รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสกุล *Tabernaemontana*

Bioactive compounds from plants in the genus *Tabernaemontana*

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ.ดร.อนันต์ อธิพรชัย

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ.ดร.รุ่งนภา แซ่เอ็ง

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802034

สัญญาเลขที่ 80/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสกุล *Tabernaemontana*

Bioactive compounds from plants in the genus *Tabernaemontana*

อ.ดร.อนันต์ อธิพรชัย
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร.รุ่งนภา แซ่เอ็ง
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตุลาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 80/2558

โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้

บทคัดย่อ (Abstract)

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกพุดร้อยมาลัย (*Tabernaemontana pandacaqui*) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ตีนเป็ด (Apocynaceae) เมื่อนำดอกพุดร้อยมาลัยสด (2.0 กิโลกรัม) มาทำการสกัดโดยการแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่อุณหภูมิห้อง ได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลน้ำหนัก 196.78 กรัม เมื่อนำไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามลำดับความมีขั้วคือเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท พบว่าได้ร้อยละของผลผลิตที่แตกต่างกันออกไปดังนี้ ส่วนสกัดเฮกเซน (3.27%) ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท (5.44%) และส่วนสกัดชั้นน้ำ (91.29%) นอกจากนี้นำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (Methanol extract) ไปทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบสารทุติยภูมิเบื้องต้นทั้งหมด 5 กลุ่มสาร คือ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และ สเตอรอยด์ รวมทั้งได้นำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยไปทำการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวม (60.59 ± 0.23 mgGAE.g^{-1}) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (37.79 ± 0.22 mgQE.g^{-1}) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (31.87 ± 0.07 mgAAE.g^{-1}) อีกด้วย ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีปานกลาง (IC_{50} = 124.41 ± 0.46 μg/mL) นอกจากนี้การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทรกราฟีแบบต่างๆ พบสาร monoterpenoid indole alkaloids ที่เคยมีรายงานมาแล้ว 1 สารคือ 7α-Hydroxyindoleninevoacangine โครงสร้างของสารดังกล่าวถูกยืนยันด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR)

Chemical constituents and biological activity of *Tabernaemontana pandacaqui*, a member of the Apocynaceae, were studied. The fresh flowers of *T. pandacaqui* (2.0 kg) were ground and immersed in 80% methanol maceration at ambient temperature and concentrated under reduced pressure to yield the methanol extract (196.78 g). The residue was suspended in water and methanol (4:1) and partitioned successively with hexane and ethyl acetate to give hexane fraction (3.27%), ethyl acetate (8.16%) and residual aqueous fraction (136.94%), respectively. Nine qualitative phytochemical screening tests of the methanol extract of *T. pandacaqui* were evaluated and revealed the presence of alkaloid, flavonoid, tannin, terpenoid and steroid. In addition, the methanol extract of this plant was evaluated for their total phenolic content (60.59 ± 0.23 mgGAE.g^{-1}), the total flavonoids content (37.79 ± 0.22 mgQE.g^{-1}) and total antioxidant capacity (31.87 ± 0.07 mgAAE.g^{-1}). Moreover, this extract was evaluated for their antioxidant potential. The antioxidant activity was performed by DPPH radical scavenging assay. The extract showed good antioxidant activity (IC_{50} = 124.41 ± 0.46 μg/mL). In addition, the chemical constituents of the ethyl acetate fraction from the fresh flowers of *T. pandacaqui* were studied by using the chromatographic techniques. From these results, it was found that the monoterpenoid indole alkaloid, 7α-Hydroxyindoleninevoacangine was isolated. The structure of isolated compound was identified by using Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR) techniques.

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ (Introduction)	**1**
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)	**11**
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี	11
2.2 การเก็บตัวอย่าง	11
2.3 การเตรียมสารสกัดหยาบ	12
2.4 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)	13
2.5 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)	14
2.6 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)	14
2.7 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant content)	15
2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging	15
2.9 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี	15
3. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results & Discussion)	**20**
3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ	20
3.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)	21
3.3 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)	22
3.4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)	22
3.5 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant content)	23
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging	24
3.7 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี	26
4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)	**32**
4.1 สรุปผลการทดลอง	32
4.2 ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้	33
บรรณานุกรม	34
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)	36
ภาคผนวก : ประวัติคณะผู้วิจัย	37

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	ลักษณะโครงสร้างของ monoterpenoid indole alkaloids ในพืชสกุล *Tabernaemontana*	5
3-1	น้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากดอกพุดร้อยมาลัย	20
3-2	การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลจากดอกพุดร้อยมาลัย	21
3-3	ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย	24
3-4	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ของสารมาตรฐานและสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย	25
3-5	น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทของดอกพุดร้อยมาลัย	26
3-6	น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-3/4-12	27
3-7	น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-3/13-39	28
3-8	น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-10/4-9	29
3-9	น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-3/49-58	29
3-10	น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-7/26-39	29
3-11	น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-7/142-186	30
3-12	น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-10/120-139	30

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1-1	ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*)	2
1-2	ลักษณะโครงสร้างของ monoterpenoid indole alkaloids ในพืชสกุล *Tabernaemontana*	6
2-1	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบของดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*)	12
2-2	การแยกสารจากส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate fraction) ของดอกพุดร้อยมาลัย	16
2-3	การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-3/4-12 (309.1 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย	16
2-4	การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-3/13-39 (4448.1 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย	17
2-5	การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-10/4-9 (138.6 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย	18
2-6	การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-3/49-58(1) (7.7 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย	18
2-7	การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-7/26-39 (3.8 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย	18
2-8	การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-7/142-186 (4.9 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย	19
2-9	การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-10/120-139 (165.1 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย	19
3-1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ใช้ในการหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)	22
3-2	กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ใช้ในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)	23
3-3	กราฟมาตรฐานวิตามินซี ใช้ในการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant content)	23
3-4	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging	25
3-5	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging	25
3-6	โครงสร้างของสาร 7α-Hydroxyindoleninevoacangine ที่แยกได้จากดอกพุดร้อยมาลัย	31

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ความหลากหลายทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรของประเทศไทยมีความสำคัญและเป็นข้อได้เปรียบอย่างยิ่งของประเทศต่อการพัฒนาด้านการวิจัยให้เกิดการประยุกต์และนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อาทิเช่น ยารักษาโรค อาหารเสริมสุขภาพ เครื่องสำอาง หรือแม้แต่การนำไปใช้ในทางการเกษตร เพื่อเป็นสารกำจัดศัตรูพืช หรือลดการปนเปื้อนจากสารเคมีในกระบวนการเพาะปลูกขั้นต่างๆ ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตทางการเกษตรมีคุณภาพได้มาตรฐาน โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อคนและสัตว์ ดังนั้นการค้นหาพืชสมุนไพร และสารที่เป็นองค์ประกอบจากพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ นั้น จะเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรที่เป็นทรัพยากรของประเทศ และยังสามารถพัฒนาพืชสมุนไพร และสารที่ค้นพบดังกล่าวนั้นเพื่อนำไปสู่การเป็นยารักษาโรค หรือเป็นอาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอางได้อีกด้วย ผลดังกล่าวที่ได้จะช่วยให้สุขภาพของประชากรมีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น และเศรษฐกิจในประเทศมีความมั่นคงมากขึ้นอีกด้วย รวมทั้งเพื่อรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรัง ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง และโรคมะเร็ง เป็นต้น

เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชนั้นเป็นทรัพยากรหลักที่เป็นแหล่งของการค้นพบยารักษาโรค อาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอาง เป็นต้น พืชในสกุล *Tabernaemontana* เป็นพืชสกุลหนึ่งที่ใช้เป็นยาสมุนไพรในจีน ไทย สำหรับการรักษาอาการไข้ อาการปวดต่างๆ และแก้โรคบิด เป็นต้น *Tabernaemontana* เป็นสกุลของพืชมีดอกในวงศ์ตีนเป็ด (Apocynaceae) มี 100-110 สปีชีส์ เป็นพืชที่กระจายตัวในเขตร้อน เป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ไม่ผลัดใบ ใบเรียงตรงข้าม ยาว 3-25 cm ยางขาวเหมือนน้ำนม จึงมักเรียกพืชในสกุลนี้ว่า "milkwood" พืชในสกุล *Tabernaemontana* พบกระจายตัวทั่วไปในไทย อาทิเช่น *T. bufalina* (พริกป่า) *T. divericata* หรือ *T. crispa* (พุดจีบ) *T. pandacaqui* (พุดร้อยมาลัย) *T. pauciflora* (พริกป่านก) และ *T. rostrata* (พุดเวียน) จากการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Tabernaemontana* จะพบสารในกลุ่มที่เรียกว่า monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) เป็นสารหลักที่พบปริมาณมากที่สุด โดยสารกลุ่มนี้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย เช่น ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ต้านการอักเสบ ควบคุมความดันเลือดในหัวใจ ยับยั้งการติดเชื้อ ป้องกันการทำลายกระแสประสาท และต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น [1-4]

จากการทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้องเบื้องต้นพบว่า *Tabernaemontana pandacaqui* (พุดร้อยมาลัย) เป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* ที่พบในไทยและนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย แต่มีการศึกษาการแยกส่วนประกอบทางเคมี และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยของพืชชนิดนี้น้อยมาก ส่วนใหญ่จะเป็นการนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ไม่มีการศึกษาการแยกส่วนประกอบทางเคมี อาทิเช่น ในปี ค.ศ. 1989 Taesotikul และคณะ [5] ได้รายงานการศึกษาสารสกัดชั้นเอทานอลจากใบและดอกของพุดร้อยมาลัยพบว่าสารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ต่อระบบหลอดเลือดและหัวใจ และในปี ค.ศ. 1998 คณะผู้วิจัยดังกล่าว [6] ได้รายงานการศึกษาส่วนสกัดแอลคาลอยด์จากลำต้นของ *T. pandacaqui* ต่อความดันโลหิตและการเต้นของหัวใจในหนู พบว่าส่วนสกัดแอลคาลอยด์ดังกล่าวมีฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตได้ ในปีเดียวกันคณะผู้วิจัยได้ [7] รายงานการศึกษาส่วนสกัดหยาบแอลคาลอยด์จากลำต้นของ *T. pandacaqui* ต่อระบบประสาทส่วนกลางในสัตว์ทดลอง พบว่าส่วนสกัดแอลคาลอยด์ดังกล่าวส่งผลต่อภาวะต่างๆ ของระบบประสาทส่วนกลางในหนู รวมทั้งในปี ค.ศ. 2003 คณะผู้วิจัยดังกล่าว [8] ได้รายงานการศึกษาสารสกัดชั้นเอทานอลจากลำต้นของ *T. pandacaqui* พบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ช่วยลดไข้และแก้ปวด ได้อีกด้วย

จากประโยชน์ดังกล่าวของพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) เป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* และสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของพืชในสกุลนี้ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการแยกการสกัด และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) ซึ่งเป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* (รูปที่ 1-1) และนำองค์ประกอบทางเคมีที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปสู่การค้นพบสารชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนและ องค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุล *Tabernaemontana* ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาและพัฒนาสมุนไพรไทยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการค้นพบยาชนิดใหม่ รวมทั้งเพื่อใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังของประชากรได้อีกด้วย

รูปที่ 1-1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) [9]

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสกัด การแยก และการวิเคราะห์โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของดอกพุดร้อยมาลัย
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดอกพุดร้อยมาลัย
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบทางเคมีจากดอกพุดร้อยมาลัย
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีจากดอกพุดร้อยมาลัยกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้เพื่อการนำไปสู่การค้นพบยาชนิดใหม่
5. เพื่อเป็นการแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์กับผู้สนใจทั่วไป ทั้งภาครัฐและเอกชนหรืออุตสาหกรรม เพื่อนำไปประยุกต์และปรับใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด และเพื่อสร้างองค์ความรู้ด้านการทางานวิจัยให้แก่นิสิต รวมทั้งผลิตและตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกับนิสิตคณาจารย์ในวารสารระดับนานาชาติที่เป็นที่ยอมรับ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการสกัดและการแยกสารจากดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) ให้ได้สารบริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบต่างๆ
2. ทำการวิเคราะห์โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) โดยอาศัยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีแบบต่างๆ
3. ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) และสารอนุพันธ์ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้เพื่อการนำไปสู่การค้นพบยาชนิดใหม่

4. มีการการแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์กับผู้สนใจทั่วไป ทั้งภาครัฐและเอกชนหรืออุตสาหกรรมเพื่อนำไปประยุกต์และปรับใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด และเพื่อสร้างองค์ความรู้ด้านการทางานวิจัยให้แก่นิสิต รวมทั้งผลิตและตีพิมพ์ผลงานวิจัยร่วมกับนิสิตคณาจารย์ในวารสารระดับนานาชาติที่เป็นที่ยอมรับ

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นศึกษาการแยก การสกัด และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) ซึ่งเป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* และนำองค์ประกอบทางเคมีที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การค้นพบยาชนิดใหม่ รวมทั้งเพื่อใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรัง

การสกัดเป็นเทคนิคในการแยกสารอินทรีย์ออกจากของผสมตัวอย่างโดยใช้กระบวนการที่เหมาะสมซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในเคมีอินทรีย์เช่น การสกัดแยกสารประกอบบางชนิดออกจากแหล่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น ใบไม้ ดอกไม้ พืช ผัก สมุนไพร รวมทั้งการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมหลังทำปฏิกิริยาซึ่งการสกัดสารอินทรีย์โดยการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมนั้นมีวิธีการสกัดด้วยกัน 3 วิธีคือ 1). การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (Solid-Liquid Extraction, SLE) เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารอินทรีย์ที่ต้องการออกมาจากของผสมตัวอย่างที่เป็นของแข็ง การสกัดแบบนี้มีหลักการไม่แตกต่างจากการหาตัวทำละลายเพื่อตกผลึกสาร 2). การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-Liquid Extraction, LLE) เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมตัวอย่างที่เป็นของเหลว 3). การสกัดกรด-เบส (Acid-Base Extraction) เป็นการใช้ปฏิกิริยากรด-เบสเพื่อแยกสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรดแก่ กรดอ่อน กลางและเบสออกจากกัน นอกจากวิธีการสกัดสารอินทรีย์ 3 วิธีข้างต้นแล้ว ยังสามารถจำแนกวิธีการสกัดสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้อีกหลายวิธีด้วยกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน ได้แก่

1. การแช่หมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสาระสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยวิธีการหมักตัวอย่างกับตัวทำละลายในภาชนะปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถที่ปิดสนิท ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน และค่อยๆ เขย่าหรือกวนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆ รินเอาสารสกัดออกจากกาก (Marc) และนำสารที่สกัดได้รวมกัน และนำไประเหยตัวทำละลายออก สุดท้ายก็จะได้เป็นสารสกัดหยาบ ข้อดีของวิธีนี้คือสารไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2. การแช่สกัดแบบต่อเนื่อง (Percolation) เป็นวิธีสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยการแช่และการไหลผ่านตัวทำละลายไปยังผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่นำมาทำการสกัดโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolator ซึ่งมีวิธีการคือ นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้นทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุตัวอย่างพืชทีละชั้นลงใน Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือตัวอย่างพืชประมาณ 0.5 เซนติเมตร และทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเริ่มไขเอาสารสกัดออกโดยการเติมตัวทำละลายเหนือตัวอย่างพืชอย่าให้แห้งเก็บสารสกัดจนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ สารที่สกัดได้รวมกัน และนำไประเหยตัวทำละลายออก สุดท้ายก็จะได้เป็นสารสกัดหยาบ ข้อดีของวิธีนี้คือเป็นการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้สมบูรณ์และไม่ใช้ความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนานเพื่อให้ได้สารออกมาปริมาณมาก

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extraction) เป็นวิธีสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ความร้อนในการสกัดสาร ซึ่งความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (Heating mantle) หรือหม้ออังน้ำจะไปทำให้ตัวทำละลายระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (Thimble) ซึ่งบรรจุตัวอย่างผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไว้ เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (Extracting chamber) สูงถึงระดับที่เหมาะสมจะเกิดกระบวนการกาลักน้ำขึ้น ตัวทำละลายที่สกัดสารก็จะไหล

ย้อนกลับลงมาในภาชณะด้วยวิธีกาลักน้ำ และจะเกิดกระบวนการดังข้างต้นต่อเนื่องไปเรื่อยๆ จนกว่าจะทำการสกัดเสร็จสมบูรณ์ ข้อดีของวิธีนี้คือเป็นการสกัดที่ไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลายแต่มีการใช้ความร้อนอาจทำให้สารสำคัญบางตัวที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืชนั้นๆ สลายไป

วิธีทางโครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่สามารถแยกสารที่ผสมกันออกจากกันได้โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาค 2 วัฏภาคได้ไม่เท่ากัน โดยวัฏภาคหนึ่งคือวัฏภาคนิ่ง (Stationary phase) หรือตัวดูดซับและอีกวัฏภาคหนึ่งคือวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) หรือตัวทำละลาย สารต่างชนิดกันจึงเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งออกมากับวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกันจึงเกิดการแยกขึ้น ในปัจจุบันมีเทคนิคทางโครมาโตกราฟีหลายประเภทด้วยกัน แต่ที่นิยมใช้ในการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติคือ ธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography) และคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography) ซึ่งเป็นโครมาโทรกราฟีแบบดูดซับทั้งคู่ (Absorption chromatography)

1. ธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) เป็นเทคนิคที่ใช้ตัวดูดซับเคลื่อนที่บนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกหรือแผ่นอลูมิเนียมโดยเคลือบเพียงด้านเดียว ตัวดูดซับที่นิยมใช้คือซิลิกาเจล (Silica gel) หรืออะลูมินา (Alumina) บางครั้งอาจผสมกับแคลเซียมซัลเฟตด้วย ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC นั้นจะทำการแต้มสารตัวอย่างลงไปบนปลายด้านหนึ่งของแผ่น TLC ด้วยหลอดคาพิลลารี และนำแผ่น TLC ไปจุ่มลงในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อทำการแยกสาร ตัวทำละลายก็จะเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC สารที่มีโครงสร้างแตกต่างกันจะเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC ด้วยระยะทางที่แตกต่างกัน การเคลื่อนที่ของสารบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารแต่ละชนิด และความสามารถในการดูดซับที่มีต่อสารนั้น กล่าวคือสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดี และถูกดูดซับได้น้อย ดังนั้นจะถูกเคลื่อนที่ออกมาก่อน ส่วนสารที่ละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดี จะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง อัตราส่วนระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไปกับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่เรียกว่า รีเทนชั่น แฟกเตอร์ (Retention factor, R_f) โดยสารหนึ่งๆ จะมีค่า Rf ค่าเดียวเท่านั่นในระบบตัวทำละลายใดตัวทำละลายหนึ่ง (ค่า $R_f < 1$ เสมอ) ซึ่งเป็นค่าที่บงบอกลักษณะทางกายภาพเฉพาะตัวของสารนั้นๆ

“สูตร R_f = ระยะทางที่สารเคมีเคลื่อนที่ (cm) / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (cm)”

เพราะฉะนั้นเราจึงสามารถใช้ค่า R_f มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของสารได้ กล่าวคือ ถ้าสารใดมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้ดีจะมีค่า R_f มาก เนื่องจากสารจะถูกดูดซับได้น้อยและละลายในตัวทำละลายได้ดี ทำให้สารนั้นเกิดการเคลื่อนที่ออกมาก่อน ในทางตรงกันข้ามถ้าสารใดมีความสามารถในการละลายต่ำจะมีค่า R_f น้อย เนื่องจากสารจะถูกดูดซับได้มากและละลายในตัวทำละลายได้น้อย จึงเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง

2. คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกสารต่างๆ มากมายหลายชนิด อาทิเช่น การแยกองค์ประกอบต่างๆ ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ การแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากปฏิกิริยา เทคนิคนี้สามารถปรับขนาดคอลัมน์ให้เหมาะกับปริมาณสารที่ต้องการแยกได้ โดยมีวัฏภาคนิ่งเป็นของแข็ง เช่น ซิลิกาเจลบรรจุอยู่ในคอลัมน์แก้วยาว จากนั้นจึงเติมสารผสมที่ต้องการแยกลงไปด้านบนของคอลัมน์ก่อนที่จะผ่านตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ลงไปเพื่อทำให้เกิดการแยก วัฏภาคนิ่งจะมีแรงดึงดูดกับสารชนิดต่างๆ กันด้วยความแรงต่างกัน ซิลิกาเจลมีความมีขั้วสูงจึงมีแรงดึงดูดกับสารที่มีขั้วมากๆ ได้แข็งแรงกว่าสารไม่มีขั้ว ดังนั้นตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่จึงชะสารต่างชนิดกันออกมาไม่พร้อมกัน สารที่ถูกดูดซับไว้ได้ดี (สารมีขั้วสูง) จะออกมาจากคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้ไม่ดี (สารมีขั้วต่ำ)

“พุดร้อยมาลัย” มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tabernaemontana pandacaqui* และมีชื่อเรียกทั่วไปหลายชื่อ เช่น พุดตูม พุดฝรั่ง มะลิฝรั่ง จัดอยู่ในวงศ์ Apocynaceae ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพุดร้อยมาลัยเป็นไม้พุ่มสูง 2-6 เมตร ทุกส่วนของพุดร้อยมาลัยมีน้ำยางสีขาว ใบมีลักษณะเรียงตรงข้ามสลับตั้งฉาก ใบเดี่ยวรูปรีหรือรูปหอกกลับ โคนใบรูปลิ่มหรือสอบ ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบสีเขียวเป็นมัน ดอกมีลักษณะช่อสีขาวมีกลิ่นหอมออกแยกแขนงเชิงหลั่นตามซอกใบใกล้ปลายกิ่ง กลีบเลี้ยงรูปไข่ ปลายกลมหรือเรียวแหลม โคนเชื่อมติดกันเล็กน้อย ติดอยู่จนผลแก่และเปลี่ยนเป็นสีส้ม กลีบดอกสีขาวมีส่วนที่เชื่อมติดกันเป็นหลอดสีเหลืองอ่อน ผลเป็นฝักคู่รูปกระสวยเบี้ยวปลายแหลมและโค้งขึ้น มีสีส้มแดงแตกด้านเดียว เมล็ดมีเนื้อนุ่มสีแดงหุ้ม รูปสามเหลี่ยมและขรุขระ สีน้ำตาลแกมดำ [1-4]

ในการใช้ประโยชน์รวมทั้งสรรพคุณตามตำรายาแพทย์แผนไทย พบว่า ดอกพุดร้อยมาลัยตูมใช้ร้อยมาลัย เนื้อไม้ของต้นพุดร้อยมาลัยใช้เป็นยาลดไข้ และน้ำจากต้นพุดร้อยมาลัยใช้เป็นยาขับพยาธิได้อีกด้วย [1-4] และจากการทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้องพบว่าพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) เป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* ที่พบในไทยและนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย แต่มีการศึกษาการแยกส่วนประกอบทางเคมี และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยของพืชชนิดนี้น้อยมาก ส่วนใหญ่จะเป็นการนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ไม่มีการศึกษาการแยกส่วนประกอบทางเคมี อาทิเช่น

ในปี ค.ศ. 1989 Taesotikul และคณะ [5] ได้รายงานการศึกษาสารสกัดชั้นเอทานอลจากใบและดอกของ *T. pandacaqui* พบว่าสารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ต่อระบบหลอดเลือดและหัวใจ และในปี ค.ศ. 1998 คณะผู้วิจัยดังกล่าว [6] ได้รายงานการศึกษาส่วนสกัดหยาบแอลคาลอยด์จากลำต้นของ *T. pandacaqui* ต่อความดันโลหิตและการเต้นของหัวใจในหนู พบว่าส่วนสกัดแอลคาลอยด์ดังกล่าวมีฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตได้

ในปีเดียวกัน คณะผู้วิจัยเดิม [7] ได้รายงานการศึกษาส่วนหยาบสกัดแอลคาลอยด์จากลำต้นของพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) ต่อระบบประสาทส่วนกลางในสัตว์ทดลอง พบว่าส่วนสกัดแอลคาลอยด์ดังกล่าวส่งผลต่อภาวะต่างๆ ของระบบประสาทส่วนกลางในหนู รวมทั้งในปี ค.ศ. 2003 คณะผู้วิจัยดังกล่าว [8] ได้รายงานการศึกษาสารสกัดชั้นเอทานอลจากลำต้นของ *T. pandacaqui* พบว่าสารสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ช่วยลดไข้และแก้ปวด ได้อีกด้วย

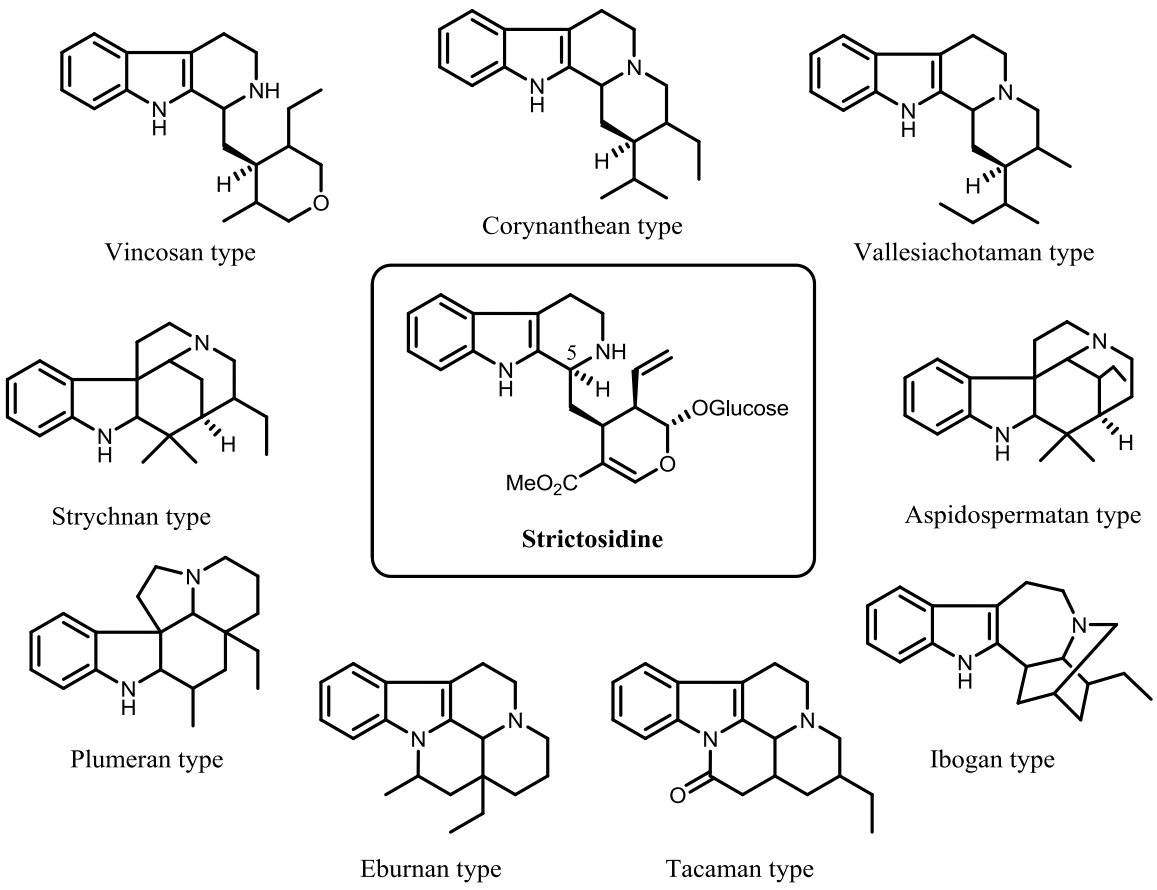
จากรายงานต่างๆ พบว่าพืชในสกุล *Tabernaemontana* ชนิดต่างๆ นั้นจะพบส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญและมีปริมาณมากที่สุด คือสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids โดยสารกลุ่มนี้จะมีลักษณะโครงสร้างที่พบแตกต่างกันไปในพืชสกุล *Tabernaemontana* โดยสรุปแล้วเราจะพบโครงสร้าง monoterpenoid indole alkaloids ในพืชสกุล *Tabernaemontana* ทั้งหมด 10 แบบด้วยกัน ดังตารางที่ 1-1 และรูปที่ 1-2 [10]

ตารางที่ 1-1 ลักษณะโครงสร้างของ monoterpenoid indole alkaloids ในพืชสกุล *Tabernaemontana*

Class	Abbreviation	Structure characteristics
Vincosan	D	C(2)-C(3)-C(14) unit, no N(4)-C(17) or N(4)-C(21) bond
Corynanthean	C	C(2)-C(3)-C(14) unit, N(4)-C(21) bond
Vallesiachotaman	V	C(2)-C(3)-C(14) unit, N(4)-C(17) bond
Strychnan	S	C(2)-C(16)-C(15) unit, C(3)-C(7) bond

ตารางที่ 1-1 ลักษณะโครงสร้างของ monoterpenoid indole alkaloids ในพืชสกุล *Tabernaemontana* (ต่อ)

Class	Abbreviation	Structure characteristics
Aspidospermatan	A	C(2)-C(16)-C(15) unit, no C(3)-C(7) bond
Plumeran	P	C(2)-C(16)-C(17)-C(20) unit
Eburnan	E	N(1)-C(16)-C(17)-C(20) unit
Tacaman	T	N(1)-C(16)-C(17)-C(14) unit
Ibogan	I	C(2)-C(16)-C(17)-C(14) unit
Bis-indole	B	Two indole alkaloids attached to each other

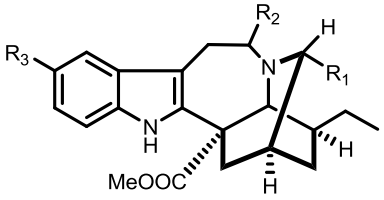


รูปที่ 1-2 ลักษณะโครงสร้างของ monoterpenoid indole alkaloids ในพืชสกุล *Tabernaemontana*

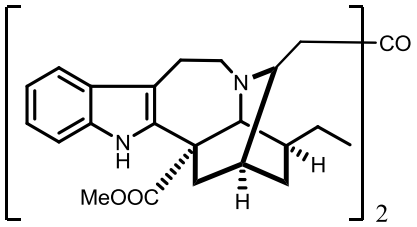
โดยพืชในสกุล *Tabernaemontana* พบกระจายตัวทั่วไปในไทย อาทิเช่น *T. bufalina* (พริกป่า) *T. crispa* หรือ *T. divericata* (พุดจีบ) *T. pandacaqui* (พุดร้อยมาลัย) *T. pauciflora* (พริกป่านก) และ *T. rostrata* (พุดเวียน) จากการทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้องจะพบว่า *T. divericata* (พุดจีบ) จะมีรายงานการศึกษาการสกัด และการแยกส่วนประกอบทางเคมี และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนมาก

แต่ *T. pandacaqui* (พุดร้อยมาลัย) เป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* ที่พบในไทยและนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายเช่นกัน แต่กลับพบว่ามีการศึกษาการแยกองค์ประกอบทางเคมี และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพน้อย

ในปี ค.ศ. 1992 ได้เริ่มมีการรายงานการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีจากพืชสกุล *Tabernaemontana* โดย Okuyama, Gao และ Yamazaki ได้รายงานการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีจากรากของ *T. pauciflora* พบสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids 6 สารคือ coronaridine (**1**), 3-(2-oxopropyl)coronaridine (**2**), 5*R*-(2-oxopropyl)coronaridine (**3**), 5*S*-(2-oxopropyl)coronaridine (**4**), 3-(2-oxopropyl)voacangine (**5**) และ Dimer-3-(2-oxopropyl)coronaridine (**6**) และได้รายงานส่วนประกอบทางเคมีจากรากของพุดร้อยมาลัย *(T. pandacaqui)* พบสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids 1 สารคือ voacangine (**7**) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร **1** และ **7** สามารถช่วยลดอาการปวดในหนูได้ดีมากอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 25 mg/kg ขณะที่สาร **2** ไม่มีผลต่อการลดอาการปวดดังกล่าว [11]

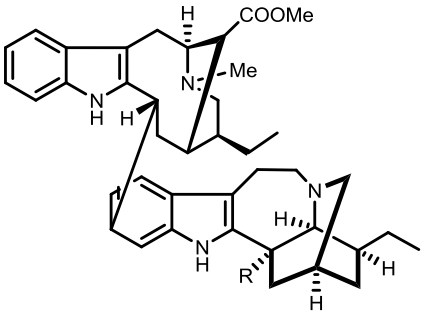


1: $R_1 = R_2 = R_3 = H$
2: $R_1 = CH_2COMe$, $R_2 = R_3 = H$
3: $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = CH_2COMe$ (*R*)
4: $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = CH_2COMe$ (*S*)
5: $R_1 = CH_2COMe$, $R_2 = H$, $R_3 = OMe$
7: $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = OMe$

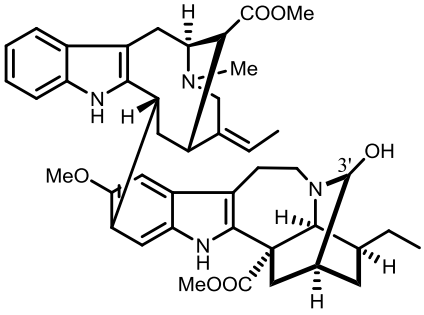


6

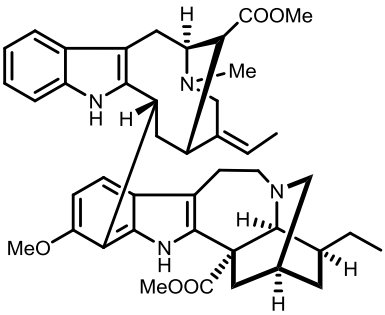
ในปี ค.ศ. 2006 กลุ่มวิจัยของ Kornkanok Ingkaninan ได้รายงานการทดสอบส่วนสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของ *T. divericata* (พุดจีบ) ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ที่ก่อให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Ellman's colorimetric method พบว่า ส่วนสกัดหยาบของลำต้นและรากมีฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesteraseได้ดีมาก แต่ส่วนสกัดหยาบของใบและดอกมีฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ต่ำกว่าสองส่วนแรก ซึ่งพบว่า ส่วนสกัดหยาบของลำต้นและราก มีเปอร์เซนต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 94.72 ± 2.09% และ 99.72 ± 0.26% ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อทราบว่าส่วนรากของ *T. divericata* (พุดจีบ) มีฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้ดีมาก กลุ่มวิจัยของ Kornkanok Ingkaninan จึงได้ทำการแยกส่วนประกอบทางเคมีจากส่วนรากของ *T. divericata* (พุดจีบ) พบสารกลุ่ม bis-monoterpenoid indole alkaloids ชนิดใหม่ 2 สารคือ 19,20-dihydrotabernamine (**8**) และ 19,20-dihydroervahanine A (**9**) รวมทั้งยังพบ bisindole alkaloids ที่มีรายงานไว้แล้วอีก 2 สาร คือ conodurine (**10**) และ tabernaelegantine A (**11**) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2013 กลุ่มวิจัยดังกล่าวได้รายงานการสกัดและแยกสารจากลำต้นของ *T. divericata* (พุดจีบ) พบ bis-monoterpenoid indole alkaloids ชนิดใหม่ที่เป็นส่วนประกอบหลักคือ 3'-*R/S*-hydroxyvoacamine (**12**) ซึ่งแสดงฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้ดีมาก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.00 ± 1.99 μM [12-13]



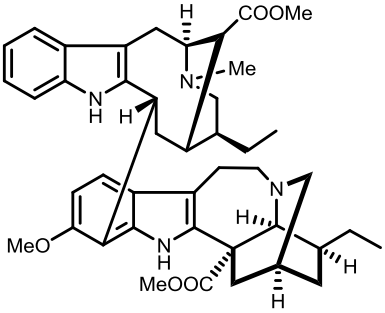
8: R = H; 19,20-Dihydrotabernamine
9: R = COOMe; 19,20-Dihydroervahanine A



12: 3'-R/S-hydroxyvoacamine



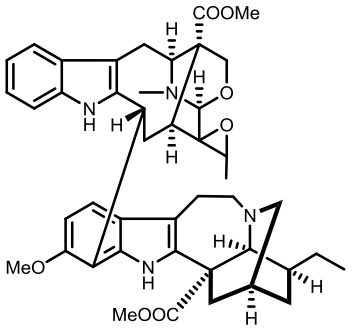
10: Conodurine



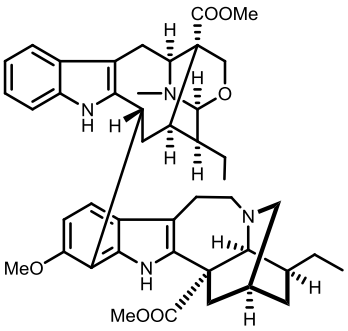
11: Tabernaelegantine A

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2008 กลุ่มวิจัยของ Thind ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ [HCT-15 (Colon), HT-29 (Colon), 502713 (Colon), MCF-7 (Breast), PC-3 (Prostrate)] ของส่วนสกัดหยาบชั้นต่างๆ (hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) จากใบของ *T. divericata* (พุดจีบ) พบว่าส่วนสกัดหยาบชั้น ethyl acetate แสดงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ 502713 (Colon) ที่ความเข้มข้นต่ำมากเท่ากับ 10 μg/ml ในขณะที่ส่วนสกัดหยาบชั้น chloroformแสดงฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ทั้งสามชนิด [HCT-15 (Colon), HT-29 (Colon), 502713 (Colon)] ที่ความเข้มข้นต่ำมากเท่ากับ 30 μg/ml [14]

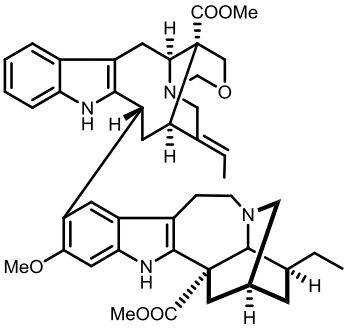
ในปี ค.ศ. 2013 กลุ่มวิจัยของ Zhang ได้รายงานการศึกษาสาร conophylline (**13**) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม bis-monoterpenoid indole alkaloids ที่แยกได้จาก *T. divericata* (พุดจีบ) โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับอ่อนของหนูที่ดีมาก [15] และในปีเดียวกันกลุ่มวิจัยของ Bao ได้รายงานการศึกษาการสกัดและแยกสารจากส่วนเหนือดินของ *T. divericata* (พุดจีบ) พบสารในกลุ่ม vobasinyl-ibogan-type bisindole alkaloids ชนิดใหม่ 5 สารคือ tabernaricatines A–E (**14-18**) และยังพบ monoterpenoid indole alkaloids ชนิดใหม่อีก 2 สารคือ tabernaricatines F and G (**19** and **20**) และพบสาร monoterpenoid indole alkaloids ที่เคยมีรายงานไว้แล้วอีก 24 สาร ในที่นี่รวมทั้ง conophylline (**13**) ด้วย และได้นำสารทั้งหมดที่แยกได้ไปทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ พบว่า conophylline (**13**) มีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด ดังนี้คือสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7, และ SW480 cells ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.17, 0.35, 0.21, 1.02, และ1.49 μM ตามลำดับ [16]



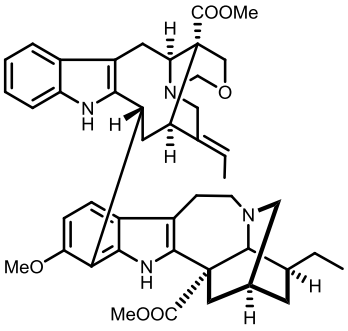
14



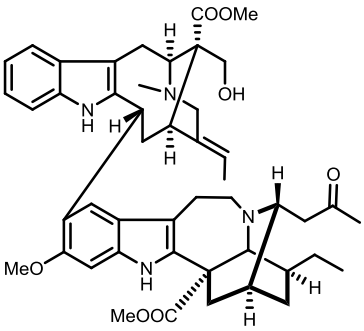
15



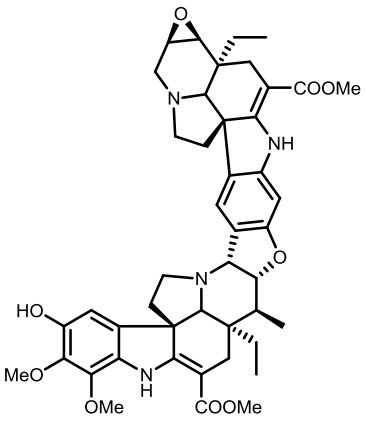
16



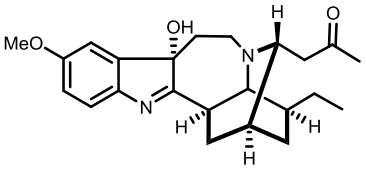
17



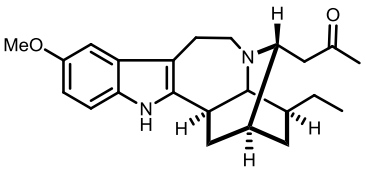
18



19



20



13

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยของพืชในสกุล *Tabernaemontana* ในไทยพบว่า *T. divericata* (พุดจีบ) จะมีรายงานการศึกษาการสกัด และการแยกส่วนประกอบทางเคมี และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนมาก แต่ *T. pandacaqui* (พุดร้อยมาลัย) เป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* ที่พบในไทยและนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายเช่นกัน กลับพบว่ามีการศึกษาการแยกส่วนประกอบทางเคมี และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยของพืชชนิดนี้น้อยมาก ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษา การแยก การสกัด และการวิเคราะห์และปรับเปลี่ยนโครงสร้างของส่วนประกอบทางเคมีของ *Tabernaemontana pandacaqui* (พุดร้อยมาลัย) เป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* โดยส่วนที่นำมาทำการวิจัยคือส่วนของดอก ซึ่งมีจำนวนมากและหาได้ง่าย งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาและการพัฒนาสมุนไพรไทยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการค้นพบยาชนิดใหม่ รวมทั้งเพื่อใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1). กลไกในการใช้ผลงานวิจัย (delivery system)

ข้อมูลและคุณสมบัติต่างๆ ของส่วนประกอบทางเคมีที่แยกได้จากพืชในสกุล *Tabernaemontana* โดยเฉพาะ *T. pandacaqui* (พุดร้อยมาลัย) ซึ่งมีจำนวนมากและหาได้ง่าย นั้นจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนักวิจัยที่ทำงานวิจัยเกี่ยวกับพืชในสกุล *Tabernaemontana* หรือพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน และยังสามารถที่จะสร้างนิสิตนักวิทยาศาสตร์ นักวิจัย และครูวิทยาศาสตร์ให้เพียงพอต่อความ ต้องการของประเทศ เพื่อรองรับการพัฒนาประเทศอย่างมั่นคงและนำพาประเทศไทยเข้าสู่ระบบเศรษฐกิจ ฐานความรู้แบบสร้างสรรค์และนวัตกรรมใหม่ พัฒนาสายงานการวิจัยเพื่อให้นักวิจัยมีระบบความก้าวหน้าในวิชาชีพ รวมทั้งพัฒนาแหล่งงานด้านการวิจัยเพื่อรองรับบุคลากรการวิจัยทั้งในภาครัฐและเอกชน แล้วเป็นเพื่อนำความรู้ต่างๆ ที่ได้ไปจากงานวิจัยนี้ ไปยกระดับพืชสมุนไพรของประเทศให้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น

2). ผลที่จะได้รับจากโครงการวิจัย

2.1 ได้ทราบถึงวิธีการสกัด การแยก การทำให้ได้สารบริสุทธิ์และการวิเคราะห์โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีของพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) ซึ่งเป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana*

2.2 ได้ทราบถึงส่วนประกอบทางเคมีของพุดร้อยมาลัย

2.3 ได้ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจของส่วนสกัดหยาบและองค์ประกอบทางเคมีจากพุดร้อยมาลัย

2.4 สามารถพัฒนาส่วนสกัดหยาบและองค์ประกอบทางเคมีที่สกัดแยกได้จากสมุนไพรที่นำไปสู่การค้นพบยาชนิดใหม่ รวมทั้งเพื่อใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังของประชากรได้อีกด้วย ซึ่งผลดังกล่าวนั้นจะเป็นการนำไปสู่การยกระดับพืชสมุนไพรของประเทศให้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น

2.5 สามารถนำองค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการศึกษาพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) ซึ่งเป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* ไปสู่การตีพิมพ์งานวิจัยในวารสารที่ยอมรับ หรือจดทะเบียนสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร หรือนำไปใช้ในการเรียนการสอนในรายวิชาที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยได้อีกด้วย

หน่วยงานที่จะนาผลการวิจัยดังกล่าวนี้ไปใช้ได้แก่ สถาบันการศึกษาวิจัย ทั้งในด้านเคมี ชีวเคมี เภสัชเคมี เช่น คณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ในการนำผลการศึกษาไปศึกษาต่อยอด และองค์การเภสัชกรรม หรือหน่วยงาน บริษัทอุตสาหกรรมยา ในการนำไปพัฒนาเป็นสูตรยาต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Material & Method)

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator)
2. เครื่องดูดสุญญากาศ (Vacuum pump)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
4. กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel)
5. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer
6. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทสโกปี (NMR spectroscopy)
7. คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2, 3 และ 4 เซนติเมตร
8. ชุดเครื่องแก้วพื้นฐาน เช่น บิกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตรวง หลอดทดลอง เป็นต้น
9. ซิลิกาเจล 60 (ขนาด 0.063-0.200 mm; 1.07734.9025; MERCK)
10. ซิลิกาเจล 60 (ขนาด <0.063 mm; 1.07729.9025; MERCK)
11. หลอดแสง UV สำหรับ TLC
12. ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เช่น Hexane, Dichloromethane, Chloroform, Ethyl acetate, Acetone, Methanol, Ethanol, น้ำกรอง และน้ำกลั่น
13. ตัวทำละลายสำหรับเครื่อง NMR spectroscopy ได้แก่ Chloroform-d_1 และ Methanol-d_4
14. สารละลายกรดชนิดต่างๆ เช่น HCl, H_2SO_4, CH_3COOH
15. สารละลายเบสชนิดต่างๆ เช่น NaOH, NH_3
16. ลวดแมกนีเซียม (Mg(s))
17. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$)
18. สารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent)
19. สารละลาย Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu reagent)
20. สารละลาย Aluminium trichloride ($AlCl_3$)
21. สารละลาย Phosphomolybdate (Phosphomolybdate reagent)
22. สารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
23. กรดแกลลิก (Gallic acid)
24. เคอร์ซิติน (Quercetin)
25. วิตามิน ซี (Ascorbic acid, Vitamin C)

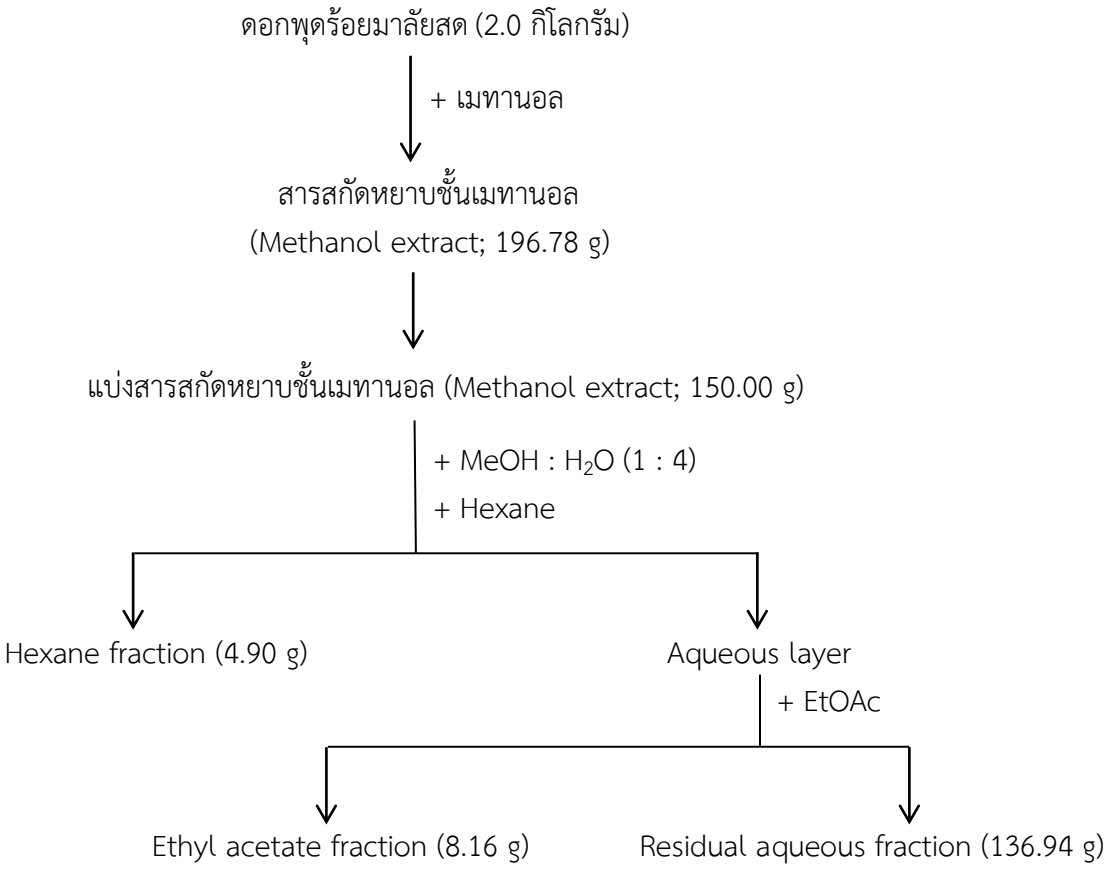
2.2 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างดอกพุดร้อยมาลัยสด (*Tabernaemontana pandacaqui*) ที่ใช้ในงานวิจัย ได้ซื้อมาจากตลาดหนองมน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2557 โดยพืชดังกล่าวได้ทำการยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์และเก็บตัวอย่างพืชไว้ที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่ 169 ถ.ลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 13000

2.3 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำดอกพุดร้อยมาลัยสดปริมาณ 2.0 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้หมาด และนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า นำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล (5.0 ลิตร)ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (ทำการแช่หมักซ้ำ 10 ครั้ง) หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายโดยใช้กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (Methanol extract) ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง

ทำการสกัดแยกตามความมีขั้วของสารโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่างๆ กัน (Partition extraction) ทำได้โดยแบ่งสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (Methanol extract) ของดอกพุดร้อยมาลัยน้ำหนัก 150.00 กรัม และนำมาละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 จากนั้นนำมาสกัดต่อด้วยเฮกเซน (hexane) จะได้เป็น 2 ส่วน คือส่วนสกัดชั้นเฮกเซน (Hexane fraction) และชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาทำการสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) ได้เป็น 2 ส่วน คือส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate fraction) และชั้นน้ำ (Residual aqueous fraction) ขั้นตอนการสกัดแสดงดังรูปที่ 2-1 จากการเตรียมสารสกัดหยาบข้างต้น จะสามารถได้สารสกัดหยาบจากดอกพุดร้อยมาลัยทั้งหมด 4 ส่วนสกัดหยาบคือ สารสกัดหยาบเมทานอล (Methanol extract) ส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (Hexane fraction) ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate fraction) และส่วนสกัดหยาบชั้นน้ำ (Residual aqueous fraction) เก็บส่วนสกัดหยาบที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาทำการทดลองและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 2-1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบของดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*)

2.4 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลจดอกพุดร้อยมาลัย โดยการแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอค ไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนดังนี้ [17]

1. การตรวจสอบแอลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปหยดสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบสารแอลคาลอยด์

2. การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็กๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) จำนวน 5 หยด เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มเรืองแสงแสดงว่าพบสารฟลาโวนอยด์

3. การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (water bath) 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง (Filtrate) ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบสารแอนทราควิโนน

4. การตรวจสอบคูมาริน (Coumarin)

ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบสารคูมาริน

5. การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ใช้การทดสอบแบบการเกิดฟอง (Froth test) โดยชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบสารซาโปนิน

6. การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริก คลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบสารแทนนิน

7. การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบสารเทอร์ปีนอยด์

8. การตรวจสอบสเตอรอยด์ (Steroids)

ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมกรดแกลเซียม แอซีติก (glacial acetic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 3 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสารสเตอรอยด์

9. การตรวจสอบคาร์ดิแอคไกลดคไซด์ (Cardiac glycosides)

ชั่งสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริก คลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดแกลเซียม แอซีติก (glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อยๆเติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบสารคาร์ดิแอคไกลโคไซด์

2.5 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic Skerget และ Knez (2007) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกรวมจะทำปฏิกิริยารวมกับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวม เกิดเป็น tungsten และ molybdenum ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร [18] ทำโดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, $mgGAE.g^{-1}$ dried extract)

2.6 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat และ Legret (1994) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์จะใช้ phenolic hydroxyl groups ทำปฏิกิริยากับ $AlCl_3$ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร [19] ทำโดยผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอลูมิเนียมไตร คลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้น 1.0% (w/v) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน รายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, $mgQE.g^{-1}$ dried extract)

2.7 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant content)

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ด้วยวิธี Phosphomolybdate colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Prieto, Pineda และ Aguilar (1999) โดยใช้วิตามินซี (L-ascobic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ Phosphomolybdate reagent สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารต้านอนุมูลอิสระรวมเกิดเป็น molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร [20] ทำโดยผสมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (ความเข้มข้น 0.5-0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Phosphomolybdate reagent ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มบนเครื่องอังน้ำ ที่อุณหภูมิ 78 ºC เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานวิตามินซี รายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Ascorbic acid equivalents, mgAE.g^{-1} dried extract)

2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

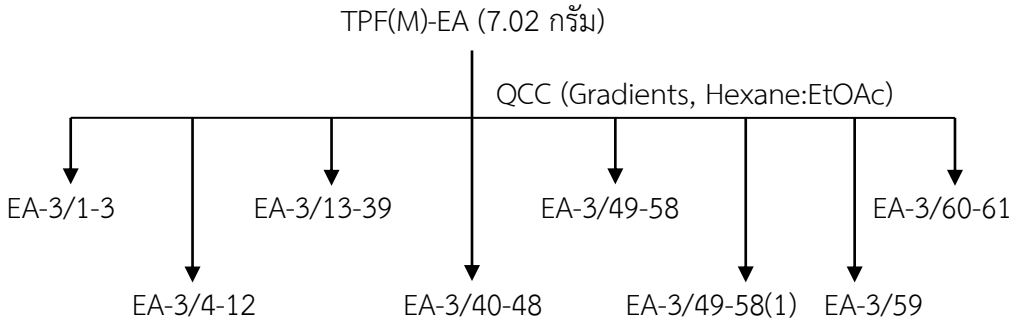
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli, และ Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) จะเป็นสารละลายสีม่วงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้สารละลายสีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อนและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร [21] ทำโดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\%\text{DPPH radical inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีการทดสอบ
B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

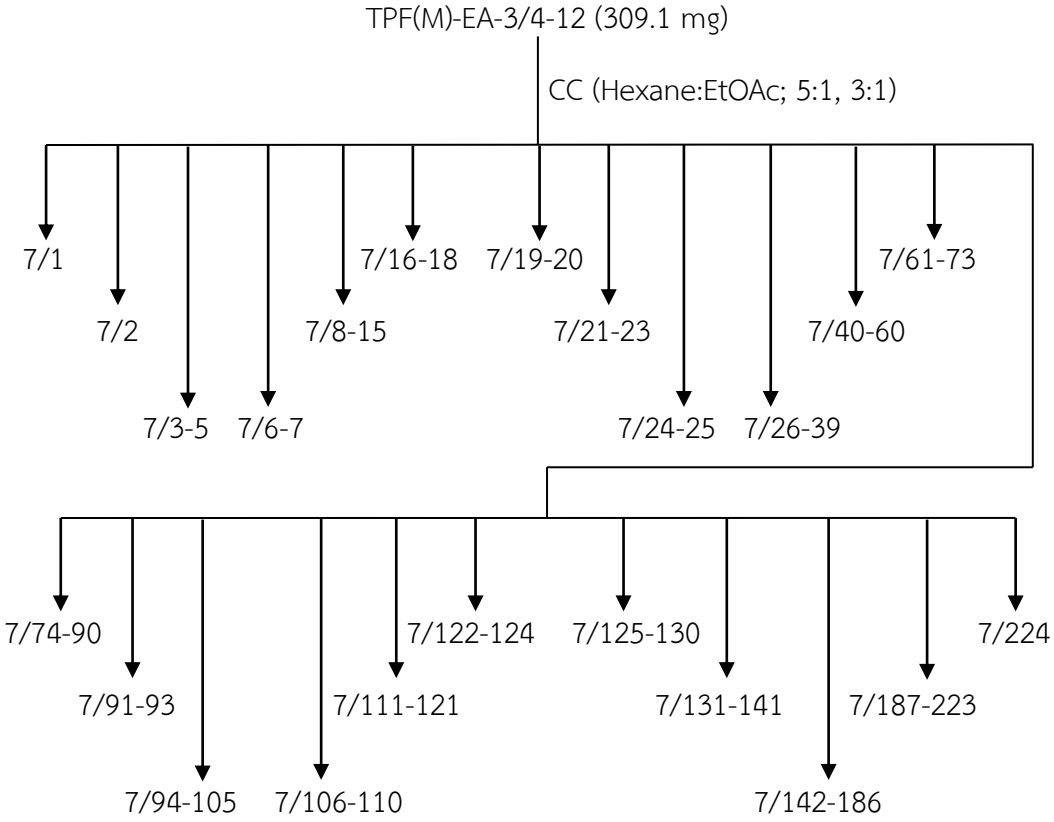
2.9 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

นำส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate fraction, TPF(M)-EA) น้ำหนัก 7.02 กรัม มาแยกด้วย Quick column chromatography (QCC) ใช้ ซิลิกา เจล 60 (Merck, 0.063-0.200 mm) เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย Hexane ต่อ Ethyl acetate ในอัตราส่วนต่างๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยการเพิ่มตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่า (Gradient elution) ตามด้วยตัวทำละลายเมทานอล 100% ซึ่งการทดลองจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการชะสารครั้งละ 400 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค ธินเลเยอร์ โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ถ้าสารที่ได้ออกมามีลักษณะคล้ายกันก็จะทำการรวมกันจากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารทั้งหมด 8 fractions แสดงดังรูปที่ 2-2



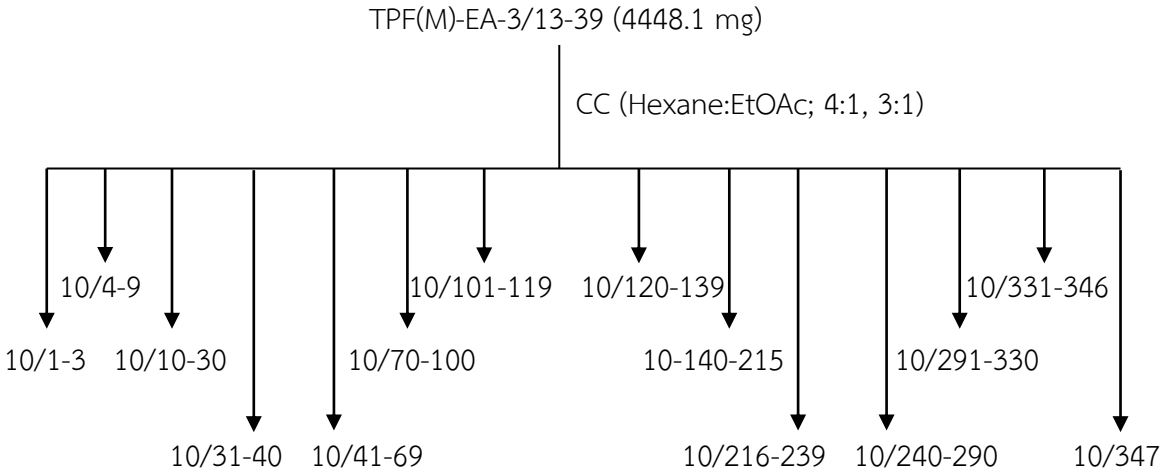
รูปที่ 2-2 การแยกสารจากส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate fraction) ของดอกพุดร้อยมาลัย

นำ fraction TPF(M)-EA-3/4-12 น้ำหนัก 309.1 mg ทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC) ใช้ซิลิกาเจล 60 (Merck, <0.063) เป็นตัวดูดซับ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์เท่ากับ 3.0 เซนติเมตร ทำการบรรจุซิลิกาเจลสูง 20.0 เซนติเมตร ใช้ระบบตัวทำละลายอินทรีย์ในการเคลื่อนสารคือ Hexane ต่อ Ethyl acetate ในอัตราส่วน 5:1 และ 3:1 ทำการตรวจสอบแต่ละ fraction ที่ได้ด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ถ้า fraction ที่ได้ออกมามีลักษณะคล้ายกันก็จะทำการรวมกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารทั้งหมด 23 fractions แสดงดังรูปที่ 2-3



รูปที่ 2-3 การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-3/4-12 (309.1 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย

นำ fraction TPF(M)-EA-3/13-39 น้ำหนัก 4448.1 mg ทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC) ใช้ซิลิกาเจล 60 (Merck, <0.063) เป็นตัวดูดซับ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์ 4.0 เซนติเมตร ทำการบรรจุซิลิกาเจลสูง 20.0 เซนติเมตร ใช้ระบบตัวทำละลายอินทรีย์ในการเคลื่อนสารคือ Hexane ต่อ Ethyl acetate ในอัตราส่วน 4:1 และ 3:1 ทำการตรวจสอบแต่ละ fraction ที่ได้ด้วยเทคนิค ธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ถ้า fraction ที่ได้ออกมามีลักษณะคล้ายกันก็จะทำการรวมกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารทั้งหมด 14 fractions แสดงดังรูปที่ 2-4

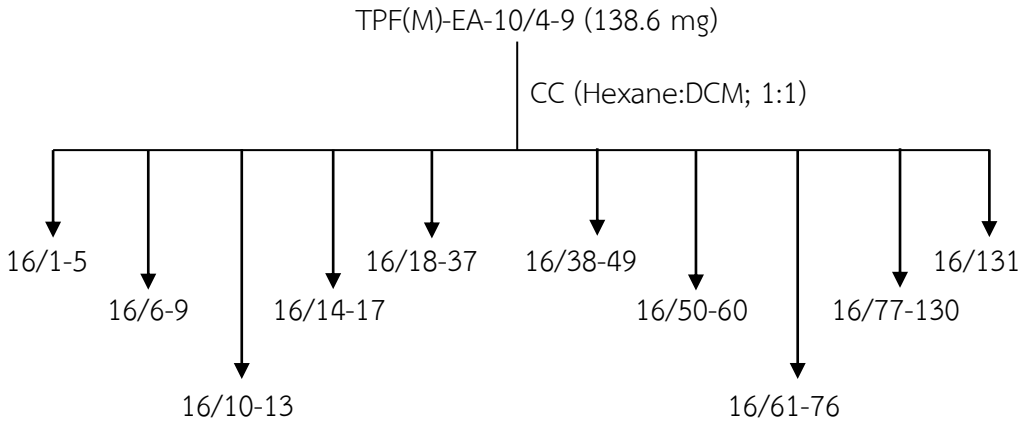


รูปที่ 2-4 การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-3/13-39 (4448.1 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย

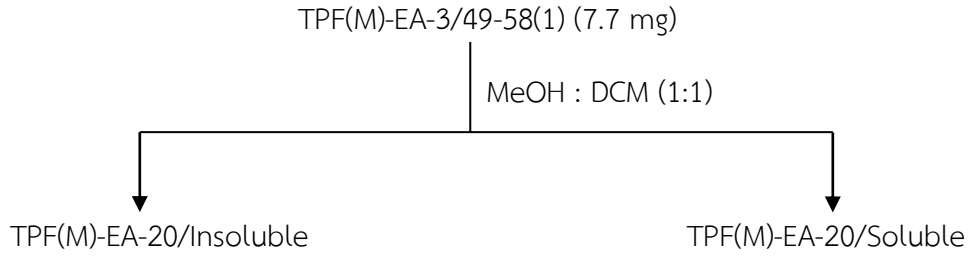
นำ fraction TPF(M)-EA-10/4-9 น้ำหนัก 138.6 mg ทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC) ใช้ซิลิกาเจล 60 (Merck, <0.063) เป็นตัวดูดซับ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์ 3.0 เซนติเมตร ทำการบรรจุซิลิกาเจลสูง 20.0 เซนติเมตร ใช้ระบบตัวทำละลายอินทรีย์ในการเคลื่อนสารคือ Hexane ต่อ Dichloro-methane ในอัตราส่วน 1:1 ทำการตรวจสอบแต่ละ fraction ที่ได้ด้วยเทคนิค ธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ถ้า fraction ที่ได้ออกมามีลักษณะคล้ายกันก็จะทำการรวมกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารทั้งหมด 10 fractions แสดงดังรูปที่ 2-5

นำ fraction TPF(M)-EA-3/49-58(1) น้ำหนัก 7.7 mg ทำการตกผลึกและล้างผลึก (Recrystallization) ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ได้สารออกมา 2 fractions คือ ส่วนที่ละลายได้ในตัวทำละลายผสม (Soluble) และส่วนที่เป็นของแข็งไม่ละลายในตัวทำละลายผสม (Insoluble) แสดงดังรูปที่ 2-6

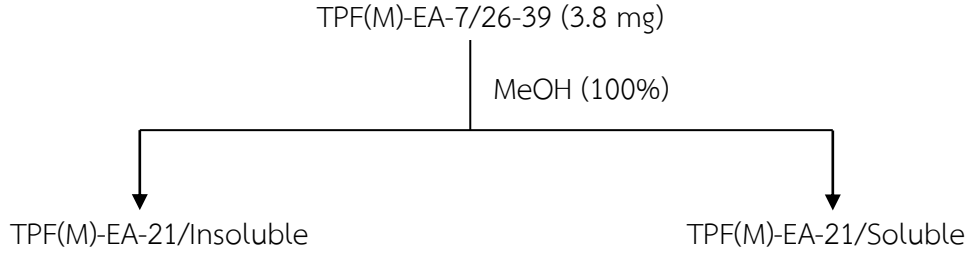
นำ fraction TPF(M)-EA-7/26-39 น้ำหนัก 3.8 mg ทำการตกผลึกและล้างผลึก (Recrystallization) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (100%) ได้ 2 fractions คือส่วนที่ละลายได้ในตัวทำละลายเมทานอล (Soluble) และส่วนที่เป็นของแข็งไม่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล (Insoluble) แสดงดังรูปที่ 2-7



รูปที่ 2-5 การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-10/4-9 (138.6 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย

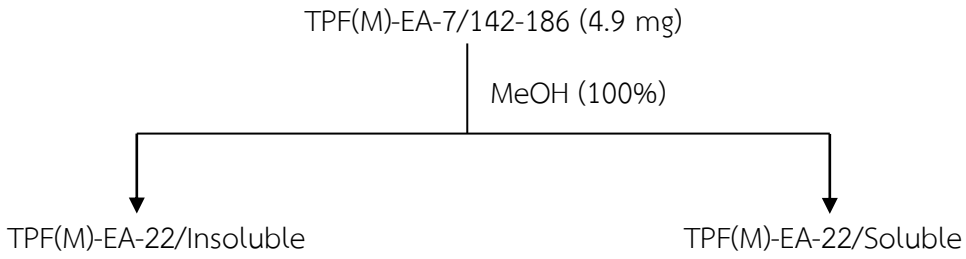


รูปที่ 2-6 การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-3/49-58(1) (7.7 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย



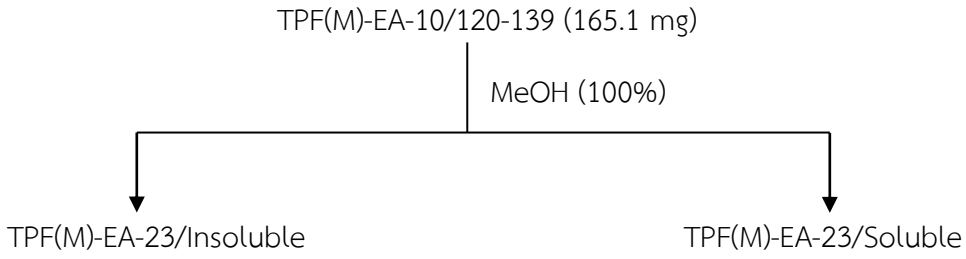
รูปที่ 2-7 การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-7/26-39 (3.8 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย

นำ fraction TPF(M)-EA-7/142-186 น้ำหนัก 4.9 mg ทำการตกผลึกและล้างผลึก (Recrystallization) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (100%) ได้ 2 fractions คือส่วนที่ละลายได้ในตัวทำละลายเมทานอล (Soluble) และส่วนที่เป็นของแข็งไม่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล (Insoluble) แสดงดังรูปที่ 2-8



รูปที่ 2-8 การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-7/142-186 (4.9 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย

นำ fraction TPF(M)-EA-10/120-139 น้ำหนัก 165.1 mg ทำการตกผลึกและล้างผลึก (Recrystallization) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (100%) ได้ 2 fractions คือส่วนที่ละลายได้ในตัวทำละลายเมทานอล (Soluble) และส่วนที่เป็นของแข็งไม่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล (Insoluble) แสดงดังรูปที่ 2-9



รูปที่ 2-9 การแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-10/120-139 (165.1 mg) ของดอกพุดร้อยมาลัย

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล (Results & Discussion)

3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

เมื่อนำดอกพุดร้อยมาลัยสด (2.0 กิโลกรัม) มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้านำส่วนที่บดละเอียดมาชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล (5.0 ลิตร)ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (ทำการแช่หมักซ้ำ 10 ครั้ง) หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายโดยใช้กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (Methanol extraction) หนัก 196.78 กรัม ดังตารางที่ 3-1

จากนั้นจะทำการสกัดแยกส่วนโดยอาศัยการละลายในตัวทำละลายที่มีความมีขั้วต่างๆ กัน (partition extraction) โดยการแบ่งสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยน้ำหนัก 150.00 กรัม มาละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 จากนั้นนำมาสกัดต่อด้วยเฮกเซนจะได้เป็น 2 ส่วน คือส่วนสกัดชั้นเฮกเซน (Hexane fraction) น้ำหนัก 4.90 กรัม และชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาทำการสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตทได้เป็น 2 ส่วน คือส่วนสกัดชั้นเอทิล อะซิเตท (Ethyl acetate fraction) น้ำหนัก 8.16 กรัม และชั้นน้ำ (Residual aqueous fraction) น้ำหนัก 136.94 กรัม ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 น้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากดอกพุดร้อยมาลัย

ส่วนสกัดหยาบ	น้ำหนัก	ร้อยละผลผลิต	ลักษณะทางกายภาพ
Methanol extract	196.78 g	9.84%	ของเหลวหนืดสีเขียว-ดำ
Hexane fraction	4.90 g	3.27%	ของเหลวหนืดสีเขียว-ดำ
Ethyl acetate fraction	8.16 g	5.44%	ของเหลวหนืดสีเขียว-ดำ
Residual aqueous fraction	136.94 g	91.29%	ของเหลวหนืดสีเขียว-ดำ

จากการสกัดสารจากดอกพุดร้อยมาลัยที่ซื้อมาจากตลาดหนองมน ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรีนั้นพบว่าเมื่อทำการสกัดโดยทำการแช่หมักดอกพุดร้อยมาลัยสดด้วยตัวทำละลายเมทานอลจะได้ร้อยละของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลร้อยละ 9.84 ซึ่งพบว่าได้สารออกมาปริมาณน้อย ก็อาจเป็นเพราะว่าเป็นตัวอย่างพืชสดซึ่งยังคงมีน้ำเป็นส่วนประกอบในพืชนั้น นอกจากนี้เมื่อได้นำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยมาทำการสกัดแยกส่วนโดยอาศัยการละลายในตัวทำละลายที่มีความมีขั้วต่างๆ กัน (partition extraction) เช่น เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ได้ร้อยละของส่วนสกัดชั้นต่างๆ เรียงลำดับจากน้อยไปมากดังนี้ Hexane fraction รองลงมาคือ Ethyl acetate fraction และมากที่สุดคือ Residual aqueous fraction ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีหรือสารทุติยภูมิของดอกพุดร้อยมาลัยนั้นเป็นสารที่ค่อนข้างมีขั้วสูง ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่เคยมีมาแล้วของพืชในสกุล *Tabernaemontana* ที่พบสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) ที่ค่อนข้างมีขั้วสูงเช่นกัน [5-8]

3.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลจากดอกพุดร้อยมาลัย โดยการแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอค ไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008) ได้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 3-2 โดยตรวจพบสารทุติยภูมิทั้งหมด 5 กลุ่มสาร คือแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์

ตารางที่ 3-2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลจากดอกพุดร้อยมาลัย

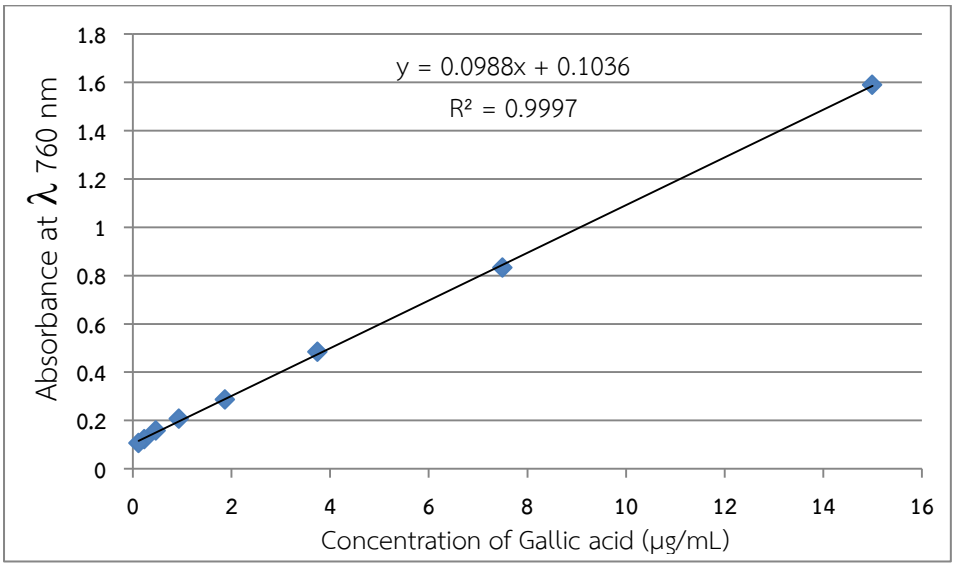
สารพฤกษเคมี	สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลดอกพุดร้อยมาลัย
แอลคาลอยด์	++
แอนทราควิโนน	-
ฟลาโวนอยด์	+
คูมาริน	-
แทนนิน	+++
เทอร์พีนอยด์	+++
สเตอรอยด์	++
ซาโปนิน	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	-

หมายเหตุ
- หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ
+ หมายถึง ตรวจสอบพบน้อย
++ หมายถึง ตรวจสอบพบปานกลาง
+++ หมายถึง ตรวจสอบพบมาก

จากผลการทดลองการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย พบสารทุติยภูมิทั้งหมด 5 กลุ่มสารคือ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และสเตอรอยด์ โดยพบสารในกลุ่มของแทนนินในปริมาณมาก โดยแทนนินนั้นเป็นสารทุติยภูมิที่มีขั้วค่อนข้างสูง ซึ่งผลดังกล่าวก็สอดคล้องกับร้อยละของสารสกัดหยาบในตารางที่ 4-1 ที่พบว่าองค์ประกอบทางเคมีหรือสารทุติยภูมิของดอกพุดร้อยมาลัยนั้นเป็นสารที่ค่อนข้างมีขั้วสูง นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ และเทอร์พีนอยด์ ในปริมาณที่มากอีกด้วย ซึ่งผลดังกล่าวก็ยังคงสอดคล้องกับรายงานที่เคยมีมาแล้วของพืชในสกุล *Tabernaemontana* ที่พบสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) เช่นกัน [5-8]

3.3 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

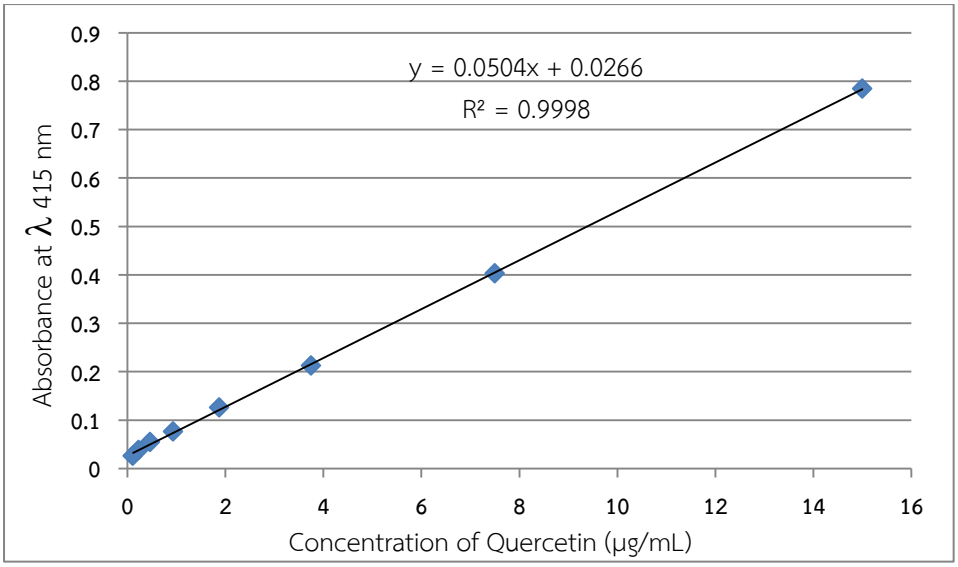
การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic Skerget และ Knez (2007) ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกรวมจะทำปฏิกิริยารวมกับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวม เกิดเป็น tungsten และ molybdenum ซึ่งให้สีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 0.0988x + 0.1036$, $R^2 = 0.9997$) ดังรูปที่ 3-1 และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยแสดงดังตารางที่ 3-3 โดยรายงานผลการทดลองในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบแห้ง 1 กรัม ($mgGAE.g^{-1}$)



รูปที่ 3-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ใช้ในการการหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

3.4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

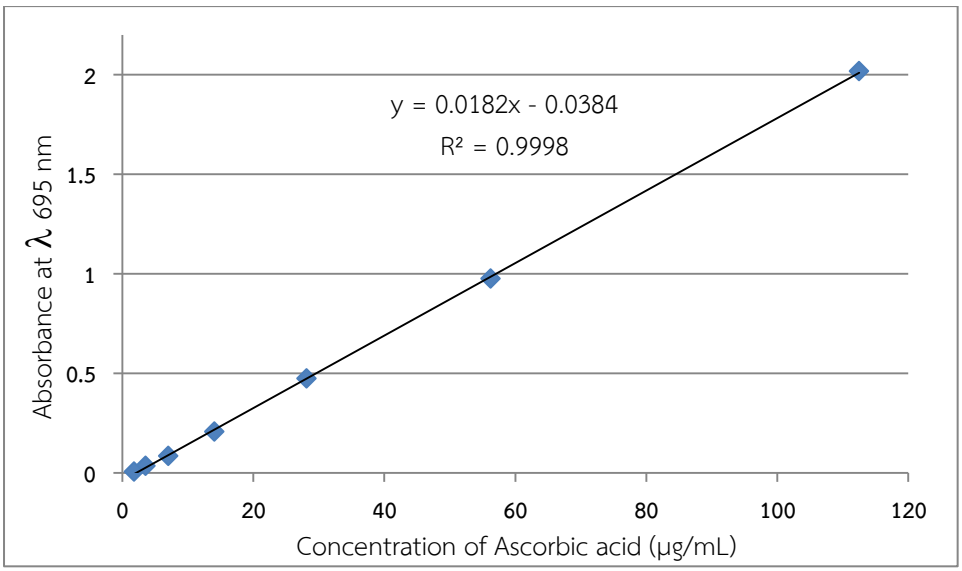
การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat และ Legret (1994) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์จะใช้ phenolic hydroxyl groups ทำปฏิกิริยากับ $AlCl_3$ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ($y = 0.0504x + 0.0266$, $R^2 = 0.9998$) ดังรูปที่ 3-2 และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยแสดงดังตารางที่ 3-3 โดยรายงานผลการทดลองในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบแห้ง 1 กรัม ($mgQE.g^{-1}$)



รูปที่ 3-2 กราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ใช้ในการการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

3.5 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant content)

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม ด้วยวิธี Phosphomolybdate colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Prieto, Pineda และ Aguilar (1999) โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ Phosphomolybdate reagent สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารต้านอนุมูลอิสระรวมเกิดเป็น molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 695 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานวิตามินซี (y = 0.0182x - 0.0384, R^2 = 0.9998) ดังรูปที่ 3-3 และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยแสดงดังตารางที่ 3-3 โดยรายงานผลการทดลองในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบแห้ง 1 กรัม (mgAAE.g^{-1})



รูปที่ 3-3 กราฟมาตรฐานวิตามินซี ใช้ในการการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (Total Antioxidant content)

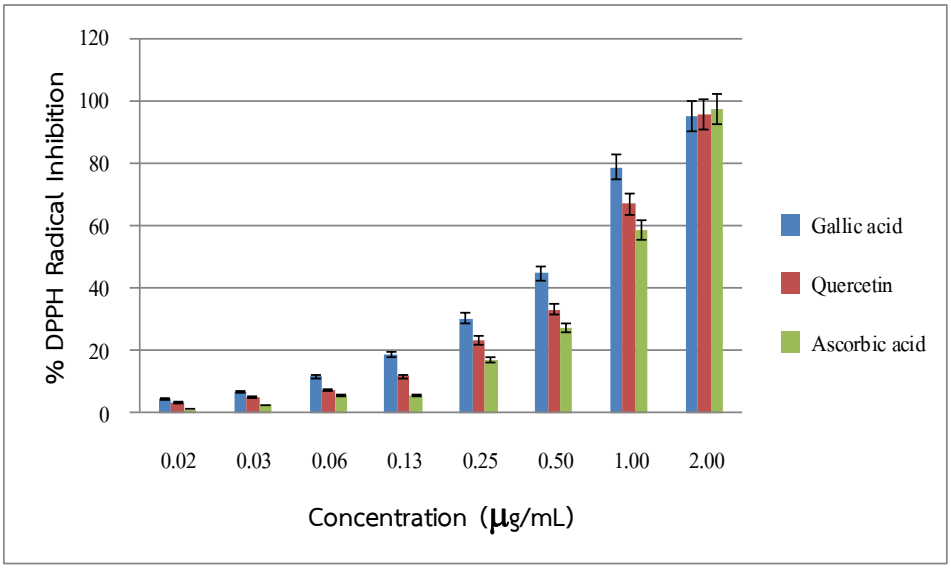
ตารางที่ 3-3 ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย

วิธีการทดสอบ	ผลการทดลอง
ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC)	60.59 ± 0.23 mgGAE.g^{-1}
ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC)	37.79 ± 0.22 mgQE.g^{-1}
ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAC)	31.87 ± 0.07 mgAAE.g^{-1}

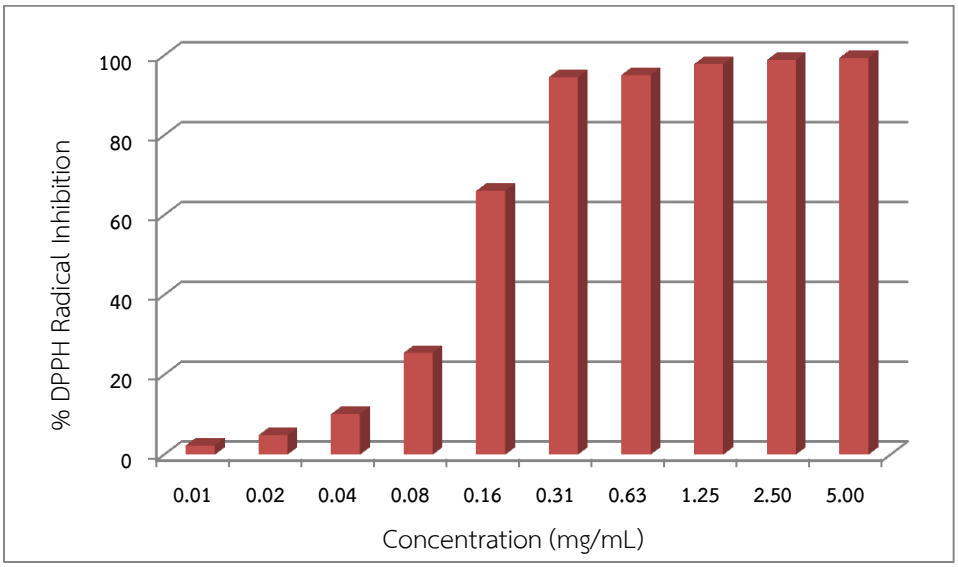
จากผลการทดลองตารางที่ 3-3 พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยมีปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (TAC) ในระดับที่ปานกลางถึงสูง เมื่อเปรียบเทียบสารมาตราฐานกรดแกลลิก เคอร์ซิติน และวิตามินซี ตามลำดับ ซึ่งผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นจะให้ผลสอดคล้องกับสารพฤษเคมีที่ตรวจพบคือสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ที่จัดเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลลิก รวมทั้งผลดังกล่าวก็ยังคงสอดคล้องกับรายงานที่เคยมีมาแล้วของพืชในสกุล *Tabernaemontana* ที่พบสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) เช่นกัน [5-8] และสารทุติยภูมิในกลุ่มดังกล่าวนั้นก็ยังคงออกฤทธิ์ในการยับยั้งปริมาณอนุมูลอิสระ โดยการทดสอบการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมจากสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยที่พบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวมเท่ากับ 31.87 ± 0.07 mgAAE.g^{-1} ซึ่งเป็นปริมาณค่อนข้างสูง

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli, และ Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) จะเป็นสารละลายสีม่วงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้สารละลายสีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อนและไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ได้ผลการทดลองของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 3-4 และรูปที่ 3-5



รูปที่ 3-4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging



รูปที่ 3-5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging

ตารางที่ 3-4 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ของสารมาตรฐานและสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย

สารที่ทดสอบ	ผลการทดลอง (IC_{50} ± S.D)
กรดแกลลิก (Gallic acid)	1.22 ± 0.03 µg/mL
เคอร์ซิติน (Quercetin)	2.69 ± 0.02 µg/mL
วิตามินซี (L-ascorbic acid)	2.48 ± 0.02 µg/mL
สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย	124.41 ± 0.46 µg/mL

จากผลการทดลองตารางที่ 3-4 พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ดีปานกลางแต่ก็ยังดีไม่เท่ากับสารมาตรฐานทั้ง 3 สารที่นำมาทดสอบ ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับสารพฤษเคมีเบื้องต้นที่ตรวจพบคือสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ที่ตรวจพบในปริมาณไม่มาก และสารพฤษเคมีที่ตรวจพบดังกล่าวนั้นจัดเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก จึงสามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ แต่ที่ผลการทดลองพบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้แต่ไม่ดีนั้นก็อาจจะเป็นผลมาจากสารพฤษเคมีที่ตรวจพบน่าจะเป็นสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) ส่วนมากดังรายงานก่อนหน้านี้ของพืชในสกุล *Tabernaemontana* โดยสารดังกล่าวเป็นสารประกอบฟีนอลิกก็จริงแต่จะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซีอิสระ (free hydroxyl group) น้อย จึงแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ไม่มากนัก

แต่จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) นั้นสามารถนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ส่วนประกอบหรือสารออกฤทธิ์ของยา หรือเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์สปา ที่ใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังที่มีพยาธิวิทยาของโรคที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (free radical) หรือที่เรียกว่าภาวะ Oxidative stress ได้อีกด้วย

3.7 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

จากการทดลองการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยการนำส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate fraction, TPF(M)-EA) น้ำหนัก 7.02 กรัม มาแยกด้วย Quick column chromatography (QCC) โดยใช้ซิลิกาเจล 60 (Merck, 0.063-0.200 mm) เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย Hexane ต่อ Ethyl acetate ในอัตราส่วนต่างๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยการเพิ่มตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่า (Gradient elution) ตามด้วยตัวทำละลายเมทานอล 100% ซึ่งจะใช้ตัวทำละลายชะครั้งละ 400 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ถ้าสารที่ได้ออกมามีลักษณะคล้ายกันก็จะทำการรวมกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารทั้งหมด 8 fractions ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3-5

ตารางที่ 3-5 น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารที่ได้จากการแยกส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทของดอกพุดร้อยมาลัย

Fraction	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
TPF(M)-EA-3/1-3	33.2	ของเหลวหนืดสีเขียว-เหลือง
TPF(M)-EA-3/4-12	309.1	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
TPF(M)-EA-3/13-39	4448.1	ของเหลวสีส้ม-เหลือง
TPF(M)-EA-3/40-48	223.0	ของเหลวหนืดสีเขียว-ดำ
TPF(M)-EA-3/49-58	715.5	ของเหลวหนืดสีแดง-ส้ม
TPF(M)-EA-3/49-58(1)	7.7	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-3/59	538.9	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล-ส้ม
TPF(M)-EA-3/60-61	1286.0	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล-ดำ

จากการแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-3/4-12 น้ำหนัก 309.1 mg ทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC) ใช้ซิลิกาเจล 60 (Merck, <0.063) เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยระบบตัวทำละลาย Hexane/Ethyl acetate ในอัตราส่วน 5:1 และ 3:1 ทำการตรวจสอบแต่ละ fraction ที่ได้ด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ถ้า fraction ที่ได้ออกมามีลักษณะคล้ายกันก็จะทำการรวมกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารทั้งหมด 23 fractions และสาร fraction ใดที่ตรวจสอบด้วย TLC และมีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์ จะนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3-6

ตารางที่ 3-6 น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-3/4-12

Fraction	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
TPF(M)-EA-7/1	1.5	ของเหลวหนืดไม่มีสี (AA-NMR55)
TPF(M)-EA-7/2	0.2	ของเหลวหนืดไม่มีสี
TPF(M)-EA-7/3-5	0.9	ของเหลวหนืดไม่มีสี (AA-NMR56)
TPF(M)-EA-7/6-7	0.7	ของเหลวหนืดไม่มีสี
TPF(M)-EA-7/8-15	5.6	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-7/16-18	1.7	ของเหลวหนืดสีเขียว
TPF(M)-EA-7/19-20	0.3	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-7/21-23	7.2	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-7/24-25	0.8	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-7/26-39	3.8	ของเหลวหนืดสีเหลือง
TPF(M)-EA-7/40-60	1.9	ของเหลวหนืดสีเหลือง (AA-NMR58)
TPF(M)-EA-7/61-73	1.5	ของเหลวหนืดสีเหลือง
TPF(M)-EA-7/74-90	1.4	ของเหลวหนืดสีเหลือง (AA-NMR59)
TPF(M)-EA-7/91-93	0.3	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-7/94-105	0.6	ของเหลวหนืดสีเหลือง (AA-NMR60)
TPF(M)-EA-7/106-110	0.7	ของเหลวหนืดสีเหลือง
TPF(M)-EA-7/111-121	6.4	ของเหลวหนืดสีเหลือง
TPF(M)-EA-7/122-124	1.6	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน (AA-NMR73)
TPF(M)-EA-7/125-130	5.8	ของเหลวหนืดสีเหลือง
TPF(M)-EA-7/131-141	2.3	ของเหลวหนืดสีเขียว
TPF(M)-EA-7/142-186	4.9	ของเหลวหนืดสีเขียว
TPF(M)-EA-7/187-223	5.2	ของเหลวหนืดสีเหลือง-ส้ม
TPF(M)-EA-7/224	281.1	ของเหลวหนืดสีส้ม

จากการแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-3/13-39 น้ำหนัก 4448.1 mg ทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC) ใช้ซิลิกาเจล 60 (Merck, <0.063) เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยระบบตัวทำละลาย Hexane/Ethyl acetate ในอัตราส่วน 4:1 และ 3:1 ทำการตรวจสอบแต่ละ fraction ที่ได้ด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ถ้า fraction ที่ได้ออกมามีลักษณะคล้ายกันก็จะทำการรวมกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารทั้งหมด 14 fractions และสาร fraction ใดที่ตรวจสอบด้วย TLC และมีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์ จะนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3-7

ตารางที่ 3-7 น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-3/13-39

Fraction	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
TPF(M)-EA-10/1-3	53.7	ของเหลวไม่มีสี (AA-NMR74)
TPF(M)-EA-10/4-9	138.6	ของเหลวไม่มีสี
TPF(M)-EA-10/10-30	213.6	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-10/31-40	49.8	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-10/41-69	14.7	ของเหลวหนืดสีเหลือง
TPF(M)-EA-10/70-100	11.8	ของเหลวหนืดสีเหลือง (AA-NMR75)
TPF(M)-EA-10/101-119	48.7	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-10/120-139	165.1	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
TPF(M)-EA-10/140-215	66.0	ของเหลวหนืดสีส้ม (AA-NMR76)
TPF(M)-EA-10/216-239	4.5	ของเหลวหนืดสีส้ม
TPF(M)-EA-10/240-290	10.0	ของเหลวหนืดสีส้ม (AA-NMR77)
TPF(M)-EA-10/291-330	6.6	ของเหลวหนืดสีส้ม
TPF(M)-EA-10/331-346	2.9	ของเหลวหนืดสีส้ม
TPF(M)-EA-10/347	573.0	ของเหลวหนืดสีส้ม

จากการแยกสารจาก fraction TPF(M)-EA-10/4-9 น้ำหนัก 138.6 mg ทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC) ใช้ซิลิกาเจล 60 (Merck, <0.063) เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยระบบตัวทำละลาย Hexane/Dichloromethane ในอัตราส่วน 1:1 ทำการตรวจสอบแต่ละ fraction ที่ได้ด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ถ้า fraction ที่ได้ออกมามีลักษณะคล้ายกันก็จะทำการรวมกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารทั้งหมด 10 fractions และสาร fraction ใดที่ตรวจสอบด้วย TLC และมีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์ จะนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3-8

ตารางที่ 3-8 น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-10/4-9

Fraction	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
TPF(M)-EA-16/1-5	8.2	ของเหลวไม่มีสี (AA-NMR78)
TPF(M)-EA-16/6-9	5.5	ของเหลวไม่มีสี (AA-NMR79)
TPF(M)-EA-16/10-13	6.8	ของเหลวไม่มีสี
TPF(M)-EA-16/14-17	6.1	ของเหลวไม่มีสี
TPF(M)-EA-16/18-37	17.1	ของเหลวไม่มีสี
TPF(M)-EA-16/38-49	5.3	ของเหลวไม่มีสี
TPF(M)-EA-16/50-60	1.2	ของเหลวไม่มีสี
TPF(M)-EA-16/61-76	0.7	ของเหลวไม่มีสี (AA-NMR80)
TPF(M)-EA-16/77-130	1.7	ของเหลวไม่มีสี
TPF(M)-EA-16/131	0.3	ของเหลวไม่มีสี

จากการนำ fraction TPF(M)-EA-3/49-58(1) น้ำหนัก 7.7 mg ลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ทำการตกผลึกและล้างผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและไดคลอโรมีเทน (1:1) ได้ 2 fractions และสารทั้ง 2 fractions เมื่อตรวจสอบด้วย TLC แล้วมีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์ จึงนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3-9

ตารางที่ 3-9 น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-3/49-58

Fraction	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
TPF(M)-EA-20/Insoluble	3.6	ของแข็งสีขาว (AA-NMR83)
TPF(M)-EA-20/Soluble	4.0	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน (AA-NMR84)

จากการนำ fraction TPF(M)-EA-7/26-39 น้ำหนัก 3.8 mg ลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง ทำการตกผลึกและล้างผลึกด้วยตัวทำละลายเมทานอล (100%) ได้ 2 fractions เมื่อตรวจสอบด้วย TLC แล้วพบว่า fraction TPF(M)-EA-21/Insoluble มีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์ จึงนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3-10

ตารางที่ 3-10 น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-7/26-39

Fraction	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
TPF(M)-EA-21/Insoluble	1.3	ของแข็งสีขาว (AA-NMR57)
TPF(M)-EA-21/Soluble	2.1	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน

จากการนำ fraction TPF(M)-EA-7/142-186 น้ำหนัก 4.9 mg ลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียว ทำการตกผลึกและล้างผลึกด้วยตัวทำละลายเมทานอล (100%) ได้ 2 fractions เมื่อตรวจสอบด้วย TLC แล้วพบว่า fraction TPF(M)-EA-22/Insoluble มีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์ จึงนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3-11

ตารางที่ 3-11 น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-7/142-186

Fraction	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
TPF(M)-EA-22/Insoluble	1.2	ของแข็งสีเหลืองอ่อน (AA-NMR85)
TPF(M)-EA-22/Soluble	3.6	ของเหลวหนืดสีเขียว

จากการนำ fraction TPF(M)-EA-10/120-139 น้ำหนัก 165.1 mg ลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน ทำการตกผลึกและล้างผลึกด้วยตัวทำละลายเมทานอล (100%) ได้ 2 fractions เมื่อตรวจสอบด้วย TLC แล้วพบว่า fraction TPF(M)-EA-23/Insoluble มีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์ จึงนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3-12

ตารางที่ 3-12 น้ำหนักและลักษณะทางกายภาพของสารจากการแยก fraction TPF(M)-EA-10/120-139

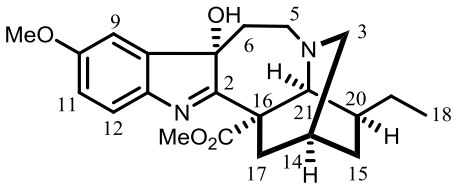
Fraction	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะทางกายภาพ
TPF(M)-EA-23/Insoluble	7.8	ของแข็งสีขาว (AA-NMR86)
TPF(M)-EA-23/Soluble	30.8	ของเหลวหนืดสีเหลือง

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยอาศัยกระบวนการทางโครมาโทรกราฟีต่างๆ พบว่าจากการแยกสารจาก fraction ต่างๆ สารที่มีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์เมื่อทำการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) แล้วนั้น จะนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ต่อไป และพบว่ามีทั้งหมด 18 fractions ที่ได้นำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วย NMR จากผลของ ^{1}H-NMR spectra พบว่าสารทั้ง 18 fractions น่าจะเป็นสารบริสุทธิ์แต่มีปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถทราบโครงสร้างที่แน่นอนได้ นอกจากนี้ก็ยังพบว่าจากผลของ ^{1}H-NMR spectra ของ TPF(M)-EA-7/122-124 (AA-NMR73) น้ำหนัก 1.6 mg มีปริมาณน้อยก็จริงแต่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า fraction อื่นๆ จึงทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพอื่นๆ เพิ่มเติมพบว่า

TPF(M)-EA-7/122-124 (AA-NMR73) น้ำหนัก 1.6 mg มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน (pale yellow oil) มีค่า R_f เท่ากับ 0.35 (Hexane:Ethyl acetate; 5:1) และเมื่อทำ TLC แล้วนำไปทำการย้อมด้วยสารผสมของ Anisaldehyde-H_2SO_4 และให้ความร้อนที่ 110 °C พบว่า TPF(M)-EA-7/122-124 นั้นปรากฏแถบสีเป็นสีเหลือง (yellow) [22]

ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra (400 MHz, $CDCl_3$) พบว่า δ 7.34 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-12), 6.89 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-9), 6.79 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-11), 3.80 (3H, s, 10-OCH_3), 3.69 (3H, s, 23-$COOCH_3$), 3.59 (1H, brs, H-21), 3.47 (1H, td, *J* = 14.8, 2.8 Hz, H-5-pro-*S*), 2.94 (1H, dd, *J* = 14.8, 3.6 Hz, H-6-pro-*S*), 2.71 (2H, m, H-3), 2.69 (1H, brd, *J* = 14.8 Hz, H-5-pro-*R*), 2.45 (1H, brd, *J* = 14.8 Hz, H-6-pro-*R*), 1.90 (1H, brd, *J* = 10.0 Hz, H-14), 0.84 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH_3-18).

จากการเปรียบเทียบข้อมูลลักษณะทางกายภาพต่างๆ และข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของ TPF(M)-EA-7/122-124 (AA-NMR73) กับข้อมูลลักษณะทางกายภาพต่างๆ และข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของสารที่มีชื่อว่า 7α-Hydroxyindoleninevoacangine จากรายงานของ Achenbach และคณะ (1997) [22] รวมทั้งรายงานของ Okuyama และคณะ (1992) [23] พบว่าตรงกัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า TPF(M)-EA-7/122-124 (AA-NMR73) เป็นสาร monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) ที่เคยมีรายงานมาแล้วที่มีชื่อว่า 7α-Hydroxyindolenine-voacangine โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 3-6



รูปที่ 3-6 โครงสร้างของสาร 7α-Hydroxyindoleninevoacangine ที่แยกได้จากดอกพุดร้อยมาลัย

จากผลการทดลองการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) เมื่อนำมาทำการสกัดแยกโดยอาศัยความมีขั้วของสารโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่างๆ กัน และได้นำชั้นที่มีขั้วปานกลางคือส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate fraction, TPF(M)-EA) มาทำการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทรกราฟีแบบต่างๆ และทำการพิสูจน์และวิเคราะห์องค์ประกอบที่ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ พบว่าพบสารในกลุ่ม monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) ที่เคยมีรายงานมาแล้วที่มีชื่อว่า 7α-Hydroxyindoleninevoacangine ดังนั้นข้อมูลนี้เป็นการยืนยันข้อมูลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่ตรวจพบสารทุติยภูมิในกลุ่มแอลคาลอยด์ และสาร 7α-Hydroxyindoleninevoacangine ก็เป็นสารในกลุ่มของประกอบสารประกอบฟีนอลิกแต่มีปริมาณหมู่ free hydroxyl (OH) น้อยจึงส่งผลทำให้ปริมาณฟีนอลิกรวมที่ตรวจพบในสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลมีน้อย นอกจากนี้คาดว่า 7α-Hydroxyindoleninevoacangine ก็น่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระอีกด้วย ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นพบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) และสาร monoterpenoid indole alkaloids ที่มีชื่อว่า 7α-Hydroxyindoleninevoacangine นั้นน่าจะสามารถนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ส่วนประกอบหรือสารออกฤทธิ์ของยา หรือเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางผลิตภัณฑ์สปา ที่ใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังที่มีพยาธิวิทยาของโรคที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (free radical) หรือที่เรียกว่าภาวะ Oxidative stress ได้อีกด้วย ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจากการทดลองการศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกพุดร้อยมาลัยน่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาสมุนไพรของไทยให้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น

4. สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกพุดร้อยมาลัย (*Tabernaemontana pandacaqui*) ซึ่งเป็นพืชในสกุล *Tabernaemontana* วงศ์ตีนเป็ด (Apocynaceae) ที่พบในประเทศไทยและมีการใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทางด้านเภสัชวิทยาและตามตำราแพทย์แผนไทยที่ว่า เนื้อไม้ของต้นพุดร้อยมาลัยใช้เป็นยาลดไข้ และน้ำจากต้นพุดร้อยมาลัยใช้เป็นยาขับพยาธิ รวมทั้งงานวิจัยต่างๆ ที่มีการนำส่วนต่างๆ ของพุดร้อยมาลัยไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิเช่น ในปี ค.ศ. 1989 Taesotikul และคณะ [5] ได้รายงานการศึกษาสารสกัดชั้นเอทานอลจากใบและดอกของพุดร้อยมาลัยพบว่าสารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ต่อระบบหลอดเลือดและหัวใจ และในปี ค.ศ. 1998 คณะผู้วิจัยดังกล่าว [6] ได้รายงานการศึกษาส่วนสกัดแอลคาลอยด์จากลำต้นของ *T. pandacaqui* ต่อความดันโลหิตและการเต้นของหัวใจในหนู พบว่าส่วนสกัดแอลคาลอยด์ดังกล่าวมีฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตได้ ในปีเดียวกันคณะผู้วิจัยได้ [7] รายงานการศึกษาส่วนสกัดหยาบแอลคาลอยด์จากลำต้นของ *T. pandacaqui* ต่อระบบประสาทส่วนกลางในสัตว์ทดลอง พบว่าส่วนสกัดแอลคาลอยด์ดังกล่าวส่งผลต่อภาวะต่างๆ ของระบบประสาทส่วนกลางในหนู รวมทั้งในปี ค.ศ. 2003 คณะผู้วิจัยดังกล่าว [8] ได้รายงานการศึกษาสารสกัดชั้นเอทานอลจากลำต้นของ *T. pandacaqui* พบว่าสารสกัดเอทานอล มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ช่วยลดไข้และแก้ปวด ได้อีกด้วย แต่ยังไม่มีรายงานองค์ประกอบทางเคมีจากพุดร้อยมาลัยเลย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกพุดร้อยมาลัย (*Tabernaemontana pandacaqui*) โดยเมื่อนำดอกพุดร้อยมาลัยสด (2.0 กิโลกรัม) มาทำการสกัดโดยการแช่หมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่อุณหภูมิห้อง ได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลน้ำหนัก 196.78 กรัม หลังจากนั้นนำไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามลำดับความมีขั้วคือเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท พบว่าได้ร้อยละของผลผลิตเรียงลำดับดังนี้คือ ส่วนสกัดเฮกเซน (3.27%) ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท (5.44%) และส่วนสกัดชั้นน้ำ (91.29%) นอกจากนี้นำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (Methanol extract) ไปทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบสารทุติยภูมิเบื้องต้นทั้งหมด 5 กลุ่มสาร คือ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และ สเตอรอยด์ รวมทั้งได้นำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยไปทำการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวม (60.59 ± 0.23 mgGAE.g^{-1}) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (37.79 ± 0.22 mgQE.g^{-1}) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระรวม (31.87 ± 0.07 mgAAE.g^{-1}) อีกด้วย ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีปานกลาง (IC_{50} = 124.41 ± 0.46 μg/mL) แต่ก็ยังดีไม่เท่ากับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) เคอร์ซิติน (Quercetin) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) ที่นำมาทดสอบ

จากการศึกษาการสกัด การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยอาศัยกระบวนการทางโครมาโทรกราฟีต่างๆ พบว่าจากการแยกสารจาก fraction ต่างๆ สารที่มีลักษณะคล้ายกับสารบริสุทธิ์ เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) แล้วนั้นจะนำไปตรวจสอบและวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) พบสารบริสุทธิ์ในกลุ่มของ monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) ที่เคยมีรายงานมาแล้วที่มีชื่อว่า 7α-Hydroxyindoleninevoacangine จากองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากพุดร้อยมาลัยเป็นการยืนยันข้อมูลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่ตรวจพบสารทุติยภูมิในกลุ่มแอลคาลอยด์ และสาร 7α-Hydroxyindolenine-voacangine ก็เป็นสารในกลุ่มของประกอบสารประกอบฟีนอลิกแต่มีปริมาณหมู่ free hydroxyl (OH) น้อยจึงส่งผลทำให้ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ที่ตรวจพบในสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลมีน้อย นอกจากนี้คาดว่า 7α-Hydroxy-indoleninevoacangine ก็น่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระอีกด้วย

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้นพบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของดอกพุดร้อยมาลัย (*T. pandacaqui*) และสาร monoterpenoid indole alkaloids ที่มีชื่อว่า 7α-Hydroxyindoleninevoacangine นั้นน่าจะสามารถนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ส่วนประกอบหรือสารออกฤทธิ์ของยา หรือเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์สปา ที่ใช้ในการรักษา ป้องกัน และลดปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อสุขภาพและภาวะทุพโภชนาการที่นำไปสู่การเจ็บป่วยเรื้อรังที่มีพยาธิวิทยาของโรคที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (free radical) หรือที่เรียกว่าภาวะ Oxidative stress ได้อีกด้วย ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจากการทดลองการศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกพุดร้อยมาลัยน่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาสมุนไพรของไทยให้มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้น

ข้อเสนอแนะ การทำวิจัยในขั้นตอนต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

งานวิจัยดังกล่าวนี้ที่เสร็จล่าช้าเกินกว่ากำหนดเวลามีปัจจัยอยู่หลายประการแต่ประการที่สำคัญคือเครื่องมือ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR) ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการตรวจสอบวิเคราะห์และยืนยันโครงสร้างสารที่แยกได้นั้นได้เสียมาประมาณ 7 เดือน อันเนื่องจากติดขั้นตอนการขออนุมัติซ่อมจากภาควิชาเคมี เพราะค่าซ่อมและค่าดูแลรักษาเครื่องมีราคาแพง โดยในการนี้ข้าพเจ้าก็ได้แก้ปัญหาโดยการส่งสารไปวิเคราะห์ที่หน่วยงานภายนอก แต่ก็ต้องใช้ระยะเวลาดำเนินการค่อนข้างนาน ทำให้การยืนยันโครงสร้างของสารที่แยกออกมาได้เป็นไปด้วยความล่าช้า สำหรับปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ไม่เพียงแต่ทุนวิจัยเรื่องนี้แต่เกิดขึ้นกับทุนวิจัยของคณะวิทยาศาสตร์เกือบทุกเรื่องที่เกี่ยวข้องกับการยืนยันโครงสร้างสารด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR) ผู้ทำวิจัยจึงใคร่ขอความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยสนับสนุนหรือจัดหางบประมาณในการจัดซื้อหรือซ่อมแซมเครื่องมือขนาดใหญ่ที่สำคัญในการทาวิจัยแต่มีราคาแพง ตลอดจนสนับสนุนงบประมาณในการดูแลรักษาเครื่องมือให้ใช้งานได้ในสภาพดีต่อไป

ในการทาวิจัยในปีที่ 2 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559) จะดำเนินการโดยจะทำการแยก และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบที่เหลือต่อไปเพื่อการค้นพบองค์ประกอบทางเคมีชนิดต่างๆ และจะนำองค์ประกอบทางเคมีที่มีปริมาณมากพอไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ และนำองค์ประกอบทางเคมีที่มีปริมาณมากพอและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีไปทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมี เพื่อให้ได้องค์ประกอบทางเคมีที่เป็นสารอนุพันธ์ต่างๆที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมากขึ้น รวมทั้งจะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อีกด้วยโดยเฉพาะฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับผู้สูงอายุ เช่นฤทธิ์ในการยับยั้งโรคอัลไซเมอร์และฤทธิ์ในการยับยั้งเบาหวานเป็นต้น

บรรณานุกรม

[1] Leeuwenberg A. J. M. **1991**. *A revision of Tabernaemontana*. The old world species. Part I, Royal Botanic Gardens, kew:whitstabeelitho Ltd., Whitstable, UK.

[2] Phu-pattanaphong L. **1979**. *Thai medicinal plants*, Part 2. Bangkok: New Thammda Publishing, 113-116.

[3] Smitinan, T. **2014**. *Thai plant names* (botanical names-vernacular names). Bangkok, Thailand: Royal Forest Department, 141.

[4] Pratchayasakul, W.; Pongchaidecha, A.; Chattipakorn, N.; Chattipakorn, S. **2008**. Ethnobotany and ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricate*. *Indian J. Med. Res.*, 127, 317-335.

[5] Taesotikul, T.; Panthong, A.; Kanjanapothi, D.; Verpoorte, R.; Scheffer, J. J. C. **1989**. Cardiovascular effects of *Tabernaemontana pandacaqui*. *J. Ethnopharmacol*. 27, 107-119.

[6] Taesotikul, T.; Panthong, A.; Kanjanapothi, D.; Verpoorte, R.; Scheffer, J. J. C. **1998**. Cardiovascular activity of the crude alkaloidal fraction from *Tabernaemontana pandacaqui* in the rat. *J. Ethnopharmacol*. 59, 131-137.

[7] Taesotikul, T.; Panthong, A.; Kanjanapothi, D.; Verpoorte, R.; Scheffer, J. J. C. **1998**. Neuropharmacological activities of the crude alkaloidal fraction from stems *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. *J. Ethnopharmacol*. 62, 229-234.

[8] Taesotikul, T.; Panthong, A.; Kanjanapothi, D.; Verpoorte, R.; Scheffer, J. J. C. **2003**. Anti-inflammatory, antipyretic and antinociceptive activities of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. *J. Ethnopharmacol*. 84, 31-35.

[9] www.il.mahidol.ac.th/e-media/plants/webcontent3/interactive_key/key/describ/pud-roi.htm

[10] O'Connor, S. E.; Maresh, J. J. **2006**. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Natural Product Reports*, 23, 532-547.

[11] Okuyama, E.; Gao, L.- H.; Yamazaki, M. **1992**. Analgesic components from Bornean medicinal plants, *Tabernaemontana pauciflora* Blume and *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2075-2079.

[12] Ingkaninan, K.; Changwijit, K.; Suwanborirux, K. **2006**. Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 847-852.

[13] Chaiyana, W.; Schripsema, J.; Ingkaninan, K.; Okonogi, S. **2013**. 3'-R/S-Hydroxyvoacamine, a potent acetylcholinesterase inhibitor from *Tabernaemontana divaricata*. *Phytomedicine* 20, 543-548.

[14] Thind, T. S.; Agrawal, S. K.; Saxena, A. K.; Arora, S. **2008**. Studies on cytotoxic, hydroxyl radical scavenging and topoisomerase inhibitory activities of extracts of *Tabernaemontana divaricata* (L.) R.Br. ex Roem. and Schult. *Food and Chemical Toxicology.* 46, 2922-2927.

[15] Zhang, H.; Li, D.; Cao, H.; Lu, X.; Chu, Y.; Bai, Y.; Jin, Y.; Peng, S.; Dou, Z.; Hua, J. **2013**. Conophylline Promotes the Proliferation of Immortalized Mesenchymal Stem Cells Derived from Fetal Porcine Pancreas (iPMSCs). *Journal of Integrative Agriculture*. 12, 678-686.

[16] Bao, M.- F.; Yan, J.- M.; Cheng, G.- G.; Li, X.- Y.; Liu, Y.- P.; Li, Y.; Cai, X.- H.; Luo, X.- D. **2013**. Cytotoxic indole alkaloids from *Tabernaemontana divericata*. *J. Nat. Prod*. 76, 1406-1412.

[17] Ayoola, G. A.; Coker,H. A. B.; Adsegun, S. A.; Adepoju-Bello, A. A.; Obaweya, K.; Ezennia, E. C.; Atangbayila, T. O. **2008**. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1019-1024.

[18] Majhenic, L.; Skerget, M.; Knez, Z. **2007**. Antioxidant and antimicrobial activity of quarana seed extracts. *Food Chemistry*. 104(3), 1258-1268.

[19] Arvouet-Grand, A.; Vennat, B.; Pourrat, A.; Legret, P. **1994**. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. de Pharmacie de Belgique.* 49, 462-468.

[20] Prieto. P.; Pineda, M.; Aguilar, M. **1999**. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269, 337-341.

[21] Braca, A.; Sortino, C.; Politi, M.; Morelli, I.; Mendez, J. **2002**. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J. Ethanopharmacol.*, 79, 379-381.

[22] Achenbach, H.; Benirschke, M.; Torrenegra, R. **1997**. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. *Phytochemistry*, 45, 325-335.

[23] Okuyama, E.; Gao, L.-H.; Yamazaki, M. **1992**. Analgesic components from Bornean medicinal plants, *Tabernaemontana pauciflora* Blume and *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2075-2079.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Output)

1. Anan Athipornchai, Apinya Phatthanangam, Rungnapha Saeeng and Apichart Suksamrarn. Bioactive compounds from the flowers of *Tabernaemontana pandacaqui* (Manuscript in preparation).
2. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาโท สาขาเคมีศึกษา จำนวน 3 คน คือ Mr.Xayphone Thatavong, นางสาวนงลักษณ์ ห้วยหงส์ทอง และนางสาวนิสา จุลโพธิ์ ระดับปริญญาตรี สาขาเคมี จำนวน 1 คน คือ นางสาวอภิญญา พัฒนงาม