสามารถถ่ายเทได้สะดวก หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาบด หรือปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นที่ใช้กระแสไฟฟ้า 220 โวลต์
- ค. นำใบที่ผ่านการบดละเอียดแล้ว จากข้อ ข. จำนวน 300 กรัม แخذด้วยตัวทำละลายที่เลือกได้จากเมทานอล (MeOH; CH₃OH) หรือเอทานอล (EtOH; C₂H₅OH) ในปริมาตรพอเหมาะจนท่วมตัวอย่างในขวดแก้วแล้วปิดฝาให้สนิท
- 20 ง. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร (Orbital shaker) ที่อุณหภูมิห้อง ควบคุมความเร็วรอบการหมุนที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในที่มืดเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
- จ. ทำการกรองแยกสารละลายจากข้อ ง. ด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman filters No.1)
- 25 ฉ. นำสารละลายที่ผ่านการกรองจากข้อ จ. ทำการกลั่นระเหย ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน (Buchi evaporator) ที่ระดับความดัน - 0.5 ถึง - 0.8 บาร์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการหมุนของขวดกันกลม 70 รอบต่อนาที จนตัวทำละลายระเหยแห้ง จะได้สารสกัดหยาบเป็นของแข็งกึ่งเหลวติดขวดกันกลมที่ใช้เฉพาะในการกลั่นระเหย
- ข. นำสารสกัดหยาบในข้อ ฉ. มาละลายแยกส่วนของสารสกัด ด้วยคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกัน ระหว่างคลอโรฟอร์ม (chloroform; CHCl₃) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น (distilled water: 18 MΩ/cm Millipore) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในกรวยแยกสำหรับการแยกชั้นของสารละลาย
- 30 เขย่าเล็กน้อย ทิ้งไว้ 15 นาที จะได้การแยกชั้นของสารละลายสองชั้น

ซ. ไซเก็บส่วนสารสกัดที่ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform; CHCl_3) เรียกว่า สารสกัดส่วนลิโปฟิลิก (lipophilic extract) ซึ่งอยู่ชั้นล่างของสารละลายทั้งหมดมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่ระดับความดัน - 0.5 ถึง - 0.8 บาร์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยแห้งอีกครั้ง แล้วนำสารสกัดที่เป็นที่ติดขวดกันกลมไปชั่งบนตีกน้ำหนัก

- 5 ฅ. จากนั้นเติมเมทานอลในสัดส่วนสารสกัด 0.1 กรัมต่อเมทานอล 1 มิลลิลิตร และเก็บสารละลายในขวดสีชา แช่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -45 องศาเซลเซียส (ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำน้ำหนักสารสกัด 650 มิลลิกรัม จากน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง 200 กรัม)

นำสารสกัดไปจากข้อ ซ. มาตรวจสอบรูปแบบโปรไฟล์ของสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography : TLC) จำนวน 30 หยด โดยใช้หลอดคาปิลลารี และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- 10 (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) ด้วยเครื่อง Agilent 1100 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร บรรจุในขวดโวลุ่มสี่ขาชนิดฝาเกลียว ขนาด 9 มิลลิเมตร สำหรับงานโครมาโทกราฟี (รายละเอียด ดังตารางที่ 1 และ 2) จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography : TLC) พบแถบเรืองแสงสีฟ้า 1 แถบ ภายใต้แสงยูวีที่ระดับความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และ

- เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC พบพีกเด่นบนโปรไฟล์ 3 พีก ณ เวลา 3.325, 3.778 และ 31.425 นาที จากนั้นนำ

- 15 สารสกัดไปทำการแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Flash Column Chromatography : FCC) ด้วยวิธีการเก็บปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อขวดแก้ว ทั้งหมดจำนวน 19 ขวด (รายละเอียด ดังตารางที่ 3) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบโปรไฟล์ของสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography : TLC) อีกครั้งกับทุกขวดที่เก็บสาร ขวดละ 20 หยด พบว่าโปรไฟล์ของสารในขวดที่ 7 และ 8 มีลักษณะโปรไฟล์

- เหมือนกัน จึงนำสารดังกล่าวมารวมกันและนำไประเหยในตู้ดูดควัน พบว่าผลึกของสารบริสุทธิ์เริ่มปรากฏหลังการ

- 20 ระเหย จากนั้นล้างผลึก (recrystallized) ด้วยตัวทำละลายอีเทอร์จนสะอาด ก่อนนำไปตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance : NMR) และพบว่าเป็น

ผลึกของสารเบต้า-ซีโตสเตอรอล

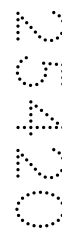
สำหรับปริมาณสารเบต้า-ซีโตสเตอรอลที่ได้จากกระบวนการนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับปริมาณสารเบต้า-ซีโตสเตอรอลที่ได้จากพืชอื่นๆ ซึ่งใช้เทคนิคที่แตกต่างกันในพืชอื่นๆ ดังตารางที่ 4

- 25 ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

รายการ	รายละเอียด
เทคนิค (Technique)	ทางเดียว, จากน้อยไปมาก (One way, ascending)
สิ่งดูดซับ (Absorbent)	แผ่นอลูมิเนียมเคลือบซิลิกา ความหนา 0.2 มิลลิเมตร (silica gel 60 F254; 0.2 mm thickness, Merck)
30 ขนาดแผ่นอลูมิเนียมเคลือบซิลิกา (Plate size)	20 x 20 เซนติเมตร
ระบบตัวทำละลาย (Solvent system)	เฮกเซน : เอทิล อะซิเตต ในอัตราส่วน 7:3 (Hexane : Ethyl acetate; 7:3)
ระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร (Distance)	7.5 เซนติเมตร

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

	รายการ	รายละเอียด																		
5	เครื่อง HPLC (HPLC technology)	Agilent 1100 series																		
	เครื่องตรวจสอบด้วยยูวี (UV Detector)	เครื่องตรวจสอบด้วยยูวี ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร (UV photodiode array detector 230 nm wave length)																		
	คอลัมน์ (Column)	คอลัมน์ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (reverse phase ChromSpher 5 C18 column, 250 x 4.6 mm; part number 28105-254630, Thermo Scientific)																		
10	ตัวอย่าง (Samples)	ใช้สารสกัดความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร กรองด้วยตัวกรองไนลอน และใช้ปริมาณฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร (10 mg/ml of lipophilic extract filtered with 13 mm x 0.45 μ m Nylon filter Injection : 20 μ l)																		
15	อัตราการไหลของสาร (Flow rate)	1 มิลลิลิตรต่อนาที (1.0 ml/min)																		
	เวลาในการตรวจสอบ	30 นาที (30 mins)																		
20	ระบบตัวทำละลาย (Solvent system)	เมทานอล (เกรด HPLC) และสารละลายบัฟเฟอร์(Buffer) ซึ่งผสมกันระหว่างน้ำบริสุทธิ์สูงอัลตราเพียวร์ 500 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.015 โมลาร์ เตตระบิวทิล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เออาร์เกรด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ 0.015 ออร์โธ-ฟอสฟอริก แอซิด เออาร์เกรด พีเอช 3 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (methanol gradient 60%-100% (HPLC grade Merck, in aqueous Buffer 0.015 M tetrabutyl ammonium hydroxide; C16H37NO, AR grade Fluka and 0.015 M ortho-phosphoric acid, AR grade Merck, pH 3)																		
25	วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)	<table> <tr> <th>เวลา (นาที)</th><th>เมทานอล</th><th>บัฟเฟอร์</th></tr> <tr> <td>0.10</td><td>60</td><td>40</td></tr> <tr> <td>17.00</td><td>90</td><td>10</td></tr> <tr> <td>22.00</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr> <td>28.00</td><td>100</td><td>0</td></tr> <tr> <td>29.00</td><td>60</td><td>40</td></tr> </table>	เวลา (นาที)	เมทานอล	บัฟเฟอร์	0.10	60	40	17.00	90	10	22.00	100	0	28.00	100	0	29.00	60	40
เวลา (นาที)	เมทานอล	บัฟเฟอร์																		
0.10	60	40																		
17.00	90	10																		
22.00	100	0																		
28.00	100	0																		
29.00	60	40																		
30																				



ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดของเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี

	รายการ	รายละเอียด
5	ปั๊มความดัน (Pump)	ปั๊มความดันต่ำมีมาตรวัดความดัน 1-10 บาร์ (Air Pump Aquarium; pump model AP-12000 Pressure 0.016 Mpa from Jeneca, China)
	ระบบตัวทำละลาย (Solvent system)	ใช้ตัวทำละลายผสมกันระหว่าง เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ และเมทานอล ในอัตราส่วนของ
		- เฮกเซน : ไดเอทิลอีเทอร์ ในอัตราส่วน 95:5-50:50 มิลลิลิตร
		- ไดเอทิลอีเทอร์ 100:0 มิลลิลิตร
		- ไดเอทิลอีเทอร์ : เมทานอล ในอัตราส่วน 75:25 มิลลิลิตร
10	อัตราการไหล (Flow rate)	12 มิลลิลิตรต่อนาที
	ขนาดคอลัมน์ (Column size)	คอลัมน์แก้วขนาด 400 x 40 มิลลิเมตร (glass column 400 x 40 mm)
15	สิ่งดูดซับ (Absorbent)	ซิลิกาเจลขนาด 40 - 63 ไมโครเมตร (KANTO CHEMICAL CO., INC. ; Silica gel 60N, 40-63 µm)
	ปริมาตร (Volume)	50 มิลลิลิตรต่อขวดเก็บสาร (fraction)
	จำนวนการเก็บ (fraction)	เก็บสารจากคอลัมน์ทั้งหมด 19 ขวด (fraction) ขวดละ 50 มิลลิลิตร

๖
๗
๘
๙
๑๐

ตารางที่ 4 พรรณพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานการพบสารเบต้า-ซิโตสเตอรอล (β -sitosterol)

	ชื่อพฤกษศาสตร์	ชื่อวงศ์	การอ้างอิง
25	<i>Anthocleista djalensis</i> A. Chev.	Loganiaceae	Ijeoma Solomon Okoro <i>et al.</i> , 2017
	<i>Cordia dichotoma</i>	Boraginaceae	Syed Salman Ali <i>et al.</i> , 2018
	<i>Corchorus fascicularis</i>	Malvaceae	A.P. Rajput and T.A. Rajput, 2012
	<i>Calotropis gigantea</i>	Asclepiadaceae	M. Rowshanul Habib <i>et al.</i> , 2007
	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	Elaeagnaceae	Rand a Azeez <i>et al.</i> , 2018
30	<i>Hypoxis rigidula</i> and <i>Hypoxis hemerocallidea</i>	Hypoxidaceae	N. Mkhize <i>et al.</i> , 2013
	<i>Michelia champaca</i>	Magnoliaceae	Hafsa Ahmad <i>et al.</i> , 2012
	<i>Morus alba</i>	Moraceae	Kátia Andressa Santos <i>et al.</i> , 2020
	<i>Synadenium glaucescens</i>	Euphorbiaceae	Vitus A. Nyigo <i>et al.</i> , 2016
	<i>Trema orientalis</i>	Canabaceae	First report in leaf

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ตามที่ได้เปิดเผยแล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์


นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ข้อถ้อยสิทธิ

1. กรรมวิธีการสกัดสารที่มีส่วนผสมของเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากใบพังแหร ประกอบด้วย
 - ก. นำใบของพังแหร (*Trema orientalis* (Linn.)) มาตากให้แห้งในที่ร่ม อากาศสามารถถ่ายเทได้สะดวก หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาบด หรือปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นที่ใช้กระแสไฟฟ้า 220 โวลต์
 - 5 ข. นำใบที่ผ่านการบดละเอียดแล้ว จากข้อ ก.จำนวน 300 กรัม แช่ด้วยตัวทำละลายที่เลือกได้จากเมทานอล (MeOH; CH₃OH) หรือเอทานอล (EtOH; C₂H₅OH) ในปริมาณพอเหมาะจนท่วมตัวอย่างในขวดแก้วแล้วปิดฝาให้สนิท
 - ค. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร (Orbital shaker) ที่อุณหภูมิห้อง ควบคุมความเร็วรอบการหมุนที่ 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในที่มืดเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง
 - 10 ง. ทำการกรองแยกสารละลายจากข้อ ค. ด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman filters No.1)
 - จ. นำสารละลายที่ผ่านการกรองจากข้อ ง. ทำการกลั่นระเหย ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน (Buchi evaporator) ที่ระดับความดัน - 0.5 ถึง - 0.8 บาร์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการหมุนของขวดกันกลม 70 รอบต่อนาที จนตัวทำละลายระเหยแห้ง จะได้สารสกัดหยาบเป็นของแข็งกึ่งเหลวติดขวดกันกลมที่ใช้เฉพาะในการกลั่นระเหย
 - 15 ฉ. นำสารสกัดหยาบในข้อ จ. มาละลายแยกส่วนของสารสกัด ด้วยคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกัน ระหว่างคลอโรฟอร์ม (chloroform; CHCl₃) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น (distilled water: 18 MΩ/cm Millipore) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในกรวยแยกสำหรับการแยกชั้นของสารละลาย เขย่าเล็กน้อย ทิ้งไว้ 15 นาที จะได้การแยกชั้นของสารละลายสองชั้น
 - ช. ไขเก็บส่วนสารสกัดที่ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform; CHCl₃) เรียกว่า สารสกัดส่วนลิโปฟิลิก (lipophilic extract) ซึ่งอยู่ชั้นล่างของสารละลายทั้งหมดมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่ระดับความดัน - 0.5 ถึง - 0.8 บาร์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยแห้ง
 - 20 ซ. เติมเมทานอลในสัดส่วนสารสกัด 0.1 กรัมต่อเมทานอล 1 มิลลิลิตร และเก็บสารละลายในขวดสีชา แช่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -45 องศาเซลเซียส

๒๐๒๕
๒๐๒๕
๒๐๒๕
๒๐๒๕

บทสรุปการประดิษฐ์

กรรมวิธีการสกัดสารที่มีส่วนผสมของเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากใบพังแหร สามารถอธิบายวิธีการสกัดโดยสังเขปได้โดยใช้ส่วนใบที่ผ่านการตากแห้งในที่ร่ม มาบดให้ละเอียด แช่วอย่างด้วยเมทานอลหรือเอทานอลในขวดแก้ว ปิดฝาให้สนิท นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าและนำไปเก็บไว้ หลังจากนำตัวอย่างดังกล่าวมารองแยก

5 เอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายด้วยกระดาษกรอง สารละลายที่ได้นำไปกลั่นระเหยแบบลดความดัน จะได้สารสกัดแห้งเป็นของแข็งกึ่งเหลวติดที่ขวดก้นกลม แล้วนำมาละลายแยกส่วนของสารสกัด ด้วยคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกัน โดยการเติมน้ำกลั่นและคลอโรฟอร์ม ไซแยกส่วนสารสกัดที่ละลายในคลอโรฟอร์มมาระเหยแห้งอีกครั้ง เติมเมทานอล และเก็บสารละลายในขวดสีชา แช่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ทำ

10 การแยกสารสำคัญเบต้า-ซิโตสเตอรอลด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Flash Column Chromatography : FCC) จะได้สารเบต้า-ซิโตสเตอรอลจากสารสกัด

25420