องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของเนระพูสีไทย

สมฤทัย พาที

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มีนาคม 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ สมฤทัย พาที ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....จเร จรัสจรูญพงศ์..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จเร จรัสจรูญพงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....Sopanath..... ประธาน

(ดร. โสภณัฐ คงศรีประพันธุ์)

.....จเร จรัสจรูญพงศ์..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จเร จรัสจรูญพงศ์)

..... กรรมการ

(ดร.อนันต์ อธิพรชัย)

.....กล่าวขวัญ ศรีสุข..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ ..21.. เดือน ..มีนาคม.. พ.ศ. 2560

การวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษา
โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์
จากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ระดับปริญญาโท ภาคพิเศษ (ฤดูร้อน) ปีการศึกษา 2557

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.จเร จรัสจรูญพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และดร. อนันต์ อธิพรชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัยพร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษา และทุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐมทุกท่าน ที่ช่วยปลูกฝังในเรื่องของความรู้วิชาเคมี และคุณลักษณะของการเป็นนักวิทยาศาสตร์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อบุตรดา พาที คุณแม่สำเภา ช่อจำปี และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

สมฤทัย พาที

57920071: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: เนระพูสีไทย/พฤกษเคมี/ สารต้านอนุมูลอิสระ/ เอนไซม์ไทโรซิเนส

สมฤทัย พาที: องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของเนระพูสีไทย (CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Tacca chantrieri* RHIZOME) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จเร จรัสจรูญพงศ์, Ph.D., อนันต์ อธิพรชัย, Ph.D. 103 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ทางชีวภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากการกลั่นด้วยน้ำ จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri*) ผลการศึกษาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบสารพฤกษเคมี จำนวน 6 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต และเมทานอล และน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี Folin-Ciocaltue โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน และวิธี aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric โดยใช้เคอร์ซิติน (Qurecetin) เป็นสารมาตรฐาน ตามลำดับ พบว่าสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (5.20±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม) ขณะที่สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (33.64±1.27 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging พบว่าส่วนสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ที่ความเข้มข้น 650 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (58.70±0.01%) และจากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยใช้ *L*-DOPA เป็นซับสเตรต พบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทุกส่วนสกัดหยาบไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบ กรดไมริสติกในสารสกัดหยาบเฮกเซน ของผสมระหว่าง เบต้า-ซิโตสเตอรอล และ สติกมาสเตอรอล พบในสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน โดยพิสูจน์โครงสร้างสารที่แยกได้ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโคปี

57920071: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: *Tacca chantrieri* / PHYTOCHEMICAL SCREENING /
ANTIOXIDANT ACTIVITY / ANTI-TYROSINASE ACTIVITY

SOMRUTHAI PATEE: CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOLOGICAL ACTIVIES OF *Tacca chantrieri* RHIZOME. ADVISORY COMMITTEE: JARAY JARATJAROONPHONG, Ph.D., ANAN ATHIPORNCHAI, Ph.D. 103 P. 2017.

The objective of this research was to study was performed to evaluate the phytochemical screening, total phenolic content, flavonoid content, biological activities and chemiscal constituents of hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol extracts and essential oils by water distillation from *Tacca chantrieri* rhizome. The results of this study showed that six groups of phytochemicals were observed including flavonoids, coumarins, saponins, terpenoids, steroids and cardiac glycosides. Total phenolic and flavonoid content of all extracts of *T. chantrieri* were evaluated by Folin-Ciocaltue method using gallic acid as chemical standard and aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric method using Qurecetin as chemical standard, respectively. The results indicated that the ethyl acetate extract contained the highest total phenolic content (5.20±0.02 mgGAE.g^{-1}). The methanol extract showed the highest total flavonoid content (33.64±1.27 mgQE.g^{-1}). The highest antioxidant activity at 625 μg/mL using DPPH free radical scavenging method was obtained by *T. chantrieri* ethyl acetate extract (58.70 ± 0.01%). All extracts of *T. chantrieri* were evaluated anti-tyrosinase activity using *L*-DOPA substrate and kojic acid as standard. Unfafunately, all extracts of this plant at concentration of 1,000 μg/mL showed no inhibitory activity. The isolation and structure elucidation of hexane, dichloromethane and ethyl acetate extracts from *T. chantrieri* were also studied. The results showed that myristic acid was isolation from hexane extracts. The mixture of beta-sitosterol and sitgmasterol observed from dicholomethane extracts. All isolation compounds were characterized by spectroscopic techniques.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของเนระพูสีไทย (Tacca chantrieri Andre.) 4

2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร 5

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี 8

2.4 การหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 9

2.5 กลุ่มสารสำคัญในพืชสมุนไพร 11

2.6 การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) 16

2.7 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ 22

2.8 เอนไซม์ไทโรซิเนส และกระบวนการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 22

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 24

3 วิธีดำเนินการวิจัย 30

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี 30

3.2 แผนการดำเนินงานวิจัย 32

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย 34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4 ผลการทดลองและอภิปราย 41

4.1 การสกัด 41

4.2 การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น 42

4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) 44

4.4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content: TFC) 45

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging 47

4.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Ttyrosinase Aassay) โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต 50

4.7 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเหง้าเนระพูสีไทย 52

5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 65

5.1 สรุปผลการวิจัย 65

5. 2 ข้อเสนอแนะ 67

บรรณานุกรม 68

ภาคผนวก 71

ประวัติย่อของผู้วิจัย 103

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 ชนิดนิวเคลียร์แมกเนทิกเรโซแนนซ์ 2 มิติ 10

2-2 ผลกระทบของ *Tacca chantrieri* สารสกัด (TCE) บนแผลในกระเพาะอาหารในหนู ... 25

4-1 น้ำหนักสารสกัดหยาบ และร้อยละผลผลิต (%Yield) และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทย 41

4-2 ผลการทดสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของเนระพูสีไทย 43

4-3 ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเนระพูสีไทย ... 45

4-4 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content: TFC) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเนระพูสีไทย 46

4-5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) 47

4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากเหง้าเนระพูสีไทย 49

4-7 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิกโดยใช้ *L*-DOPA เป็นซับสเตรต 51

4-8 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ *L*-DOPA เป็นซับสเตรต 52

4-9 ผลการแยกสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (TC-hexane) จำนวน 723.9 มิลลิกรัม 53

4-10 ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง myristic acid (IV-1) โดยเทคนิค ^{1}H NMR เปรียบเทียบกับสาร myristic acid ที่เคยรายงาน 54

4-11 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสาร TC-hexane-F5s โดยเทคนิค IR 55

4-12 ผลการแยกสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (TC-CH_2Cl_2) จำนวน 801.9 มิลลิกรัม 56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4-13 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร TC-CH_2Cl_2-F2s, TC-CH_2Cl_2-F3s, TC-CH_2Cl_2-F4s, TC-CH_2Cl_2-F6s, TC-CH_2Cl_2-F7s, TC-CH_2Cl_2-F8s, TC-CH_2Cl_2-F9s, TC-CH_2Cl_2-F11s, TC-CH_2Cl_2-F15s, TC-CH_2Cl_2-F17s, TC-CH_2Cl_2-F19s, และ TC-CH_2Cl_2-F20s 58

4-14 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของผสมระหว่าง beta-sitosterol (IV-2) และ Sitgmasterol (IV-3) โดยเทคนิค 1H NMR 60

4-15 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสาร TC- CH_2Cl_2-F17s โดยเทคนิค IR 61

4-16 ผลการแยกสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (TC- EtOAc) จำนวน 723.9 มิลลิกรัม 63

ก-1 น้ำหนักของเหง้าเนระพูสีไทย น้ำหนักสารสกัดหยาบ และร้อยละผลผลิต 72

ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) 75

ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม ของสารสกัดหยาบจากเนระพูสีไทย 76

ค-3 ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเนระพูสีไทย... 77

ง-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 4150 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin) 78

ง-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทย..... 80

ง-3 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) ของสารสกัดหยาบชั้น เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจาก เหง้าเนระพูสีไทย..... 81

จ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของ สารมาตรฐานกรดแกลลิก 83

จ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ เนระพูสีไทยชั้นเฮกเซน 84

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

จ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นไดคลอโรมีเทน 84

จ-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นเอทิลอะซิเตต 85

จ-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นเมทานอล 85

จ-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นน้ำมันหอมระเหย 86

จ-7 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ 88

ฉ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต 91

ฉ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต 91

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 เนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri* Andre.) 4

2-2 เครื่องโครมาโททรอน (Chromatotron) 9

2-3 โครงสร้างของสารกลุ่มอัลคาลอยด์ atropine **(II-1)** ephedrine **(II-2)** N-formylnornuciferine **(II-3)** และ N-formylannonaine **(II-4)** 12

2-4 โครงสร้างของสารกลุ่มคาร์ดิเอ็ก ไกลโคไซด์ oleandrin **(II-5)** 13

2-5 โครงสร้างของสารกลุ่มแอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ barbaloin **(II-6)** และ sennoside-B **(II-7)** 13

2-6 โครงสร้างของสารกลุ่มซาโบนิน ไกลโคไซด์ dioscin **(II-8)** และ Madecassoside **(II-9)** 14

2-7 โครงสร้างของสารกลุ่มไซยาโจนิก กลัยโคไซด์ lotaustralin **(II-10)** 15

2-8 โครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ daidzein-7-*O*-glucuronide **(II-11)** และ luteolin-7-*O*-glucuronide **(II-12)** 15

2-9 โครงสร้างของสารกลุ่มคูมาริน ไกลโคไซด์ aesculin **(II-13)** 16

2-10 ปฏิกิริยาระหว่าง 2 , 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl กับ อิเล็กตรอนในโมเลกุล RH..... 22

2-11 ขบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินจากไทโรซีน 23

2-12 โครงสร้างของ Saponin **(II-14a-c)** และ **(II-15a-b)** 26

2-13 โครงสร้างของ Chantriolide A **(II-16a)** และ Chantriolide B **(II-16b)** 27

2-14 โครงสร้างของ Giycosides of the campesterol derivative **(II-17a -II-17h)**..... 29

2-15 โครงสร้างของ Evelynin **(II-18)**..... 29

3-1 แผนผังขั้นตอนการสกัดเหง้าเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต และเมทานอล ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น และ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 32

3-2 แผนผังขั้นตอนการกลั่นเหง้าเนระพูสีไทยโดยใช้น้ำ (water and Stem distillation) การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น และ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 33

4-1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด 42

4-2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร กับ ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) 44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน 46

4-4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก 48

4-5 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ 50

4-6 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิกโดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต 51

4-7 โครมาโตแกรมของสาร TC-hexane-F5s ได้จากเครื่อง NMR โดยเทคนิค ^{1}H NMR 54

4-8 โครมาโตแกรมของสาร TC-hexane-F5s ได้จากเครื่อง IR 55

4-9 โครงสร้าง myristic acid **(IV-1)** 55

4-10 สเปกตรัมของสาร TC-CH_2Cl_2-F2s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR 59

4-11 สเปกตรัมของสาร TC-CH_2Cl_2-F3s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 59

4-12 สเปกตรัมของสาร TC-CH_2Cl_2-F17s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 60

4-13 สเปกตรัมของสาร TC-CH_2Cl_2-F17s ได้จากเครื่อง IR 61

4-14 โครงสร้างของ beta-sitosterol **(IV-2)** และSitgmasterol **(IV-3)** 62

4-15 สเปกตรัมของสาร TC-EtOAc-F6s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 64

4-16 สเปกตรัมของสาร TC-EtOAc-F6s ได้จากเครื่อง IR 64

ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) 75

ง-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน 79

จ-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน 86

จ-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตต 87

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

จ-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล 87
ช-1 สเปกตรัมของสารสาร TC-haxane-F5s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR..... 92
ช-2 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F2s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 92
ช-3 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F3s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 93
ช-4 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F6s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 93
ช-5 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F7s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 94
ช-6 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F8s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 94
ช-7 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F9s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 95
ช-8 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F11s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR ... 95
ช-9 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F15s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR ... 96
ช-10 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F16s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR ... 96
ช-11 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F17s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR ... 97
ช-12 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F19s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR ... 97
ช-13 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F20s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR ... 98
ช-14 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F6-3 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 98
ช-15 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F6-4 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 99
ช-16 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F7-2 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR 99
ช-17 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F11-2 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR .. 100
ช-18 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F13-2 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR .. 100
ช-19 สเปกตรัมของสารสาร TC-Hexane-F5s ได้จากเครื่อง IR 101
ช-20 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH2Cl2-F17s ได้จากเครื่อง IR 101
ช-21 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F6-3 ได้จากเครื่อง IR..... 102

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนระพูสีไทย หรือค้างคาวดำ (Bat flower) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tacca chantrieri* วงศ์ Taccaceae เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี เจริญเติบโตได้ดี ในที่ที่มีอากาศเย็นชื้น แสงแดดร่มรำไร ลักษณะทั่วไปของต้นเนระพูสีไทย มีความสูงประมาณ 30-50 เซนติเมตร มีเหง้าใต้ดิน รูปทรงกระบอก มีการนำมาใช้ในรูปของยาสมุนไพรแผนโบราณ โดยมีฤทธิ์แก้เบื่อเมา แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย แก้ลิ้นคอเปื่อย แก้ไอ ปวดท้อง มะเร็ง โรคกระเพาะ บำรุงร่างกาย แก้โรคความดันต่ำบำรุงกำลังทางเพศ และ แก้ผดผื่นคัน (ก่องกานดา ชยามฤต, 2557) การศึกษาพบว่าในส่วนเหง้าของเนระพูสีไทยออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น สารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการผลิตไนตริก ออกไซด์ เท่ากับ 23.5±10.6 และ 17.1±4.6 ตามลำดับ และทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดของพืชโดยวิธี MTT ส่วนสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ 91.2±4.7 และ 89.9±4.8 ตามลำดับ (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2557) สารสกัดเอทานอล ขนาด 125 และ 500 มิลลิกรัม ออกฤทธิ์ระงับการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในทุกการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.01$) และสามารถยับยั้งการหลั่งกรดได้บางส่วน (ไชยยง รุจจนเวท และดวงพร อมรเลิศพิศานต์, 2556) ใช้เทคนิคการสกัดแบบซุปเปอร์คริทิคอลฟลูอิด ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ กับเมทานอล ได้สารใหม่ Evelynin ซึ่งออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งจำนวน 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งผิวหนัง ชนิด MDA-MB-435, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231, เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก เซลล์มะเร็งปากมดลูก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.1, 3.9, 4.6 และ 7.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Jiangnan et al., 2010) สารสกัดอะซิโตน และเอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกินอาหารของหนอนใยผักได้ แต่ต้องใช้ในอัตราความเข้มข้นที่สูง โดยสารสกัดอะซิโตนออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.2% (โดยน้ำหนัก/ปริมาตร) และสารสกัดแอลกอฮอล์ออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (โดยน้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการกิน (AFI) เท่ากับ 29.39±2.16, 32.20±3.47 และ 31.81±1.83 ตามลำดับ (มยุรฉัตร เกื้อชู, ศิริพรรณ ตันตาคม และธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, 2552) นอกจากออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังไม่พบว่ามีรายงานวิจัยใด ที่ทำการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเนระพูสีไทยในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย ทั้งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเนระพูสีไทย ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ในส่วนเหง้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

2. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเหง้าเนระพูสีไทย

3. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

4. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. เตรียมสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

2. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเหง้าเนระพูสีไทย

3. ทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิล-อะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย แบ่งการทดสอบเป็น 10 กลุ่ม คือ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โพลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตอรอยด์ และคาร์ดิแอก ไกลโคไซด์

4. หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทำให้ทราบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

2. ทำให้ทราบองค์ประกอบทางเคมีของเหง้าเนระพูสีไทย

3. ทำให้ทราบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟลาโวนอยด์ ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

4. ทำให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย

5. ได้ประสบการณ์วิจัยทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ตลอดจนการแก้ไขปัญหา

1.5 ศัพท์นิยมเฉพาะ

1. สารสกัดหยาบ (Crude extract) หมายถึง สารสกัดเบื้องต้นจากสมุนไพรที่ยังไม่ถึงขั้นตอนบริสุทธิ์ กรรมวิธีการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงหรือต้องผ่านกรรมวิธีผลิตก่อนที่จะนำไปใช้ประโยชน์

2. พฤกษเคมี (Phytochemistry) หมายถึง องค์ประกอบทางเคมีหรือสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในสิ่งมีชีวิต วัตถุประสงค์ของการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) เพื่อให้ทราบกลุ่มสารสำคัญ ที่เป็นองค์ประกอบในพืช รวมทั้ง สามารถใช้ติดตามส่วนของสารสกัด เพื่อให้ง่ายต่อการแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์

3. ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activities) คือ กิจกรรมชีวสาร ปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือสมบัติทางชีวภาพที่เกิดขึ้น และเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต เช่น ฤทธิ์ต้านอนมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของเนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri*)

ภาพที่ 2-1 เนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri*

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tacca chantrieri*
วงศ์ : TACCACEAE
ชื่อภาษาอังกฤษ : Bat flower
ชื่อท้องถิ่น : ดีงูหว้า (เหนือ) คลุ้มเลีย ว่านหัวฟ้า (จันทบุรี) ดีปลาช่อน (ตราด) มังกรดำ (กรุงเทพฯ) ค้างคาวดำ เนระพูสีไทย (กลาง) ม้าถอนหลัก (ชุมพร) ว่านพังพอน (ยะลา) ละเบ๊าะบูเก๊ะ (มาเลย์-ยะลา) กลาดีกลามูยี (มาเลย์-ปัตตานี) (ก่องกานดา ชยามฤต , 2557)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เนระพูสีไทยเป็นไม้ล้มลุก อายุหลายปี สูงได้ถึง 1.5 เมตร ลำต้นสั้น อยู่ใต้ดินหรือโผล่เหนือดินเล็กน้อย มีเหง้าอยู่ใต้ดิน รูปทรงกระบอก ขนาดกว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ใบเดี่ยวออกเรียงแบบเวียนสลับรอบลำต้น ก้านใบค่อนข้างกลมยาว 11-45 เซนติเมตร โคนก้านแผ่เป็นครีบ หรือแบนออกติดกับลำต้น แผ่นใบรูปรีแกมขอบขนานถึงรูปใบหอก ปลายใบแหลมหรือเรียวแหลม โคนใบสอบแคบแบบรูปลิ่มขอบใบ

เรียบ บางครั้งพบหยักคล้ายลูกคลื่น ผิวใบเกลี้ยง เรียบหรือเป็นลอนตามยาว สีเขียวคล้ายกันทั้งด้านบนและล่าง ดอกออกเป็นช่อกระจุกแบบซี่รุ่ม ก้านช่อดอกค่อนข้างกลมยาว 20-65 เซนติเมตร สีเขียวอมน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้ม หรืออมม่วง ผิวเกลี้ยง มีใบประดับสีเขียวอมน้ำตาลถึงน้ำตาลอมม่วง 4 ใบ ใบใหญ่รูปร่างคล้ายปีกผีเสื้อ เรียงเป็นคู่ตั้งฉากกับช่อดอกอยู่ด้านบน และใบประดับเล็กรูปร่างค่อนไปทางสามเหลี่ยม สีสันเหมือนกันและเรียงตัวแบบเดียวกัน ใบประดับอยู่ด้านล่าง 2 ใบ มีรยางค์คล้ายเส้นด้ายสีเดียวกับใบประดับหรือสีอ่อนกว่าเล็กน้อย ยาว 20-30 เซนติเมตร ยื่นออกจากโคนดอกเป็นจำนวนมาก ดอกย่อยสมบูรณ์เพศสีเดียวกับใบประดับหรือเข้มกว่าเล็กน้อย เมื่อดอกบานมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตร จำนวน 10-25 ดอก มีโคนก้านอยู่ชิดกันเป็นกระจุก ก้านดอกย่อยค่อนข้างกลม ยาว 0.5-2.0 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงสีเขียวอมม่วง รูปขอบขนาน ปลายโค้งมน 3 กลีบ กลีบดอกสีม่วงอมเขียว รูปไข่กว้าง ปลายโค้งมนหรือเว้าเล็กน้อย 3 กลีบ โค้งลงเมื่อดอกบานเกสรเพศผู้มีหลายอันเรียงตัวเป็น 2 ชั้น ชั้นนอกโต กว่าชั้นในเล็กน้อย ก้านเกสรสั้นและแบน รังไข่อยู่ต่ำกว่าฐานกลีบรวม ภายในมี 1 ช่อง ก้านเกสรมี 3 สัน ปลายก้านมี 3 พู ผลรูปค่อนไปทางสามเหลี่ยมหรือสามเหลี่ยมแกมขอบขนาน ขนาดกว้าง 1-2 เซนติเมตร ยาว 1.5-4.0 เซนติเมตร เมื่อสุกสีส้มถึงสีแดงหรือม่วงภายในมีเมล็ดรูปไตเป็นจำนวนมาก การใช้ประโยชน์ด้านเป็นพืชอาหาร ส่วนที่ใช้เป็นอาหารคือ ใบอ่อน นิยมใช้เป็นอาหารประเภทผักสด ด้านสมุนไพร ส่วนเหง้า รสสุขุมเป็นยาบำรุงสตรีมีครรภ์ ต้มหรือดองสุราแก้โรคความดันเลือดต่ำ บำรุงกำลังทางเพศ ทั้งต้น ต้มอาบรักษาอาการผื่นคัน ใช้ทั้งต้นเคี้ยวกินหรือต้มน้ำดื่มเป็นยาบำรุงกำลัง เสริมสุขภาพ และแก้อาการเจ็บปวดในร่างกาย โรคมะเร็ง ทำให้ชา ตลอดจนแก้ปวดท้อง อาหารไม่ย่อยหรืออาหารเป็นพิษ (ธงชัย เปาอินทร์ และนิวัตร เปาอินทร์, 2544)

2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

2.2.1 วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การเตรียมตัวอย่างพืชต้องคำนึงถึงสารสำคัญในพืชการตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่ถูกต้องไม่มีพืชอื่นเจือปน ไม่มีโรคพืช อายุพืชที่ผลิตสารสำคัญ และการเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างให้แห้ง เพื่อคงคุณภาพของสมุนไพรไว้ ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและอุณหภูมิต่ำ ๆ เพราะอุณหภูมิสูงจะทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลงในการสกัดเพื่อแยกสารสำคัญจากพืชเพื่อนำมาศึกษามีด้วยกันหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้ทั่วๆ ไป ได้แก่วิธีดังต่อไปนี้

2.2.1.1 วิธีการหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักพืชกับตัวทำละลายในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทจนเนื้อเยื่อของพืชอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถ

แทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบในพืชออกมาได้ วิธีนี้มีข้อดีคือสารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2.2.1.2 วิธีการแช่สกัดต่อเนื่อง (Percolation) เป็นวิธีปล่อยให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงพืชสมุนไพรช้า ๆ พร้อมกับสารละลายส่วนที่เป็นองค์ประกอบออกจากผลพืชสมุนไพรออกมา โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolation ข้อดีของวิธีนี้ คือเป็นการสกัดสารจากพืชได้สมบูรณ์ และไม่ใช้ความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย และใช้เวลาในการสกัดนาน

2.2.1.3 การสกัดด้วย Soxhlet Extraction เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวละลายในขวดก้นกลม ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงไปใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับสารสกัดจะไหลกลับลงไปในขวดก้นกลม ด้วยวิธีกาลักน้ำขวดก้นกลม นี้ได้รับความร้อนจากเตาหลุมให้ความร้อน ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ในขวดก้นกลม ตัวทำละลาย เมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งสารสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ ใช้ตัวทำละลายน้อย แต่ใช้ความร้อนด้วย จึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัวได้

2.2.1.4 การกลั่นโดยใช้น้ำ วิธีนี้สามารถทำได้โดยใช้อุปกรณ์สำหรับการกลั่น เช่น หม้อกลั่นเครื่องควบแน่น และภาชนะรองรับน้ำมัน วิธีการก็คือ บรรจุพืชที่ต้องการสกัดน้ำมันหอมระเหยลงในหม้อกลั่น เติมน้ำพอท่วม แล้วต้มจนน้ำเดือด เมื่อน้ำเดือดระเหยเป็นไอ ไอน้ำจะช่วยพาน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพืชออกมาพร้อมกัน เมื่อผ่านเครื่องควบแน่น ไอน้ำและไอของน้ำมันหอมระเหยจะควบแน่นเป็นของเหลว ได้น้ำมันหอมระเหย และน้ำ แยกชั้นจากกัน

2.2.2 การเลือกวิธีการสกัดสำคัญจากพืช

วิธีการสกัดพืชที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่างได้แก่

2.2.2.1 ธรรมชาติของพืชโดยพิจารณาจากลักษณะ และโครงสร้างของเนื้อเยื่อพืชที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วยวิธีการหมัก หากเป็นพืชที่มีเนื้อเยื่อที่แข็งแรง และเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธีการแช่สกัดต่อเนื่องหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง ถ้าสารสำคัญในพืชเป็นสารที่ละลายได้ง่ายใช้วิธีการหมัก แต่ถ้าละลายได้น้อยจำเป็นต้องใช้วิธีการแช่สกัดต่อเนื่องหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง นอกจากนี้ต้องพิจารณาความคงตัวของสารสำคัญในพืชสมุนไพรต่อความร้อนด้วย ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีการการหมักหรือวิธีการแช่สกัดต่อเนื่อง

2.2.2.2 คุณค่าของสารสกัด และค่าใช้จ่ายในการสกัด หากต้องการสกัดสารที่ไม่ใช่สารสำคัญ และมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่น รส ของยา ในการเตรียมก็อาจใช้

วิธีที่ง่ายไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมไว้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

2.2.2.3 ความต้องการที่จะให้สารสกัดสมบูรณ์ (Exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดที่เจือจางการใช้วิธีการหมักก็เพียงพอ แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีการแช่สกัดต่อเนื่องหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2.2.3 การเลือกใช้ตัวละลายในการสกัดสารสำคัญของพืช

ตัวทำละลายที่เหมาะสมควรเป็นตัวทำละลายสารที่ต้องกาสกัดได้ดีพอ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด ราคาไม่แพงมาก ในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ คือ สารละลาย และตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน สารละลายที่ต้องการออกมามากที่สุด ได้แก่ คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เฮกเซน และแอลกอฮอล์ เป็นต้น

2.2.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยทำละลายที่เหมาะสม จากวิธีการสกัดข้างต้น สารสกัดที่ได้จะมีปริมาตรมาก และเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ และไม่มีประสิทธิภาพจึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

2.2.4.1 การกลั่นภาวะสูญญากาศ (Distillation in vacuum) จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออก โดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสูญญากาศโดยใช้ปั๊บสูญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า rotary evaporator ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่กลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์ หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะจะแช่ในเครื่องอังน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้ และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึง และสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดหยาบนี้ต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งระบบจะต่อเข้าถึงกับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์ และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ และนำกลับมาใช้ได้

2.2.4.2 การระเหย (free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกโดยใช้ความร้อนจากเครื่องอังน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ ในสารสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญเมื่อใช้ความร้อน

2.2.4.3 การแช่แข็ง (Freezing) เป็นการระเหยตัวทำละลายจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำ เหมาะสมที่แช่แข็งโดยใช้ความเย็น (lyophillizer หรือ free dryer)

2.2.4.4 อัลตราฟิลเทรชัน (Ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมนเบรม (membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000 g/mol

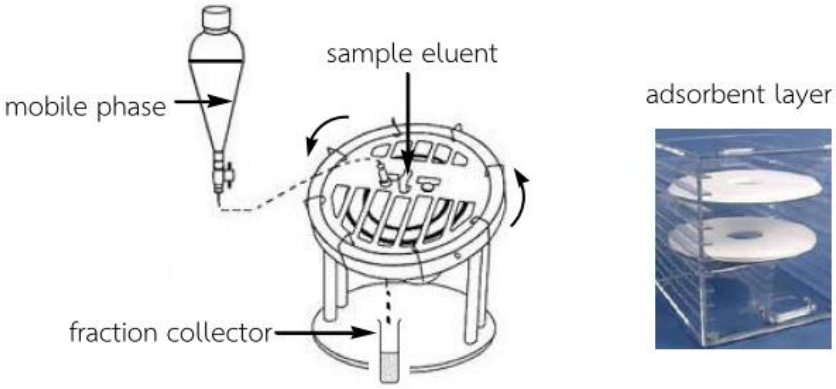
2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (พรรณทิพย์ แสงสุขเอี่ยม, 2548).

2.3.1 โครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นวิธีการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ออกจากกันที่ได้ผลดีมากและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาศัยความแตกต่างการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งอาจเป็นของเหลวหรืออาจเป็นแก๊ส กับอีกเฟสหนึ่งซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) หรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารออกจากกัน ขึ้นอยู่กับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่ ประโยชน์ของการทำโครมาโทกราฟี คือ 1) ใช้แยกสารแต่ละชนิดออกจากสารผสม 2) ตรวจความสม่ำเสมอของสารตัวอย่าง 3) ทำสารให้บริสุทธิ์ 4) ตรวจเอกลักษณ์ของสาร 5) ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ 6) ตรวจสารปนเปื้อน

2.3.1.1 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) หลักการแยกสารเป็นแบบดูดซับ (adsorption chromatography) วัฏภาคนิ่งเป็นของแข็ง ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว ประโยชน์ คือ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพื่อหาชนิดองค์ประกอบทางเคมีของสารผสมในปริมาณน้อย โดยเทียบค่าริเลทีฟฟรอนต์กับสารมาตรฐาน ซึ่งค่าต้องเท่ากัน และดูความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง โดยสารบริสุทธิ์จะมีแค่จุดสารเดียวบนโครมาโทแกรม โดยทั่วไป ตัวดูดซับบนแผ่นรงคเลขผิวบาง นิยมใช้ซิลิกาเจลวัฏภาคปกติ ดังนั้น สารที่มีขั้วมากกว่าจะถูกดูดซับบนพื้นผิวของซิลิกาเจล ทำให้ถูกแยกออกมาได้ยากกว่าสารที่มีขั้วน้อยกว่า หรืออาจกล่าวว่า สารที่มีขั้วมากจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางน้อย ในทางตรงข้าม ถ้าเป็นซิลิกาเจลวัฏภาคผันกลับ สารที่มีขั้วมากกว่าจะเคลื่อนที่แยกตัวออกมาก่อน

2.3.1.2 รงคเลขผิวบางแบบเหวี่ยง

รงเลขผิวบางแบบเหวี่ยง (Centrifugal Thin-Layer Chromatography) ถูกพัฒนาจากรงคเลขผิวบาง และเพรพาราทีฟโครมาโทกราฟี สามารถใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณ แยกสารด้วยหลักการดูดซับ โดยวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว จะอาศัยแรงเหวี่ยง เพื่อให้เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นไปบนวัฏภาคนิ่งซึ่งเป็นของแข็ง เรียกเครื่องมือนี้ว่า โครมาโททรอน (Chromatotron) ดังภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 เครื่องโครมาโททรอน (Chromatotron)

2.4 การหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ (เย็นหทัย แน่นหนา, 2549)

สารบริสุทธิ์ที่แยกจากพืชด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีต่าง ๆ แล้วนั้น ต้องพิสูจน์โครงสร้างก่อนทดสอบการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยนำข้อมูลเบื้องต้น ได้แก่ จุดเดือด จุดหลอมเหลว สถานะ ลักษณะผลึก และสีของสารบริสุทธิ์ มาประกอบกับข้อมูลที่ได้จากวิธีการทางสเปกโทรสโกปี ดังนี้

2.4.1 อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet spectroscopy, UV) บอกหมู่ทำหน้าที่ชนิดไม่อิ่มตัวในโครงสร้าง ได้แก่ แอลคีน (alkene) แอลไคน์ (alkyne) อะโรมาติก สารประกอบคาร์บอนิล (carbonyl compound) สารประกอบสังยุค (conjugated compound) สารประกอบไนโตร (nitro compound) และสารประกอบไนตริล (nitrile compound) ซึ่งจะดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร กรณีหมู่ทำหน้าที่ดังกล่าวต่อกับหมู่ออกโซโครม (auxochrome) ทำให้สารดูดกลืนรังสีที่ความยาวคลื่นมากขึ้น

2.4.2 อินฟาเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy, IR) เทคนิคนี้ให้ข้อมูลชนิดหมู่ทำหน้าที่ในโครงสร้าง โดยให้พลังงานรังสีอินฟาเรดที่มีความถี่เท่ากับความถี่ของการสั่นของพันธะในโมเลกุล ทำให้พันธะในโมเลกุลสั่น เช่น หมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์ มีความถี่ เท่ากับ 1705-1735 cm^{-1} และหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ มีความถี่ เท่ากับ 1735-1800 cm^{-1} เป็นต้น

2.4.3 โปรตอนนิวเคลียร์แมกนีทิกเรโซแนนซ์ (Proton Nuclear Magnetic Resonance, ^{1}H-NMR) ให้ข้อมูลชนิด จำนวน และตำแหน่งของโปรตอนในโครงสร้าง

2.4.4 คาร์บอนนิวเคลียร์แมกนีทิกเรโซแนนซ์ (Carbon Nuclear Magnetic Resonance, ^{13}C-NMR) ให้ข้อมูลชนิดและจำนวนของอะตอมคาร์บอนในโครงสร้าง

2.4.5 นิวเคลียร์แมกนีทิกเรโซแนนซ์ 2 มิติ (two-dimensional NMR, 2D NMR) ได้ข้อมูลเป็นสเปกตรัม 2 มิติ ประกอบด้วย แกน X และแกน Y ใช้หาโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่หรือซับซ้อน ซึ่งช่วยให้วิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น 2D-NMR เป็นการศึกษาความสัมพันธ์หรือการคู่ควบระหว่างโปรตอน และอะตอมคาร์บอน มีหลายชนิด ดังตารางที่ 2-1

2.4.6 แมสสเปกโทรสโกปี (Mass Spectroscopy, MS) ให้ข้อมูลมวลเชิงโมเลกุล (molecular mass) และรูปแบบการแตกหักของไอออนเชิงโมเลกุล (molecular ion)

ตารางที่ 2-1 ชนิดนิวเคลียร์แมกเนทิกเรโซแนนซ์ 2 มิติ

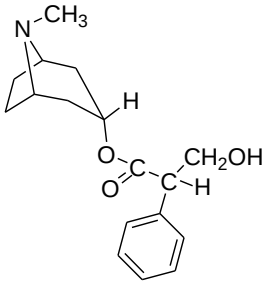
ชนิด 2D-NMR	**ให้ข้อมูล**
1. โปรตอน,โปรตอน J-รีซอล์ฟสเปกโทรสโกปี (H,H J-resolved Spectroscopy)	การคู่ควบระหว่างโปรตอน 2 ตัว ที่อยู่บนอะตอมคาร์บอนเดียวกัน
2. คาร์บอน,โปรตอน J-รีซอล์ฟสเปกโทรสโกปี (C,H J-resolved Spectroscopy)	การคู่ควบระหว่างโปรตอนที่อยู่บนอะตอมคาร์บอน
3. คาร์บอน,โปรตอน โคซี (C,H Correlation spectroscopy, COSY)	โปรตอนชนิดไหนอยู่บนอะตอมคาร์บอนใด
4. เฮทเอ็มคิวซี (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC)	ข้อมูลเหมือนโคซี แต่สเปกตรัมมีความเข้มมากกว่า
5. โปรตอน,โปรตอนโคซี (H,H COSY)	การคู่ควบของโปรตอนข้างเคียง ซึ่งห่างกัน 3 พันธะ
6. ลองเรนจ์โคซี (long-range COSY)	การคู่ควบระหว่างโปรตอนที่ห่างกันมากกว่า 3 พันธะ
7. เฮทเอ็มบีซี (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity, HMBC)	การคู่ควบระหว่างโปรตอนและอะตอมคาร์บอนที่ห่างกันมากกว่า 1 พันธะ
8. โนซี (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy, NOESY)	การคู่ควบและไม่เกิดการคู่ควบของโปรตอนข้างเคียง
9. อินอะดีเควต 2 มิติ (2D Incredible Natrual Abundance Double Quantum Transfer Experiment, INADEQUATE)	การคู่ควบระหว่างอะตอมคาร์บอนที่ติดกัน

ดังนั้น การวิเคราะห์หาโครงสร้างจะต้องใช้ข้อมูลจากสเปกตรัมต่าง ๆ มาประกอบกัน กรณีสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ เป็นสารใหม่ ต้องยืนยันโดยการวิเคราะห์ธาตุ (Elemental Analysis, EA) ในโครงสร้างเพิ่มเติมด้วย

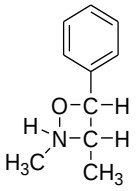
2.5 กลุ่มสารสำคัญในพืชสมุนไพร

สารสำคัญในพืชมีจำนวนมาก สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สารปฐมภูมิ (Primary metabolite) และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) โดยสารปฐมภูมิเป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูงทั่วไป พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมที่จำเป็นของเซลล์ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้รับจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช และกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) ไขมัน (Lipids) น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil หรือ Essential oil) ส่วนสารทุติยภูมิ เป็นสารประกอบที่เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ในพืช เป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด และแต่ละฤดู สารเหล่านี้จะแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน สารทุติยภูมิมีหลายชนิด (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) ได้แก่

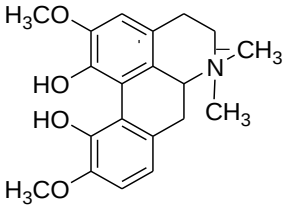
2.5.1 แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ มักพบในพืชชั้นสูง มีสูตรโครงสร้างซับซ้อน และแตกต่างกันมากมาย คุณสมบัติของแอลคาลอยด์ คือ ส่วนใหญ่มีรสขม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ มีฤทธิ์เป็นด่าง แอลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นยาระงับปวด ยาแก้ไอ ยาแก้หอบหืด ยารักษาแผลในกระเพาะ และลำไส้ ยาลดความดัน ยาควบคุมการเต้นของหัวใจ เป็นต้น ตัวอย่างสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ (ออมบุญ ล้วนรัตน์, 2536). เช่น atropine **(II-1)** สกัดได้จากต้น และใบของลำโพง (*Datura metel* L.) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ ephedine **(II-2)** ซึ่งสกัดได้จากต้นม่วอึ๊ง (*Ephedra epuisetina* Bunge) มีฤทธิ์ขยายหลอดลมใช้เป็นยารักษาโรคหอบหืด *N*-formylnornuciferine **(II-3)** สกัดที่ได้จากต้นบอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson) ออกฤทธิ์ในการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ และ *N*-formylannonaine **(II-4)** สกัดที่ได้จากต้นบอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson) ออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น



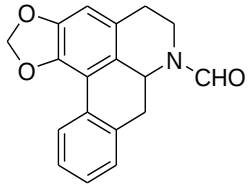
(II-1)



(II-2)



(II-3)

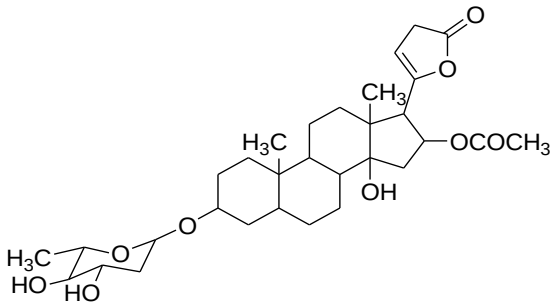


(II-4)

ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของสารกลุ่มอัลคาลอยด์ atropine **(II-1)** ephedrine **(II-2)** *N*-formylnornuciferine **(II-3)** และ *N*-formylannonaine **(II-4)**

2.5.2 ไกลโคไซด์ (Glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากส่วนที่ไม่ใช้น้ำตาล เรียกว่า อะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) จับกับส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycoside) ละลายน้ำได้ดี จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่อีกหนึ่งกลุ่มที่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรคอย่างกว้างขวาง และบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ ปกติอะไกลโคนของไกลโคไซด์มีโครงสร้างที่แตกต่างกันหลายแบบ และนิยมใช้เป็นหลักในการจำแนกประเภทของไกลโคไซด์ ซึ่งแบ่งได้หลายกลุ่มดังนี้

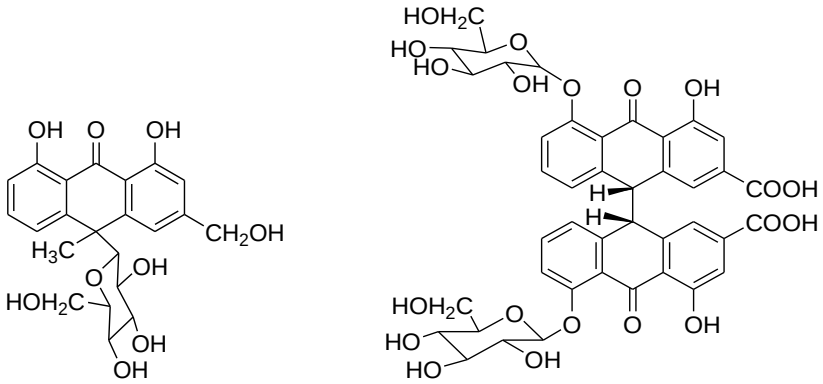
1) คาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) มีอะไกลโคนเป็นสเตียรอยด์นิวเคลียส (steroid nucleus) คือมีโครงสร้างเป็นวงแหวนไซโคเพนทาโนเพอไฮโดรฟีแนนทรีนอยู่ในโมเลกุล มีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด พบได้ในพืชชั้นสูงหลายวงศ์ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) เช่น oleandrin **(II-5)** สกัดได้จากใบของยี่โถ (*Nerium incidum* Mill) ในวงศ์เอโพไซนาซีอี (Apocynaceae) ใช้บำบัดรักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติของหัวใจ



(II-5)

ภาพที่ 2-4 โครงสร้างของสารกลุ่มคาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ oleandrin **(II-5)**

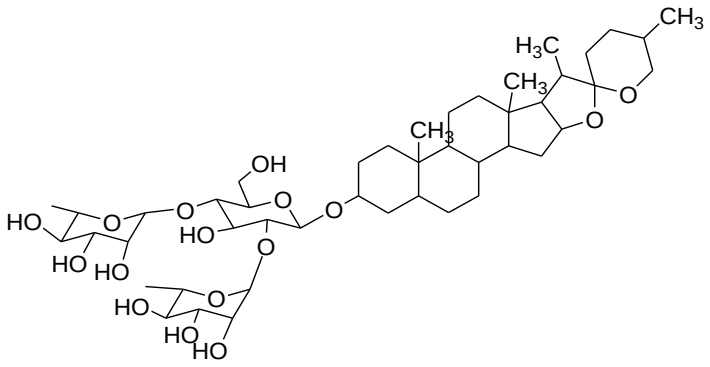
แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ (Anthraquinone glycosides) มีอะไกลโคนปีนอนุพันธ์ของแอนทราซีน (anthracene) ที่พบในธรรมชาติโดยเฉพาะในพืชชั้นสูงทั้งหลายจะอยู่ในสภาพไกลโคไซด์ คุณสมบัติทางเคมีของแอนทราควิโนนจะสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาระหว่างแอนโทรน (anthrone) และแอนทรานอล (anthranol) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย (laxative) ยาถ่าย (purgative) (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) เช่น barbaloin **(II-6)** สกัดได้จากว่านหางจระเข้ (*Aloe Baebadensis* Mill) ในวงศ์ลิเลียซีอี (Liliaceae) ใช้เป็นยาถ่าย และ sennoside-B **(II-7)** สกัดได้จากใบและฝักของต้นมะขามแขก (*Cassia angustifolia* Vahl.) ในวงศ์ซีซาลพิเนียซีอี (Caesalpiniaceae) มีฤทธิ์ในการระบายขึ้นอยู่กับปริมาณของแอนทรานอลอิสระ เป็นต้น



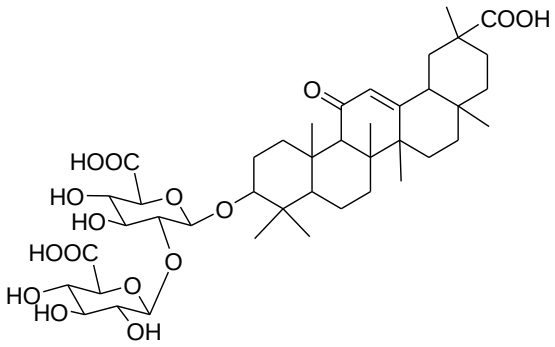
(II-6) **(II-7)**

ภาพที่ 2-5 โครงสร้างของสารกลุ่มแอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ barbaloin **(II-6)** และ sennoside-B **(II-7)**

ซาโปนิน ไกลโคไซด์ (Saponin glycoside) มีอะไกลโคนเป็นสเตียรอยด์หรือไตรเทอร์-พีนอยด์ เป็นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติเกิดฟอง เมื่อเขย่ากับน้ำ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) เช่น dioscin **(II-8)** เป็นสารสเตอร์รอยด์ดัล ซาโปนิน (Steroidal saponins) สกัดได้จากเมล็ดลูกซัด (*Teigonella foenum-graecum* L.) ในวงศ์เลกูมินาซีอี (Leguminaceae) และ glycyrrhizin **(II-9)** เป็นสารเพนทะไซคลิกไทรเทอร์พีน ซาโปนิน สกัดได้จากรากของชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ในวงศ์แฟบาซีอี (Fabaceae) เป็นสารให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลทราย 50 - 100 เท่า เป็นต้น



(II-8)

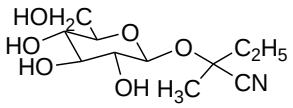


(II-9)

ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของสารกลุ่มซาโปนิน ไกลโคไซด์ dioscin **(II-8)** และ glycyrrhizin **(II-9)**

ไซยาโจนิก ไกลโคไซด์ (Cyanogenic glycosides) เป็นสารจำพวกไกลโคไซด์ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไฮโดรไซยานิก (HCN) จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ไซยาโนจินิกไกลโคไซด์หลายชนิดเป็นอนุพันธ์ของแมนเดโลไนไตรล์ (mandelonitrile) โดยส่วนที่เป็นน้ำตาลอาจพบในรูปมอโนแซ็กคาไรด์หรือไดแซ็กคาไรด์ ไซยาโนจินิกไกลโคไซด์ และเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสนั้นถูกสร้างจากพืช หากแต่จัดเก็บในคนละส่วน จึงทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยากับพืช แต่

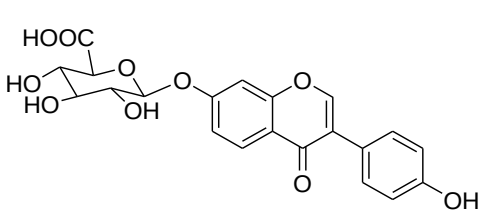
หากเนื้อเยื่อพืชถูกทำลาย และ ไซยาโนจินิกไกลโคไซด์ และเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากันก็อาจเกิดการปลดปล่อยกรดไฮโดรไซยานิก ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต นักพฤกษศาสตร์จึงเชื่อว่าเป็นกลไกหนึ่งของพืชที่ป้องกันการถูกทำลายไซยาโนจินิกไกลโคไซด์ถูกสะสมในปริมาณมากในพืชที่ยังอ่อนหรือส่วนที่ยังอ่อนของพืช เช่น ใบอ่อน หรือ ยอดอ่อน เป็นต้น (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) ตัวอย่างสารในกลุ่มไซยาโจนิก ไกลโคไซด์ เช่น lotaustralin **(II-10)** สกัดได้จากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) ในวงศ์ยูเบียซีอี (Euphorbiaceae) เป็นต้น



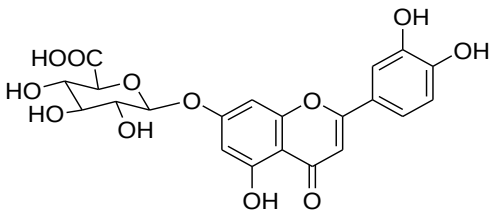
(II-10)

ภาพที่ 2-7 โครงสร้างของสารกลุ่มไซยาโจนิก ไกลโคไซด์ lotaustralin **(II-10)**

ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycosides) เป็นสารสีที่พบในหลายส่วนของพืช ส่วนใหญ่สีออกไปทางสีแดง เหลือง ม่วง น้ำเงิน ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ มีส่วนอะไกลโคนเป็นสารจำพวกฟลาโวนอยด์เชื่อมเกาะอยู่กับไกลโคน ส่วนมากเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบในส่วนต่างๆ ของพืช โดยเฉพาะในดอก ทำให้ดอกมีสีสันสวยงาม (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547) ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ เช่น daidzein-7-*O*-glucuronide **(II-11)** สกัดจากเมล็ดถั่วเหลือง (*Glycine max* Merr.) ในวงศ์พาพิลิโอนาซีอี (Papilionaceae) มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโทรเจนจากธรรมชาติ และ Luteolin-7-*O*-glucuronide **(II-12)** สกัดได้จากต้นกระเพรา (*Ocimum sanctum* L.) ในวงศ์ลาเบียทีอี (Labiatae) มีฤทธิ์ลดการเกร็งของกล้ามเนื้อ เป็นต้น



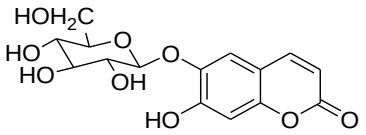
(II-11)



(II-12)

ภาพที่ 2-8 โครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ daidzein-7-*O*-glucuronide **(II-11)** และ luteolin-7-*O*-glucuronide **(II-12)**

คูมาริน ไกลโคไซด์ (Coumarin glycosides) เป็นสารประกอบไกลโคไซด์ที่ในโมเลกุลประกอบด้วยโครงสร้างเบนโซแอลฟาไพโรน จัดอยู่ในกลุ่มของพวกสารประกอบแล็กโทน (lactone) มีลักษณะเฉพาะตัว คือ เป็นสารที่ให้กลิ่นหอมในธรรมชาติ ตัวอย่างส่วนอะไกลโคนกลุ่มคูมาริน เช่น aesculin **(II-13)** สกัดได้จากเปลือกต้นเกาลัด (*Castanea mollissima*) ในวงศ์คาสทาเนีย (Castanea) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น



(II-13)

ภาพที่ 2-9 โครงสร้างของสารกลุ่มคูมาริน aesculin **(II-13)**

2.5.3 แทนนิน (Tannins) เป็นสารประกอบพวกฟีนอล สามารถละลายน้ำได้ เป็นสารที่พบในพืชหลายชนิด มีโมเลกุลใหญ่ และโครงสร้างซับซ้อน มีสถานะเป็นกรดอ่อน รสฝาด แทนนินใช้เป็นยาฝาดสมาน และแก้ท้องเสีย ช่วยรักษาแผลไฟไหม้ และใช้ประโยชน์ในอุตสหกรรมฟอกหนัง กรณีที่รับประทานแทนนินเป็นประจำอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ สมุนไพรที่มีแทนนิน คือ เปลือกทับทิม เปลือกอบเชย ใบฝรั่ง ใบและเปลือกของสีเสียด ใบชา เป็นต้น

2.6 การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

พฤกษเคมี (phytochemistry) หมายถึง องค์ประกอบทางเคมีหรือสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในสิ่งมีชีวิต วัตถุประสงค์ของการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น เพื่อให้ทราบกลุ่มสารสำคัญ ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ไกลโคไซด์ แทนนิน เทอร์พีน แอนธราควิโนน ที่เป็นองค์ประกอบในพืช รวมทั้ง สามารถใช้ติดตามส่วนของสารสกัด เพื่อให้ง่ายต่อการแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ แต่เนื่องจากพืชมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังนั้น การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น จึงต้องคำนึงถึงการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารออกมาได้ วิธีการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น แบ่งได้ 2 วิธี ได้แก่ ปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน และการวิเคราะห์บนแผ่นรงคเลขผิวบาง

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในสารบางกลุ่ม ไม่มีวิธีการตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจง เช่น สารในกลุ่มเทอร์พีน จะมีวิธีตรวจสอบเฉพาะไทรเทอร์พีน เท่านั้น การตรวจสอบ เป็นวิธีทาง

เคมี อย่างไรก็ตาม บางวิธีการตรวจสอบ ไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาได้ การตรวจสอบสารแต่ละกลุ่ม หรือโครงสร้างแต่ละแบบ มักมีมากกว่า 1 วิธี อาจทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบแต่ละวิธี อาจพบผลบวกลวง (false positive) และผลลบลวง (false negative) ดังนั้นผลที่ได้จากการตรวจสอบ จึงเป็นเพียงการคาดคะเน ซึ่งจะเป็นที่แน่นอนก็ต่อเมื่อสามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ และนำสารนั้นไปพิสูจน์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิคต่างๆ แล้วเท่านั้น ประโยชน์ของการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น คือ สามารถนำผลการตรวจสอบมาวางแผนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ตามคุณสมบัติของสาร เช่น หากตรวจพบสารกลุ่มซาโปนินก็ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เพื่อเตรียมสารสกัดให้ได้สารสำคัญดังกล่าวมากที่สุด หากตรวจพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ก็สามารถสกัดแยกสารตรงตามคุณสมบัติของอัลคาลอยด์ และ ใช้เป็นวิธีการหนึ่งในตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นถึงชนิดของพืช เช่น พืชที่คาดว่าเป็นมะขามแขกจะต้องให้ผลบวกกับ Borntrager test ถ้าให้ผลลบ แสดงว่าควรเป็นพืชชนิดอื่น เป็นต้น (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

2.6.1 การทดสอบสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids)

แอลคาลอยด์พบได้ทั้งในพืช และสัตว์ ส่วนมากจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โครงสร้างมีอะตอมไนโตรเจน จึงมีคุณสมบัติเป็นเบส และมีรสขม ดังนั้นสามารถทดสอบได้โดยการชิม ถ้าแอลคาลอยด์ชนิดนั้นไม่เป็นพิษ และการทำปฏิกิริยาเคมีกับรีเอเจนต์ เป็นการทดสอบทั้งกลุ่มแอลคาลอยด์ทั่วไป และแอลคาลอยด์เฉพาะ ดังนี้

2.8.1.1 การทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดตะกอน แอลคาลอยด์เกือบทุกชนิดสามารถทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ แล้วตกตะกอนหรือสารละลายขุ่น ดังนี้

(1) รีเอเจนต์ซึ่งมีอะตอมออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Oxygen-containing acid) ได้แก่ กรดซิลิโคทังสทิก (Silico-tungstic acid) กรดฟอสโฟโมลิบดิก (Phosphomolybdic acid) และ กรดฟอสโฟทังสทิก (Phosphotungstic acid) เปลี่ยนเป็นเกลือของแอลคาลอยด์ที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้เกิดตะกอนหรือสารละลายขุ่น

(2) รีเอเจนต์แวกเนอร์ (Wagner’s reagent) ประกอบด้วยโพแทสเซียม-ไอโอไดด์ (KI) 2 กรัม น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และไอโอดีน 1.3 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ผลการทดสอบ คือ เกิดตะกอนสีน้ำตาลของสารประกอบแฮโลเจน

(3) รีเอเจนต์เมเยอร์ (Mayer’s reagent) ประกอบด้วย เมอร์คิวรี (II) คลอไรด์ (Mercury (II) chloride, $HgCl_2$) 1.4 กรัม ในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร ผสมกับโพแทสเซียม-ไอโอไดด์ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ผลการทดสอบ คือ เกิดตะกอนสีขาวหรือสีครีม

(4) รีเอเจนต์ดราเจนดรอฟฟ์ (Dragendroff's reagent) การเตรียมมี 2 วิธี คือ วิธีแรก ผสมสารละลาย A ประกอบด้วยบิสมัธซับไนเทรต (Bismuthsubnitrate, $(Bi(NO_3)_3)$ 8 กรัม และกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร และสารละลาย B ประกอบด้วยโพแทสเซียมไอโอไดด์ 27 กรัม น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และวิธีที่สอง ละลายบิสมัธซับไนเตรต 0.85 กรัม ในกรดแอซีติก 10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์เข้มข้นร้อยละ 40 โดยมวลต่อปริมาตร 50 มิลลิลิตร สารละลายเผื่อใช้ (stock solution) เก็บไว้ในตู้เย็นก่อนใช้ วิธีการเตรียม คือ ปิเปตต์สารละลายเผื่อใช้ 10 มิลลิลิตร ผสมกับกรดแอซีติก 20 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2550) ผลการทดสอบ คือ เกิดตะกอนสีส้มหรือ สีแดงหรือสีน้ำตาล

(5) รีเอเจนต์มาร์มี (Marme's reagent) ประกอบด้วยแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) 10 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมกับโพแทสเซียมไอโอไดด์ 20 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ผลการทดสอบ คือ เกิดตะกอนสีขาวหรือสีเหลือง

(6) รีเอเจนต์ฮาเกอร์ (Hager's reagent) ประกอบด้วย สารละลายอิ่มตัวของกรดพิคริก (Picric acid) ในน้ำ ผลการทดสอบ คือ เกิดตะกอนสีเหลือง (ออมบุญ ล้วนรัตน์, 2536)

2.6.2 การทดสอบสารในกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างหลัก ได้แก่ ฟีนิลเบนซิล-แกมมา-ไพโรน (C6-C3-C6) พบทั่วไปในพืชต่าง ๆ ยกเว้น สาหร่าย แบคทีเรีย รา รวมทั้งแมลงบางชนิด ฟลาโวนอยด์ประเภทแชลโคน (chalcone) ฟลาโวน (flavone) ฟลาโวนอล (flavonol) ฟลาวาโนน (flavanone) ออโรน (aurone) แอนโธไซยานิดิน (anthocyanin) ลิวโคแอนโธไซยานิดิน (leucoanthocyanin) และคาทีชิน (Catechin) เนื่องจากฟลาโวนอยด์จะมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่กับโครงสร้างหลัก ส่งผลให้ฟลาโวนอยด์มีขั้วมาก ดังนั้น จึงสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วมาก ได้แก่ เอทานอล และน้ำ กรณีพืชมีไขมันมากต้องสกัดด้วยอีเธอร์หรือเฮกเซนก่อน แล้วนำกากเดิมมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วมาก การทดสอบฟลาโวนอยด์ ดังนี้

ฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่ทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาไซยานิดิน (cyanidin reaction) ประกอบด้วยโลหะแมกนีเซียมและกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ให้ผลการทดสอบเฉพาะฟลาโวนอยด์ที่มีฟีนิลเบนซิล-แกมมา-ไพโรนเป็นโครงสร้างหลัก กล่าวคือ สีส้มถึงสีแดง แสดงว่ามีฟลาโวน สีแดงถึงสีแดงเข้มหรือ สีแดงเลือดหมู (crimson) แสดงว่ามีฟลาโวนอล สีแดงเข้มถึงสีแดงอมม่วง (margenta) แสดงว่ามี ฟลาโวโนนไกลโคไซด์ สีเขียวหรือสีน้ำเงิน แสดงว่ามีฟลาโวโนนอิสระบาง

ชนิด สีแดงหรือสีม่วง แสดงว่ามี ลิวโคแอนโธไซยานิดิน สีแดงอมส้มถึงสีแดงอมน้ำเงิน แสดงว่ามี แอนโธไซยานิดิน ส่วนคาทีชิน ทดสอบโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$) เกิดสีน้ำเงินหรือ สีเขียว อย่างไรก็ตาม ควรระวังการเกิดผลบวกอำพราง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกทุกชนิดจะให้ผลกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เช่นเดียวกัน สำหรับฟลาโวนอยด์ประเภทแชลโคน และออโรนจะไม่ทำปฏิกิริยาไซยานิดิน เนื่องจากไม่มีโครงสร้างหลักของฟีนิลเบนโซ-แกมมา-ไพโรน แต่สามารถทดสอบได้โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มลงในสารสกัดเอทานอล จะปรากฏสีแดงเกิดขึ้นทันที อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของฟลาโวนอยด์ บางครั้งอาจเห็นสีไม่ชัดเจน เนื่องจากสีของสารสกัดบดบัง แก้ไขโดยเติมออกทิลแอลกอฮอล์ (Octyl alcohol) ลงไป เพื่อทำให้มองเห็นสีที่ชัดเจนขึ้น (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

2.6.3 การทดสอบสารในกลุ่มแอนทราควิโนน

ปฏิกิริยาบอร์นเทรเกอร์ใช้ทดสอบเฉพาะแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ชนิดโอไกลโคไซด์ เช่น เรอิน-8-กลูโคไซด์ (Rhein-8-glucoside) วิธีการโดยการแยกสลายด้วยน้ำ ในสภาวะเบส จะได้น้ำตาล และเกลือของอะไกลโคน เมื่อเติมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เพื่อออกซิเดชันของแอนทราซีน (anthracene) เปลี่ยนเป็นแอนทราควิโนนให้หมด ซึ่งเกลือของอะไกลโคนจะละลายได้ในน้ำ เมื่อปรับสารละลายให้เป็นกรด จะเปลี่ยนเป็นแอนทราควิโนนรูปอิสระ ซึ่งสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เบนซีน อีเธอร์ และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น เมื่อหยดสารละลายเบสลงไป จะได้สีแดง ข้อควรระวังของปฏิกิริยาบอร์นเทรเกอร์ คือ เกิดผลบวกอำพรางกับเบนโซควิโนน และแนฟโธควิโนนด้วย กรณีแอนธราควิโนนไกลโคไซด์ชนิดซี-ไกลโคไซด์ เช่น บาร์บาโลอีน และอะโลอิน เป็นต้น ต้องใช้สภาวะที่รุนแรงมากขึ้น ได้แก่ สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ หรือโซเดียมไดไธโอเนต (sodium dithionate) แทนสารละลายเบส

2.6.4 การทดสอบสารในกลุ่มคูมาริน

กรณีคูมารินที่ระเหยได้เมื่อโดนความร้อน การทดสอบทำได้อย่างง่าย โดยให้ความร้อนกับส่วนของพืชหรือสารสกัด แล้วดักจับไอระเหยของคูมารินด้วยกระดาษกรองที่ชุบสารละลายเบส ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เกิดวงแลกโทนของคูมารินแตกออก ได้เป็นเกลือของกรดไฮดรอกซีซินนามิกในรูปซิส เมื่อนำกระดาษกรองส่องภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะเห็นเรืองแสงสีเขียว และที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะปรากฏสีน้ำเงินหรือสีเขียวบนกระดาษกรอง ซึ่งทำให้โครงสร้างรูปซิสเปลี่ยนเป็นรูปทรานส์

2.6.5 การทดสอบสารในกลุ่มซาโปนิน

ใช้วิธีการทดสอบฟอง (froth test) เมื่อเขย่าสารสกัดน้ำที่มีซาโปนินไกลโคไซด์นานประมาณ 30 นาที จะเกิดฟองที่มีลักษณะเหมือนรังผึ้ง (honey comb froth) กล่าวคือ เป็นวงแหวนขนาด 6 เหลี่ยม จัดเรียงตัวซ้อนกัน และคงทนอยู่ประมาณ 30 นาที ซึ่งฟองจากกรดบางชนิดจะหายไปเมื่อเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ยืนยันโดยหยดสารละลายเบสลงในสารสกัด ซึ่งกรดจะทำปฏิกิริยากับเบส ได้เกลือ เมื่อเขย่าจะเกิดฟองในปริมาณมาก และมีความคงทนนานกว่า 30 นาที แต่ถ้าไม่เกิดฟอง แสดงว่าเป็นอะไกลโคนของซาโปนินไกลโคไซด์ นอกจากนี้ ถ้าฟองเกิดจากโปรตีน จะหายไปหลังจากต้ม

2.6.6 การทดสอบสารในกลุ่มแทนนิน

การทดสอบด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ในการทดสอบจะใช้รีเอเจนต์เฉพาะดังนี้

2.6.6.1 สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 ทดสอบแทนนินทั้งสองชนิด กรณีปรากฏสีน้ำเงินเขียวหรือสีเขียวดำถึงสีเขียวอมน้ำตาล แสดงว่ามีแทนนินชนิดแทนนินไฮโดรไลซ์ เกิดสีน้ำเงินเข้มหรือสีเขียวเข้มถึงสีดำ แสดงว่ามีแทนนินชนิดแทนนินควบแน่น

2.6.6.2 น้ำโบรมีน (Bromine water) ทดสอบเฉพาะแทนนินควบแน่น เกิดตะกอนสีเหลืองอ่อน

2.6.6.3 รีเอเจนต์ฟอร์มาลิน-กรดไฮโดรคลอริก (Formalin-HCl) ประกอบด้วยฟอร์แมลดีไฮด์ (Formaldehyde) เข้มข้นร้อยละ 40 และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 1 ใช้ทดสอบเฉพาะแทนนิน ควบแน่น เกิดตะกอนสีแดงหรือสีชมพู

2.6.6.4 รีเอเจนต์วานิลลิน-กรดไฮโดรคลอริก (Vanillin-HCl) ทดสอบแทนนินควบแน่น เกิดเป็นสารละลายสีแดงหรือสีชมพู

2.6.6.5 น้ำปูน (lime water) ทดสอบเฉพาะแทนนินไฮโดรไลซ์ เกิดตะกอนสีเทาแกมน้ำเงิน

สำหรับการทดสอบแทนนินด้วยรีเอเจนต์ต่าง ๆ ข้างต้น ผลต้องสอดคล้องกัน ดังนี้ กรณีเติมรีเอเจนต์ฟอร์มาลิน-กรดไฮโดรคลอริก เกิดตะกอนสีแดงหรือสีชมพู และเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 เกิดตะกอนสีน้ำเงินเข้มหรือสีเขียวเข้มถึงสีดำ แสดงว่าแทนนินควบแน่น กรณีเติมรีเอเจนต์วานิลลิน-กรดไฮโดรคลอริก เกิดสีแดงหรือสีชมพู และเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 เกิดตะกอนสีน้ำเงินเข้มหรือสีเขียวเข้มถึงสีดำ แสดงว่ามีแทนนินควบแน่น กรณีเติมน้ำโบรมีน เกิดตะกอนสีเหลืองอ่อน และเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 เกิดตะกอนสีน้ำเงินเข้มหรือสีเขียวเข้มถึงสีดำ แสดงว่ามีแทนนินควบแน่น

กรณีเติมน้ำปูน เกิดตะกอนสีเทาแกมน้ำเงิน และเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้น ร้อยละ 1 ตะกอนสีน้ำเงินเขียวหรือสีเขียวดำถึงสีเขียวอมน้ำตาล แสดงว่าแทนนินไฮโดรไลซ์

2.6.7 การทดสอบสารในกลุ่มเทอร์พีน

2.6.7.1 การทดสอบแซลโควสกิ (Salkowski test) โดยสกัดพืชด้วยอีเธอร์ นำสารสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเล็กน้อย ใช้ทดสอบเทอร์พีนทั่วไป จะปรากฏสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อของสารละลาย

2.6.7.2 รีเอเจนต์ 2,6-ได-เทอร์ต-บิวทิล-พารา-ครีซอล (2,6-di-tert-butyl-p-cresol) ในเอธานอล ใช้ทดสอบเพนทะไซคลิกไทรเทอร์พีน จะปรากฏสารละลายสีม่วง

2.6.7.3 รีเอเจนต์กรดคลอโรซัลโฟนิก ใช้ทดสอบไทรเทอร์พีนทั่วไป เกิดสารละลายสีแดง

2.6.8 การทดสอบสารในกลุ่มสเตอรอยด์

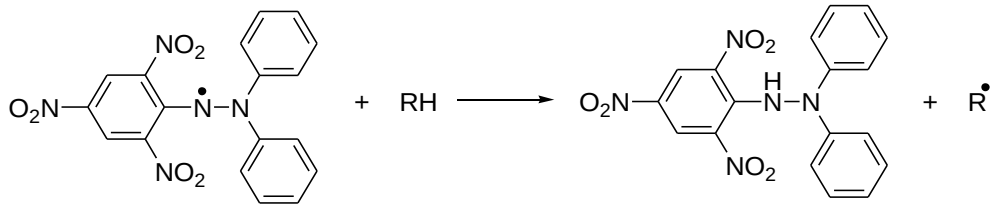
ทดสอบสเตอรอยด์โดยใช้ปฏิกิริยาลีเบอร์แมนน์เบอร์ชาร์ด (Liebermann-Burchard reaction) วิธีการ คือ ละลายสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม หยดแอซีติกแอนไฮไดรด์ (Acetic anhydride) และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จะปรากฏสารละลายสีน้ำเงินปนเขียว สีน้ำเงิน สีม่วง หรือ สีเหลือง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดสเตอรอยด์ (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2550)

2.7 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุด และมีพลังงานสูง รวมทั้งอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชัน ส่วนใหญ่การที่อนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนเดี่ยวทำให้เป็นสารที่ไม่เสถียร ส่งผลให้อนุมูลอิสระมีคุณสมบัติคือ ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ โดยอนุมูลอิสระจะเข้าไปแย่งจับกับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่รอบข้าง ก่อให้เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากจะส่งผลต่อการทำลายระบบต่างๆ ในร่างกายให้เสียสมดุล และส่งผลเสียต่อเซลล์ รวมทั้งเป็นสาเหตุของความชราและโรคต่าง ๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ ไข้ข้ออักเสบ และโรคมะเร็ง เป็นต้น สารต้าน (Antioxidant) ทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระไว้ ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันต่างๆ ไม่เกิดขึ้น สามารถป้องกันเซลล์ผิวหนังจากการถูกทำลายจึงใช้ป้องกันหรือชะลอความเหี่ยวย่นของผิวได้ โดยทั่วไปสารอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen compounds) และแคโรนีนอยด์ (Carotenoid) อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระ

ให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และส่วนที่สองคือกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือเบต้าแคโรทีน (β-carotenoid) รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอลซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่สามารถพบได้ในพืชผัก และผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “oxidative stress” ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะ และเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมากอาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่างได้ (จินดาพร คงเดช, 2551)

วิธีการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant assay) มีอยู่ด้วยกันมากมายหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้กันอย่างเพร่หลาย คือ วิธี DPPH radical scavenging assay โดยใช้อนุมูลอิสระที่เรียกว่า DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระที่สามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นได้ สารละลาย DPPH จะเป็นสารละลายสีม่วงดูดกลืนแสงที่ยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) จะทำให้เปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นสารสีเหลือง (ปรียนันท์ บัวสด, 2549) ดังสมการ

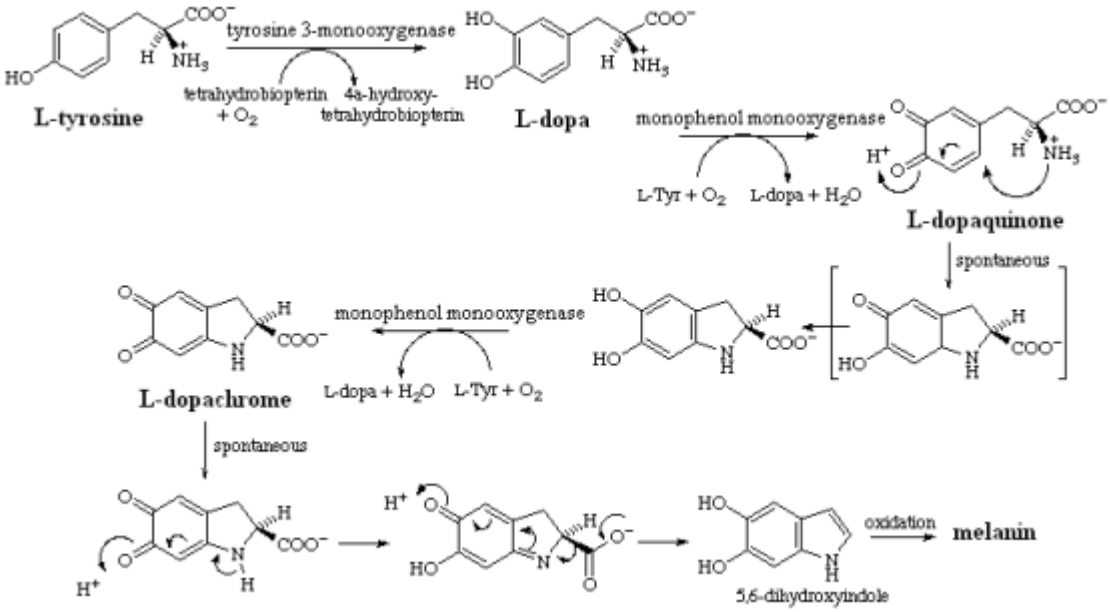


ภาพที่ 2-10 ปฏิกิริยาสีม่วงระหว่าง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl กับ อิเล็กตรอนในโมเลกุลสารอินทรีย์ (RH)

2.8 เอนไซม์ไทโรซิเนส และกระบวนการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (สุพัตรา ม่วงงาม, 2555)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นเอนไซม์โมโนออกซิจิเนส ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (copper monooxygenase enzyme) เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช เชื้อรา แมลง และสัตว์ ในคนพบเอนไซม์ไทโรซิเนสในเมลาโนโซม (melanosome) ซึ่งเป็นโครงสร้างสีน้ำตาลที่ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์เมลาโนไซต์ (melanocyte) บริเวณชั้นล่างสุดของหนังกำพร้าเอนไซม์ไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนัง โดยทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็นสารโดปา ด้วยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน และเปลี่ยนโดปาไปเป็นโดปาควิโนน (dopaquinone) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

จากนั้น โดปาควิโนนจะถูกเปลี่ยนผ่านสารตัวกลางอีกหลายตัว จนเกิดโพลีเมอไรเซชัน ไปเป็นเม็ดสีเมลานิน ภาพที่ 2-11



ภาพที่ 2-11 ขบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินจากไทโรซีน (สุพัตรา ม่วงงาม, 2555)

เมลานินที่ถูกสร้างขึ้นที่ผิวหนังมี 2 ชนิด คือ ชนิดสีดำ หรือสีน้ำตาล เรียกว่ายูเมลานิน (eumelanin) ซึ่งเป็นกลุ่มเม็ดสีที่ไม่ละลายน้ำ และมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (insoluble nitrogenous) มีโครงสร้างหลักเป็น 5,6-dihydroxyindole ส่วนเมลานินอีกชนิดจะมีสีเหลือง หรือสีส้ม เรียกว่า ฟีโอเมลานิน (phaeomelanin) สัดส่วนของ eumelanin และ phaeomelanin จะแตกต่างกันไปในแต่ละบุคคลขึ้นอยู่กับเชื้อชาติและสายพันธุ์ ปัจจุบันมีการนำความรู้เกี่ยวกับกระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับทำให้ผิวขาวขึ้น ลบเลือนฝ้า กระ จุดด่างดำมักมีส่วนผสมของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในกระบวนการสร้างเมลานิน พบว่าสารดังกล่าวมักอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับต้นเนระพูสีไทยทำให้ทราบว่ามีการวิจัยและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดนี้ ดังนี้

งานวิจัยภายในประเทศ

มณี ตันติรุ่งกิจ, พัชราภรณ์ ภูไพบูลย์ และอรวรรณ ชวนตระกูล (2549) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนเหง้าเนระพูสีไทยด้วยเอทานอล และแยกสารกลุ่มสารที่มีขั้ว และไม่มีขั้วโดยการแลกเปลี่ยนระหว่างชั้นของเอทิลอะซิเตต และน้ำในอัตราส่วน 2:1 สารสกัดเอทานอลความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ที่ใช้ทดสอบทุกชนิด แต่ไม่สามารถฆ่าทำลายยีสต์ (*Candida albicans*) สารสกัดเอทิลอะซิเตตที่ระดับความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าทำลายแบคทีเรีย และยีสต์ที่ใช้ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ สารสกัดน้ำที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด คือ 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าทำลาย *Bacillus subtilis* และ *Serratia marcescens* ได้ สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดเหง้าสดด้วยน้ำร้อน ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ คือ 160 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ 5 สายพันธุ์ แต่ไม่สามารถฆ่าทำลาย *S. marcescens* และ *C. albicans*

มยุรฉัตร เกื้อชู, ศิริพรรณ ตันตาคม และธรรมศักดิ์ ทองเกตุ (2552) นำเหง้าแห้งบดละเอียดสกัดด้วยตัวทำละลาย อะซิโตน เอทานอล ในอัตราส่วน พืช ต่อ ตัวทำละลาย 1 ต่อ 7 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 3 วัน นำสารสกัดจากเหง้าเนระพูสีไทยที่สกัดด้วยอะซิโตน และสกัดด้วยเอทานอล จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการกินอาหารของหนอนใยผัก ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการกินอาหารของหนอนใยผักได้ แต่ต้องใช้ในอัตราความเข้มข้นที่สูง โดยสารสกัดจากเหง้าเนระพูสีไทยที่สกัดด้วยอะซิโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และ 0.2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และสารสกัดที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 0.4% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการกิน (AFI) เท่ากับร้อยละ 29.39±2.16, 32.20±3.47 และ 31.81±1.83 ตามลำดับ

ไชยยง รุจจนเวท และดวงพร อมรเลิศพิศานต์ (2556) ศึกษาการออกฤทธิ์ระงับการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร โดยนำเหง้าเนระพูสีไทยที่บดละเอียดสกัดด้วยเอทานอล 95 % แช่ค้างคืน กรอง และระเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 55 °C นำสารสกัดไปทดสอบในหนูขาวที่ชักนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย อินโดเมธาซิน เอทานอล และความเครียด และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร พบว่า สารสกัดเอทานอล

ขนาด 125 และ 500 มิลลิกรัม ออกฤทธิ์ระงับการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในทุกการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.01$) และสามารถยับยั้งการหลั่งกรดได้บางส่วน

ตารางที่ 2-2 ผลกระทบของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยบนแผลในกระเพาะอาหารในหนู

Group		Gasreic ulcer inducer					
		Indomethacin		HCl/EtOH		Stress	
		Ulcer index (mm)	I (%)	Ulcer index (mm)	I (%)	Ulcer index (mm)	I (%)
Control		7.5±1.3		101.0±11.9		9.9±0.9	
TCE mg/Kg	250	1.5±0.6**	80	29.0±7.5**	71	4.7±0.8**	52
TCE mg/Kg	500	0.3±0.2**	96	6.9±2.2**	93	1.8±0.7**	82

Note : data expressed as mean ± S.E.M. (n = 8)

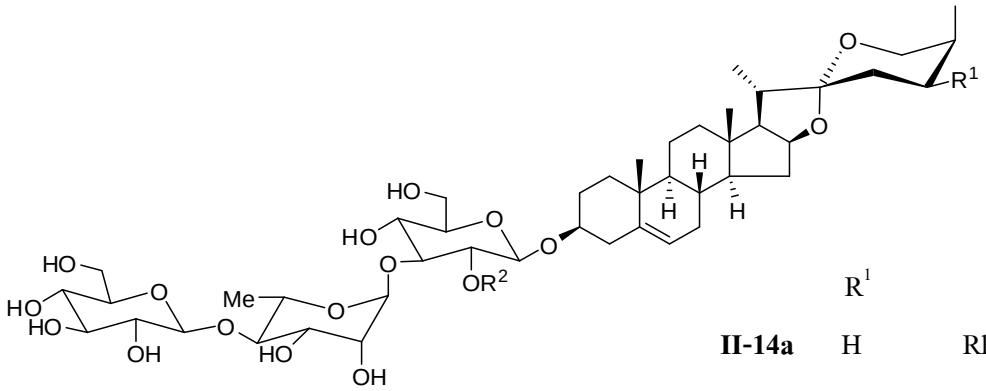
** $p < 0.01$ significantly different from the control group

I (%) = inhibition of ulcer formation expressed as percentage

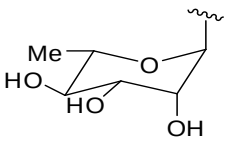
กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ (2557) ศึกษาตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu ในส่วนสกัดเอทานอล และส่วนสกัดน้ำ ผลการศึกษาพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 61.9±0.5 และ 33.9±0.6 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยวิธีวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E_2 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโพพอลิแซกคาร์ไรด์ พบว่า ส่วนสกัดเอทานอล และส่วนสกัดน้ำ มี ร้อยละยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ เท่ากับ 23.5±10.6 และ 17.1±4.6 ตามลำดับ ส่วนสกัด เอทานอล มี ร้อยละยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 เท่ากับ 70.8±9.4 ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดของพืชโดยวิธี MTT ส่วนสกัดเอทานอล และส่วนสกัดน้ำ มี ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ 91.2±4.7 และ 89.9±4.8 ตามลำดับ

งานวิจัยต่างประเทศ

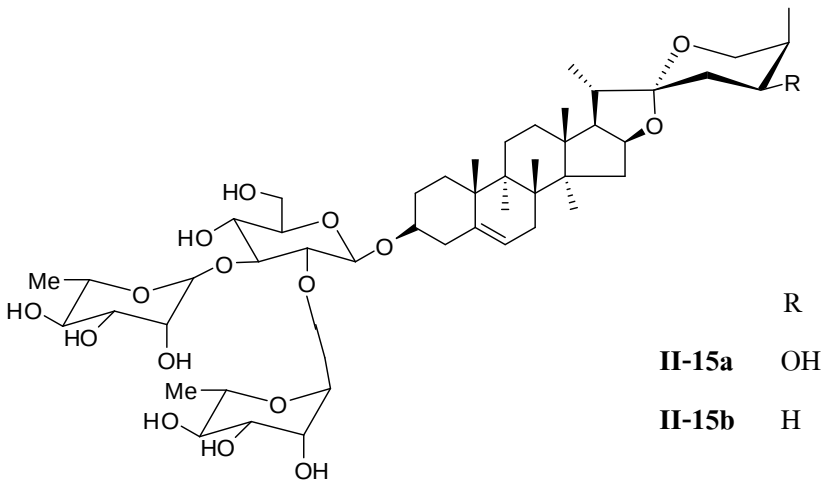
Akihito et al. (2002) สกัดเนระพูสีไทยด้วยเมทานอล แยกสารบริสุทธิ์โดยใช้ (porous-polymer poly-styrene resin (Diaion HP-20) column ชะด้วยเมทานอลสารที่แยกได้ คือ Spirostanol Saponin **(II-14a-c)** และ Saponin **(II-15a-b)** ซึ่งทั้ง 5 สาร ออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.8 และ 2.1 ไมโครโมลาร์ ใช้ etoposide เป็น positive control ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 3.7 ไมโครโมลาร์



	R^1	R^2
II-14a	H	Rha
II-14b	OH	Rha
II-14c	H	H



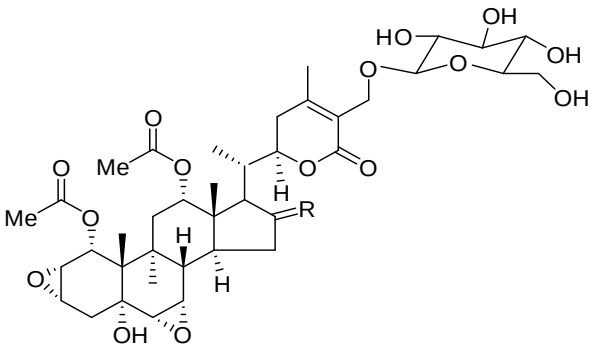
Rha =



	R
II-15a	OH
II-15b	H

ภาพที่ 2-12 โครงสร้างของ Saponin **(II-14a-c)** และ **(II-15a-b)**

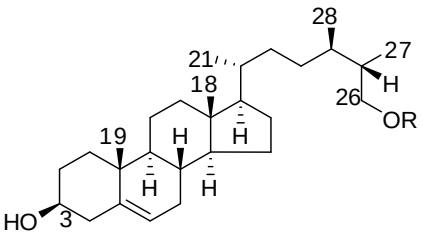
Akihito et al. (2003) ใช้ส่วนเหง้าแห้งของเนระพูสีไทย จำนวน 7.3 กิโลกรัมสกัดโดยใช้ความร้อนด้วยเมทานอล ได้สารสกัดหยาบเมทานอล 630 กรัม แยกสารด้วย Diaion HP- 20 column ชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 30%เมทานอลต่อเอทานอล , 50% เมทานอลต่อเอทานอล และเมทานอล (แต่ละระบบจำนวน 4 ลิตร) แยกส่วนของสารสกัด 50% เมทานอล จำนวน 70 กรัม โดยใช้ Silica gel column (ขนาด 200-400 mesh) ชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลายผสม คลอโรฟอร์ม-เมทานอล (9:1, 4:1, 3:1, 2:1, และ 1:1; 4 L), และเมทานอล แยกส่วนคลอโรฟอร์ม-เมทานอล (4:1) จำนวน 10 กรัม โดยใช้ ODS Silicagel ชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย เมทานอล-น้ำ (1:2) ได้สาร Chantriolide A **(II-16a)** จำนวน 33 มิลลิกรัม และ Chantriolide B **(II-16b)** จำนวน 43 กรัม

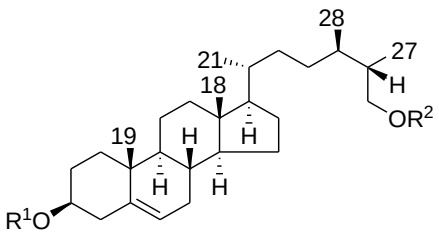


	R
II-16a	O
II-16b	α-H, β-OH

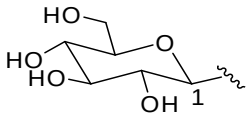
ภาพที่ 2-13 โครงสร้างของ Chantriolide A **(II-16a)** และ Chantriolide B **(II-16b)**

Akihito et al. (2005) ใช้ส่วนเหง้าแห้งของเนระพูสีไทย จำนวน 7.3 กิโลกรัมสกัดโดยใช้ความร้อนด้วยเมทานอล ได้สารสกัดหยาบเมทานอล 630 กรัม แยกสารด้วย Diaion HP-20 column ชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 30% เมทานอล ต่อ เอทิลอะซิเตต, 50% เมทานอล ต่อ เอทิลอะซิเตต, และเมทานอล (แต่ละระบบจำนวน 4 ลิตร) แยกส่วนของสารสกัด เมทานอล จำนวน 115 กรัม โดยใช้ Silica gel column ชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลายผสม คลอโรฟอร์ม-เมทานอล (9:1, 4:1, 3:1, 2:1, และ 1:1; แต่ละระบบจำนวน 4 ลิตร) และเมทานอล จำนวน 4 ลิตร แยกส่วน คลอโรฟอร์ม-เมทานอล (4:1) จำนวน 40 กรัม แยกสารต่อโดยใช้ ODS Silica gel ชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย เมทานอล-น้ำ (1:2) ได้สารบริสุทธิ์ Giycosides of the campesterol derivative **(II-17a-h)** จำนวน 8 ชนิด

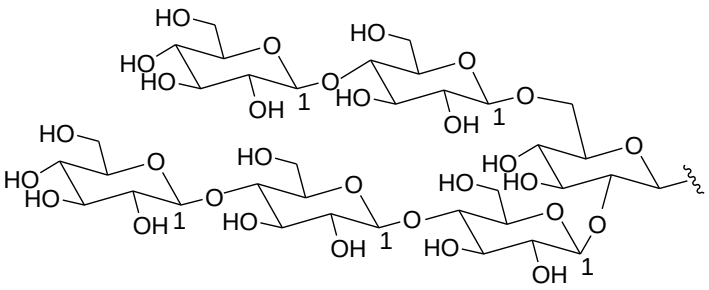




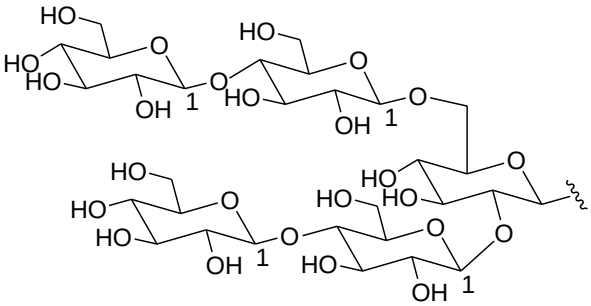
R			R^1	R^2		R^1	R^2
II-17a	H	**II-17b**	Glc	S_1	**II-17f**	Glc	S_3
		II-17c	Glc	S_2	**II-17g**	Glc	S_4
		II-17d	H	S_2	**II-17h**	Glc	S_5
		II-17e	Glc	S_6			



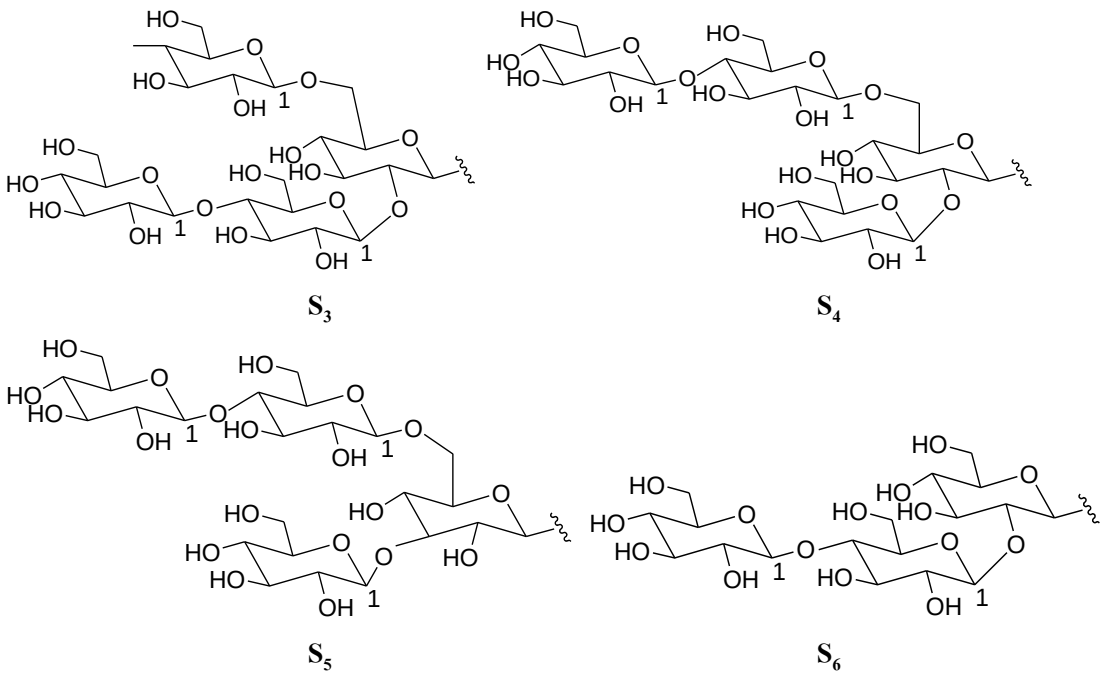
Glc



S_1

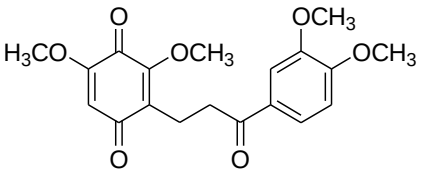


S_2



ภาพที่ 2-14 โครงสร้างของ Giycosides of the campesterol derivative **(II-17a -II-17h)**

Jiangnan et al. (2010) นำเหง้าเนระพูสีไทยแห้งบดละเอียด ใช้เทคนิคการสกัดแบบ supercritical CO_2 กับเมทานอล ได้สารใหม่ ชื่อ Evelynin **(II-18)** ออกฤทธิ์ต่อต้านเซลล์มะเร็ง จำนวน 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งผิวหนัง ชนิด MDA-MB-435, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231, เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก เซลล์มะเร็งปากมดลูก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.1, 3.9, 4.6 และ 7. 3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ



(II-18)

ภาพที่ 2-15 โครงสร้างของ Evelynin **(II-18)**

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

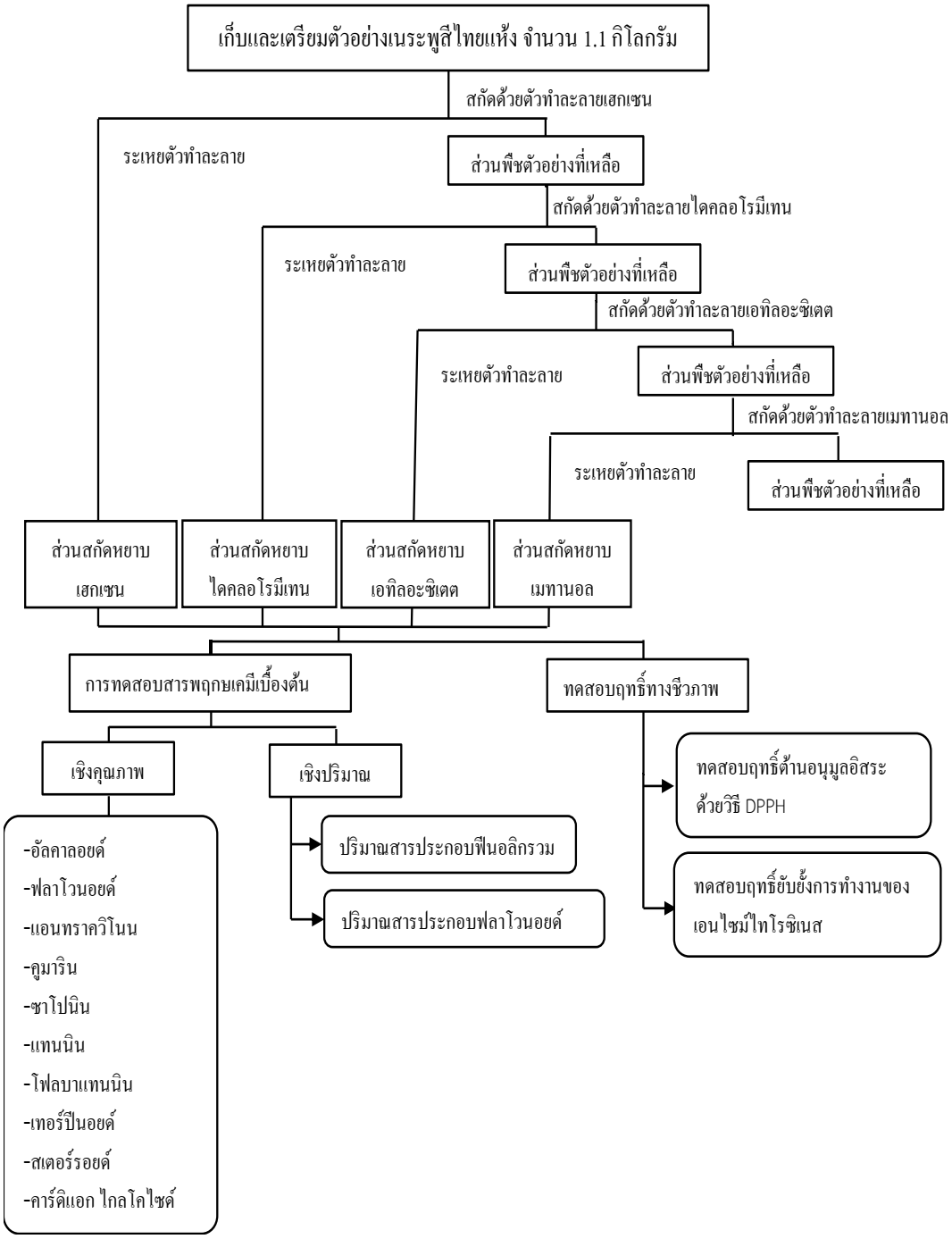
1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)
2. เครื่อง UV-Vis spectrophotometer
3. เครื่องดูดจ่ายสารละลายปิเปต (Micropipette)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
5. เครื่อง Radial chomatography
6. เครื่องอังไอน้ำ (Water Bath)
7. เครื่อง Microplate Reader
8. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยน้ำ
9. บีกเกอร์ (beakers) ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
10. กรวยกรอง (glass funnel)
11. กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 250 มิลลิลิตร
12. ขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
13. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flasks) ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
14. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
15. แท่งแก้วคนสาร (stairring rod)
16. ปากคีบ (forcep)
17. แผ่นให้ความร้อน (hot plate)
18. หลอดทดลอง (test tube)
19. กระบอกตวง (cylinders) ขนาด 10, 100 และ 250 มิลลิลิตร
20. ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip)
21. กระจกนาฬิกา (watch glass)
22. หลอดหยด (dropper)
23. ช้อนตักสาร (Spatula)
24. ขวดบรรจุสารขนาดเล็ก

25. ที่ตั้งหลอดทดลอง (Test tube rack)
26. โหลแก้วสำหรับแช่สาร

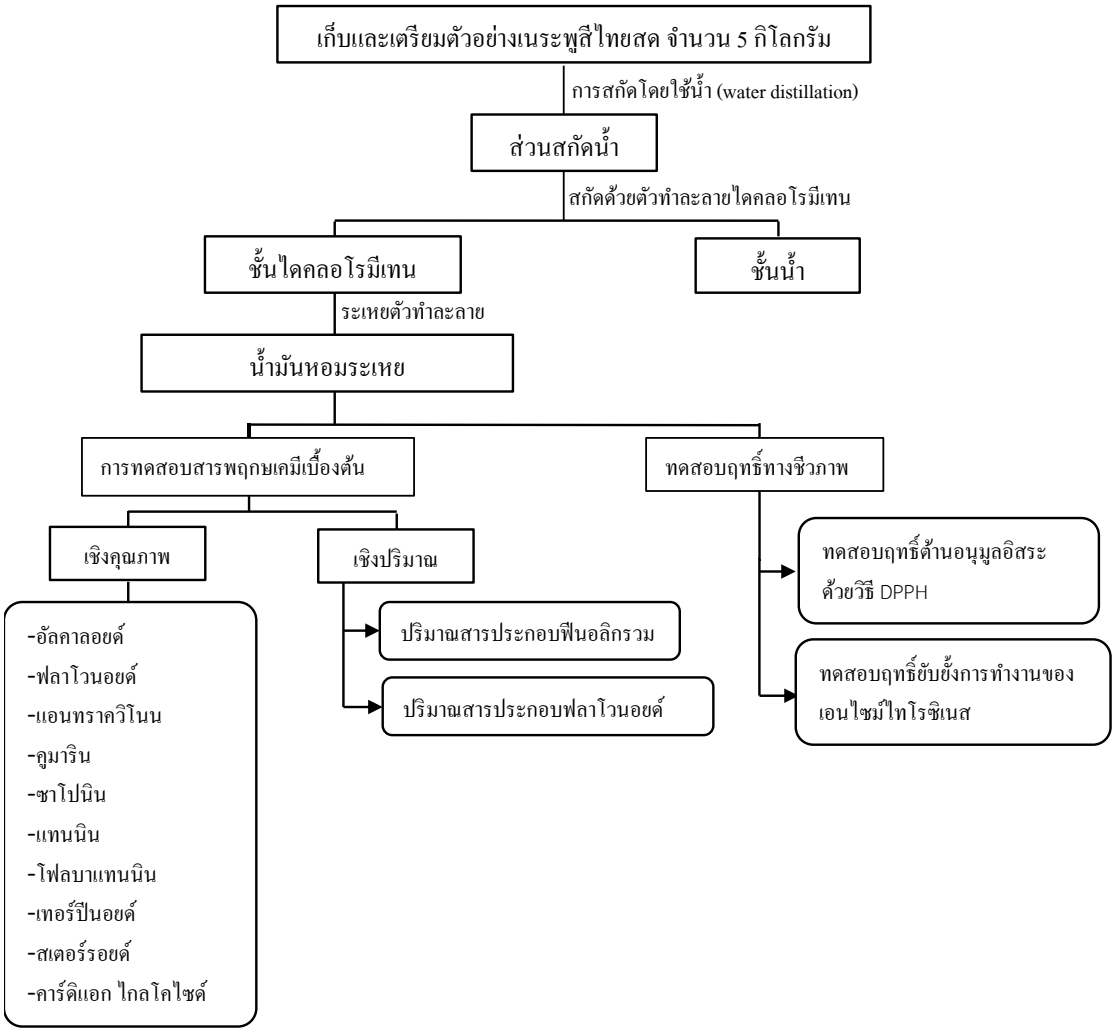
3.1.2 สารเคมี

1. เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate, $C_2H_5COOCH_3$, commercial grade)
2. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2 commercial grade)
3. เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}, commercial grade)
4. เมทานอล (Methanol, CH_3OH)
5. คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$)
6. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
7. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4)
8. กรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid, CH_3COOH)
9. แอมโมเนีย (Ammonia, NH_3)
10. เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH)
11. แผ่นแมกนีเซียม (Mg)
12. โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ (anh.Na_2SO_4)
13. กรดแกลลิก (Gallic acid)
14. วิตามินซี (Ascorbic acid)
15. DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)
16. เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$)
17. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH)
18. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
19. แผ่น TLC normal silica gel 60 F_{254} 25 แบบ aluminium sheet 20x20 cm
20. น้ำกลั่น (Distill water)
21. เคอร์ซิติน (Quercetin)
22. น้ำยาทดสอบดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent)
23. น้ำยาทดสอบฟอลิน ซิโอแคลตู (Folin-Ciocalteu reagent)

3.2 แผนการดำเนินงานวิจัย



ภาพที่ 3-1 แผนผังขั้นตอนการสกัดเหง้าเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต และเมทานอล ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ



ภาพที่ 3-2 แผนผังขั้นตอนการสกัดเหง้าเนระพูสีไทยโดยใช้น้ำ (water distillation)
การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น และ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่าง

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เหง้าเนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri*) เก็บจากตำบลสหกรณ์นิคม อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี ในช่วงเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2558

3.3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ

1) นำเหง้าของเนระพูสีไทย จำนวน 5 กิโลกรัม ตากผึ่งลมให้แห้งในที่อากาศถ่ายเทสะดวก นำไปบดให้ละเอียด และนำส่วนที่บดไปชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (1.1 กิโลกรัม) สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ปริมาตรครั้งละ 1 ลิตร ด้วย ที่อุณหภูมิห้อง เปลี่ยนตัวทำละลายทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน สกัดจนสีของตัวทำละลายใสไม่มีสี และกรองสารละลายโดยใช้กรวยแก้วและสำลี นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (Hexane extract) ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบ จากนั้นสกัดส่วนของเหง้าเนระพูสีไทยต่อโดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane extract) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate extract) และสารสกัดหยาบเมทานอล (Methanol acetate extract) ตามลำดับ บันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบ เพื่อคำนวณหาร้อยละของสารสกัด (%yield) เก็บสารสกัดในขวดสีชา และแช่ไว้ในตู้เย็น

2) นำเหง้าของเนระพูสีไทยสดจำนวน 5 กิโลกรัม มาทำความสะอาดโดยการล้างน้ำ และซับให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปสกัดด้วยน้ำ (water distillation) ปริมาตร 5 ลิตร นำสารสกัดน้ำที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำ มาสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1 ลิตร แยกชั้นระหว่างชั้นน้ำกับชั้นไดคลอโรมีเทนในกรวยแยก เก็บชั้นไดคลอโรมีเทน ระเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนออก เก็บสารสกัดใส่ขวดตัวอย่างที่ชั่งน้ำหนักไว้ก่อนแล้ว บันทึกน้ำหนักของสารสกัด คำนวณผลของร้อยละของสารสกัดที่กลั่นได้ (%yield) และเก็บสารสกัดในขวดสีชาแช่ไว้ในตู้เย็น

3.3.3 การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเฮกเซน (Hexane extract) สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane extract) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate extract) และสารสกัดหยาบเมทานอล (Methanol acetate extract) และน้ำมันหอมระเหย จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri* Andre.) โดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolies) ออกเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน

แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตอร์รอยด์ และคาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ดังนี้ (Ayoola et al., 2008)

1. การตรวจสอบสารแอคาลอยด์ (Alkaloids) ด้วยรีเอเจนต์ดราเจนดอร์ฟ (Dragendroff's reagent)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก (10% H_2SO_4) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ (Water bath) เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ไปหยดสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) จำนวน 5 หยด เขย่า และสังเกตสีโดยถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบ สารในกลุ่มแอลคาลอยด์

2. การตรวจสอบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาไซยานิดิน (cyanidin reaction)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม เติมสารละลาย เอทานอล (50% C_2H_5OH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1 ชิ้น และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCI) จำนวน 5 หยด เขย่า และไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ เป็นเวลา 5 นาที และสังเกตสี ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบ สารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์

3. การตรวจสอบสารแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก (10% H_2SO_4) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า และสังเกตสีโดย ถ้าปรากฏสารเป็นสีชมพู่แดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบสารในกลุ่มแอนทราควิโนน

4. การตรวจสอบสารคูมาริน (Coumarin)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม เติมสารละลายเอทานอล (50% C_2H_5OH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6 M NaOH) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และสังเกตสีโดย ถ้าสารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบสารในกลุ่มคูมาริน

5. การตรวจสอบสารซาโปนิน (Saponins) ด้วยวิธีการทดสอบฟอง (froth test)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ เป็นเวลา 5 นาที เขย่าอย่างแรง และสังเกตการณ์เกิดฟอง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่า พบสารในกลุ่มซาโปนิน

6. การตรวจสารแทนนิน (Tannins) ด้วยวิธีเฟอร์ริก คลอไรด์ (Ferric chloride test)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริก คลอไรด์ (1% $FeCI_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า และสังเกตสีของสารละลาย ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบ สารในกลุ่มแทนนิน

7. การตรวจสอบสารโฟลบาแทนนิน (Phlobatannins)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากกรอง เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (10% HCI) จำนวน 5 หยด เขย่า นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ เป็นเวลา 5 นาที และสังเกตสีของสารละลาย ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบสารในกลุ่มโฟลบาแทนนิน

8. การตรวจสอบสารเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) ด้วยวิธีการทดสอบแซลโควสกิ (Salkowski test)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม ละลายสารด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรเขย่า และกรอง ส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป สังเกตการเปลี่ยนแปลงบริเวณรอยระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดฟิวริก ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดฟิวริกแสดงว่าพบสารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์

9. การตรวจสอบสารสเตอร์รอยด์ (Steroids) โดยใช้ปฏิกิริยาลีเบอร์แมนน์เบอร์ชาร์ด (Liebermann-Burchard reaction)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัมละลายสารด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อย ๆ เติมกรดแกลเซียลแอซีติก (Glacial acetic acid) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 3 หยด และสังเกตสีของสารละลาย ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสารในกลุ่มสเตอร์รอยด์

10. การตรวจสอบสารคาร์ดิแอก ไกลโคไซด์ (Cardiac glyosides)

ชั่งสารสกัด ปริมาณ 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่า และกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (1% $FeCI_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า เติมกรดแกลเชียลแอซิติก (Glacial acetic acid) จำนวน 5 หยด เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไป สังเกตการเปลี่ยนแปลงบริเวณรอยระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดฟิวริก ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบสารในกลุ่มคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

3.3.4 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Majhenic Skerget and Knez (2007) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ สารประกอบฟีนอลิกรวมจะทำปฏิกิริยากับ Folin-ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วยสาร phosphomolybdic-phosphotungstic acid สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบฟีนอลิกรวม เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

ผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้นข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร/ปริมาตร ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mg GAE/g dried extract)

3.3.5 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric เป็นวิธีการดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennnat, Pourrat and Legret (1994) โดยใช้เคอร์ซิติน(quercetin) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการ คือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะใช้ phenolic hydroxyl groups ทำปฏิกิริยากับ $AlCl_3$ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซับซ้อนที่มีสีเหลือง และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (ความเข้มข้น 0.1-0.0001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมีเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมบูรณ์ของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mg QE/g dried extract)

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสะโดยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสะโดยวิธี DPPH radical scavenging เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Braca, Sortino, Politi, Morelli and Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid), เคอร์ซิติน (Quercetion) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) จะเป็นสารละลายสีม่วง และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จะทำให้สารละลายสีม่วงของ DPPH จางลงจนเป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน และไม่แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวนหาค่าร้อยละของสารอนุมูลอิสระ (%DPPH radical inhibition)

$$\% \text{ DPPH free radical} = \frac{[\,(A-B)\,]}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

3.3.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-tyrosinase assay)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีดัดแปลงมาจาก Masuda, Yamashita, Takeda and Yonemori (2005) โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน มีหลักการคือ เอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถเกิดปฏิกิริยา

ออกซิเดชันเปลี่ยน L-DOPA เป็นสารที่มีสีน้ำตาล เรียกว่า Dopachrome และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.02 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นเริ่ม 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย sodium phosphate buffer (pH 6.8) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from Mushroom) ความเข้มข้น 100 ยูนิต/มิลลิลิตร ใน sodium phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในจานหลุ่ม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-tyrosine หรือ L-DOPA ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม เขย่าให้เข้ากัน บ่มอุณหภูมิห้องต่อเป็นเวลา 10 นาที และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วย เครื่อง Microplate Reader คำนวนหาค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (%Tyrosinase inhibition) จากสูตร ดังนี้

$$\%\ \text{Tyrosinase inhibition} = \frac{[\ (A-B)\ ]}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

3.3.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยเทคนิครงเลขผิวบางแบบเหวี่ยง (Centrifugal Thin-Layer Chromatography)

3.3.9.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกสาร

จุดสารสกัดหยาบ ลงบนแผ่น TLC โดย จุ่มแผ่น TLC ในเฟสเคลื่อนที่แล้วส่องดูการเคลื่อนที่ของสารภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกโคมาโทแกรมโดยใช้ดินสอวงบนตำแหน่งของสารที่ปรากฏบน TLC ซึ่งจุดของสารจะต้องค่อย ๆ เคลื่อนที่ขึ้น และแยกออกจากกัน แสดงว่าเฟสเคลื่อนที่นั้นเหมาะสมต่อการแยกสาร จากนั้นฉีดพ่นด้วย anisalaldehyde และนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อน จนแผ่น TLC เปลี่ยนสี บันทึกผล

3.3.9.2 การเตรียม plate

ชั่ง silica gel PF 254 จำนวน 65 กรัม ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่เย็น ปริมาตร 130 มิลลิลิตร เขย่าให้สารผสมกันเป็นเนื้อเดียวกัน เท silica gel ลงใน plate จากนั้นค่อยๆ เคาะเพื่อไล่ฟองอากาศออก ตั้ง plate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน หลังจาก

นั้นทำให้ความหนาของ plate หนา 2 มิลลิเมตร และอบ plate ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

3.3.9.3 การแยกสาร

(1) ล้างเครื่องโครมาโททรอนด้วยอะซีโตน และเฮกเซน

(2) ใส่ plate ลงในเครื่องโครมาโททรอน หยดสารสกัดลงบริเวณตรงกลางของ plate (ให้มีความกว้างแคบที่สุด) ชะด้วยตัวทำละลายทีละ 50 มิลลิลิตร ส่องดูการเคลื่อนที่ของสารภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และเก็บแต่ละ fraction ตามการมองเห็นแถบแสงอุลตร้าไวโอเลต

(3) นำสารละลายในแต่ละ fraction ที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก แล้วนำมาทดสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าเป็น fraction เดียวกัน ปล่อยให้แห้งจากนั้นชั่งน้ำหนักของแต่ละ fraction และคำนวณหา %recovery

3.3.9.4 การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

เตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงกระบอกที่สะอาด และมีฝาปิด ใส่กระดาษกรองบุไว้ด้านในของขวด ใส่ตัวทำละลาย ปิดฝาเพื่อให้ภายในขวดอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย แต้มสารโดยใช้หลอดแคปปิลารีบนแผ่น TLC ที่เส้นเริ่มต้นจากนั้นนำแผ่น TLC ไป develope ในขวดที่เตรียม นำแผ่น TLC ออกจากภาชนะเมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงขอบด้านบนของ TLC แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายบนแผ่น TLC ระเหยจนแห้ง นำแผ่น TLC ไปส่องด้วยไปส่องด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร ซึ่งจะเห็นจุดสว่างเกิดขึ้น แล้วฉีดพ่นด้วย DPPH reagent ผลการทดสอบถ้าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะฟอกจางสีม่วงของ DPPH reagent

บทที่ 4
ผลการทดลอง และอภิปราย

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ จากส่วนเหง้าของเนระพูสีไทย ซึ่งมีผลการทดลองเป็นดังนี้

4.1 การสกัด

สารสกัดหยาบเนระพูสีไทยจากวิธีการสกัดทั้ง 2 วิธี คือวิธีการแช่หมัก และวิธีการกลั่นด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล มีร้อยละผลผลิต (% Yield) มากที่สุด คือ ร้อยละ 7.0325 (ตารางที่ 4-1) สำหรับน้ำหนัก และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด แสดงในตารางที่ 4.1 และ ภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักสารสกัดหยาบ และร้อยละผลผลิต (%Yield) และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทย

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสาร		ร้อยละผลผลิต	ลักษณะทางกายภาพ
		พืช (กรัม)	สารสกัดหยาบ (กรัม)		
วิธีการแช่หมัก	Hexane	1,100	1.5673	0.1425	ของเหลวหนืด สีเหลืองอ่อน
(พืชแห้งบดละเอียด)	CH_2Cl_2	1,100	3.9118	0.3556	ของเหลวหนืด สีเหลืองเข้ม
	EtOAc	1,100	4.9349	0.4486	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลอ่อน
	MeOH	1,100	77.3577	7.0325	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม
วิธีการกลั่นด้วยน้ำ (พืชสด)	H_2O	8,000	2.9238	0.0365	ของเหลว สีเหลืองอ่อน

ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด

4.2 การทดสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น เป็นการทดสอบอย่างหยาบ ๆ เพื่อใช้คาดคะเนว่าพืชที่นำมาทดสอบมีสารกลุ่มใดบ้างเป็นองค์ประกอบ ซึ่งการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของเนระพูสีไทยนั้น แบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ ออกเป็น 10 กลุ่ม ได้แก่ แอลคาลอยด์ แอนทราควิโนน ฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ และซาโปนิน โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008)

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้นของเนระพูสีไทย

สารพฤกษเคมี	สารสกัดหยาบเนระพูสีไทย					หมายเหตุ
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทิลอะซีเตต	เมทานอล	น้ำมันหอมระเหย	
แอลคาลอยด์	-	-	-	-	-	+ ตะกอนสีแดงส้ม
ฟลาโวนอยด์	+	+	+	+	+	+ สารละลายสีเหลืองเข้ม
แอนทราควิโนน	-	-	-	-	-	+ สารละลายสีชมพูอมแดง
คูมาริน	+	+	-	-	+	+ สารละลายสีเหลืองเข้ม
ซาโปนิน	-	-	+	+	-	+ เกิดฟองถาวรนาน 15 นาที
แทนนิน	-	-	-	-	-	+ สารละลายสีเขียวดำ
โฟลบาแทนนิน	-	-	-	-	-	+ สารละลายสีเขียวดำ
เทอร์ปีนอยด์	+	-	+	+	+	+ วงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดกับชั้นกรด
สเตอร์รอยด์	-	+	-	+	-	+ สารละลายสีน้ำเงินเขียว
คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	+	+	+	+	+	+ วงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดกับชั้นกรด

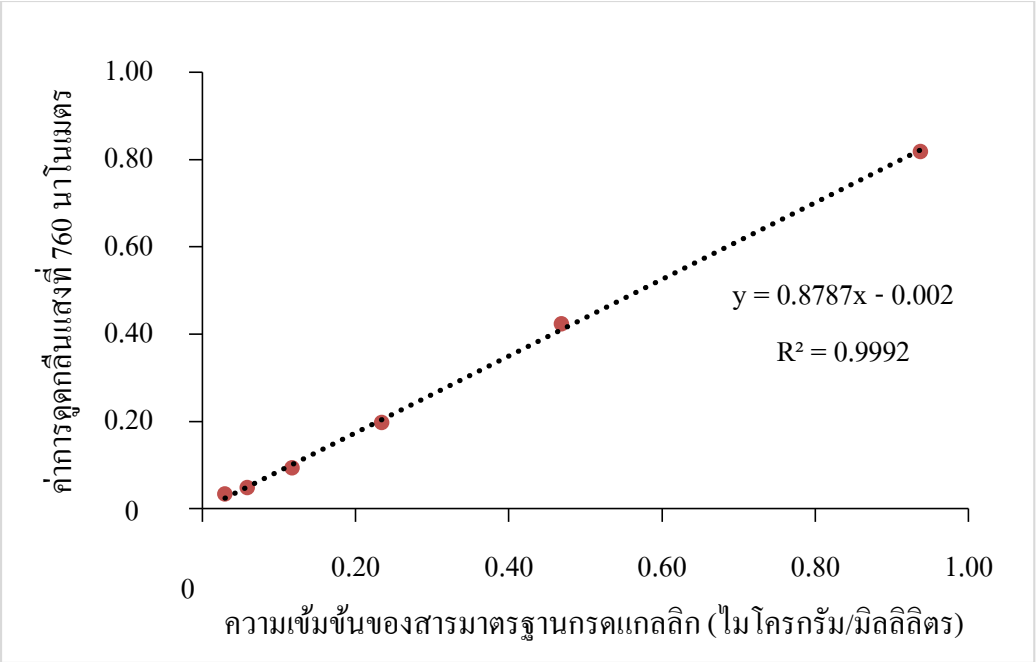
หมายเหตุ (-) คือ Negative test

(+) คือ Positive test

การตรวจสอบสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทย พบสารพฤกษเคมี 6 ชนิด คือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนพบสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ คูมาริน เทอร์ปีนอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คูมาริน สเตียรอยด์ และ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน เทอร์ปีนอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ และน้ำมันหอมระเหย พบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คูมาริน เทอร์ปีนอยด์ และ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ดังแสดงในตารางที่ 4-2

4.3 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Majhenic, Skerget and Knez (2007) ซึ่งใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้ กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 0.08787x - 0.002$, $R^2 = 0.9992$) ดังแสดงในภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (y = 0.08787x - 0.002) สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากเหง้าเนระพูสีไทย ได้ผลดังตารางที่ 4.3 โดยรายงาน ในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (mgGAE/g)

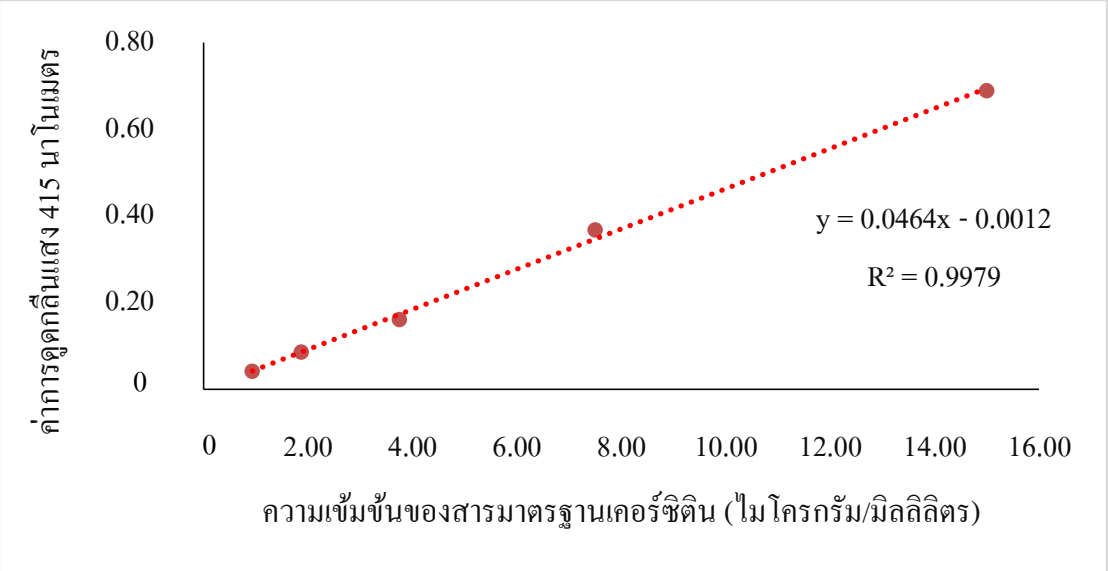
ตารางที่ 4-3 ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเนระพูสีไทย

สารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทย	**ปริมาณฟีนอลิกรวม (mgGAE /g extract)**
เฮกเซน	2.023±0.02
ไดคลอโรมีเทน	2.901±0.03
เอทิลอะซีเตต	5.202±0.02
เมทานอล	2.604±0.14
น้ำมันหอมระเหย	2.203±0.24

ผลการหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทยทั้ง 5 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (5.202±0.02 mgGAE/g) รองลงมาได้แก่ สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (2.901±0.03 mgGAE/g) สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (2.604±0.14 mgGAE/g) น้ำมันหอมระเหย (2.203±0.24 mgGAE/g) และสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (2.023±0.02 mgGAE/g) ตามลำดับ

4.4 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content: TFC)

โดยใช้วิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Arvouet-Grand, Vennat, Pourrat and Legret (1994) ซึ่งใช้เคอร์ซิติน (Qurecetin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟมาตรฐานสารละลายเคอร์ซิติน ดังภาพที่ 4-4 ($y=0.0464x - 0.0012$, $R^2 = 0.9979$)



ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน

จากกราฟมาตรฐานสารละลายเคอร์ซิติน (y = 0.0464x - 0.0012) สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทยทั้ง 5 ชนิด คือ สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย ได้ผลดังตารางที่ 4-4 โดยรายงานในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (mgQE/g)

ตารางที่ 4-4 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content: TFC) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเนระพูสีไทย

สารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทย	**ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mgQE/g extract)**
เฮกเซน	10.264±0.26
ไดคลอโรมีเทน	6.701±0.43
เอทิลอะซีเตต	21.586±3.02
เมทานอล	33.638±1.27
น้ำมันหอมระเหย	13.023±1.67

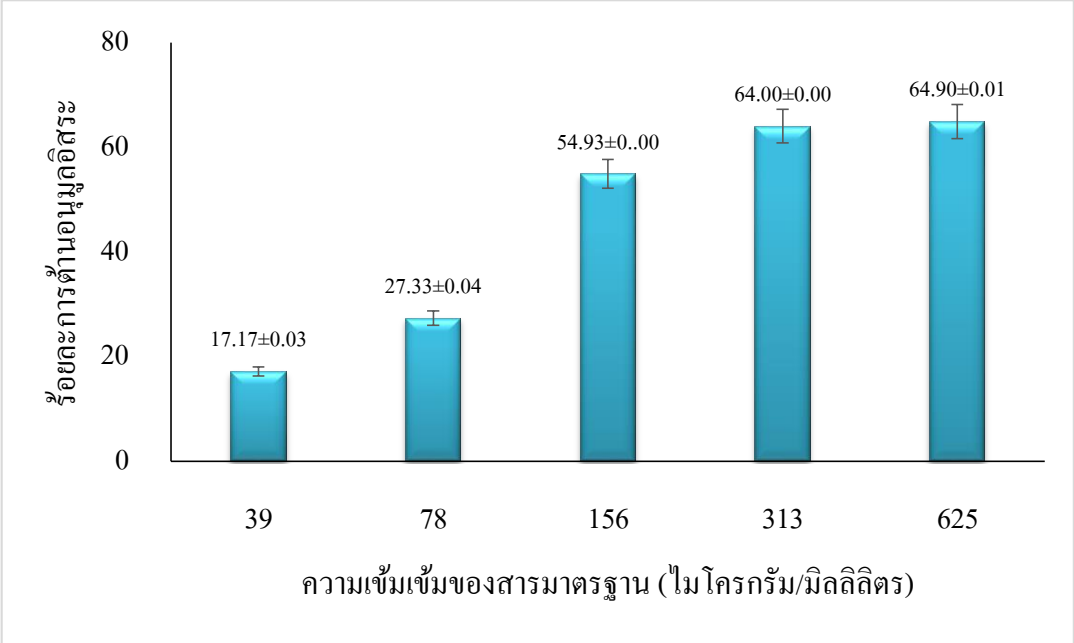
จากผลการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทยทั้ง 5 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (33.638±1.27 mgQE/g) รองลงมาได้แก่ สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตต (21.586±3.02 mgQE/g) น้ำมันหอมระเหย (13.023±1.67 mgQE/g) สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (10.264±0.26 mgQE/g) และสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (6.701±0.43 mgQE/g) ตามลำดับ

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging

เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธี ของ Braca, Sortino, Politi, Morelli, and Mendez (2002) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ได้ผลการทดลองแสดงเป็นค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH Radical Inhibition) ดังตารางที่ 4-5 และ ภาพที่ 4-4

ตารางที่ 4-5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มเข้มของสารสกัด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	**ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)**
625	64.90±0.01
313	64.00±0.00
156	54.93±0.00
78	27.33±0.04
39	17.17±0.03



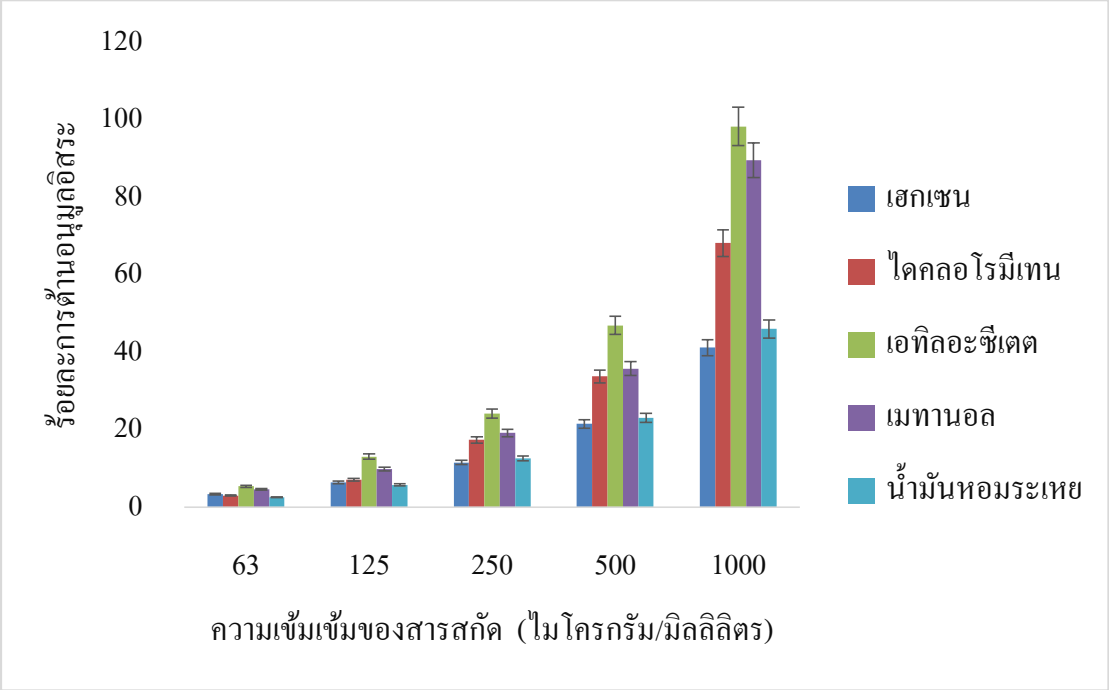
ภาพที่ 4-4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ทำการทดลองเช่นเดียวกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่า ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตต มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดเท่ากับ 98.32±0.73 รองลงมาคือ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (ร้อยละ 89.58±0.10) สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (ร้อยละ 68.17±1.93) น้ำมันหอมระเหย (ร้อยละ 45.97±2.37) และสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (ร้อยละ 41.18±0.82) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-5

ตารางที่ 4-6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากเหง้าเนระพูสีไทย

ความเข้มเข้มของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)		
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทิลอะซีเตต
1,000	41.18±0.82	68.17±1.93	98.32±0.73
500	21.45±0.40	33.72±1.75	46.90±1.33
250	11.51±2.86	17.31±0.59	24.12±3.51
125	6.33±0.42	7.01±0.26	13.01±4.01
63	3.29±1.95	2.92±0.80	5.36±0.29

ความเข้มเข้มของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)	
	เมทานอล	น้ำมันหอมระเหย
1,000	89.58±0.10	45.97±2.37
500	35.72±0.39	23.02±0.43
250	19.13±0.17	12.53±0.29
125	9.73±0.10	5.69±0.55
63	4.58±1.61	2.48±0.05



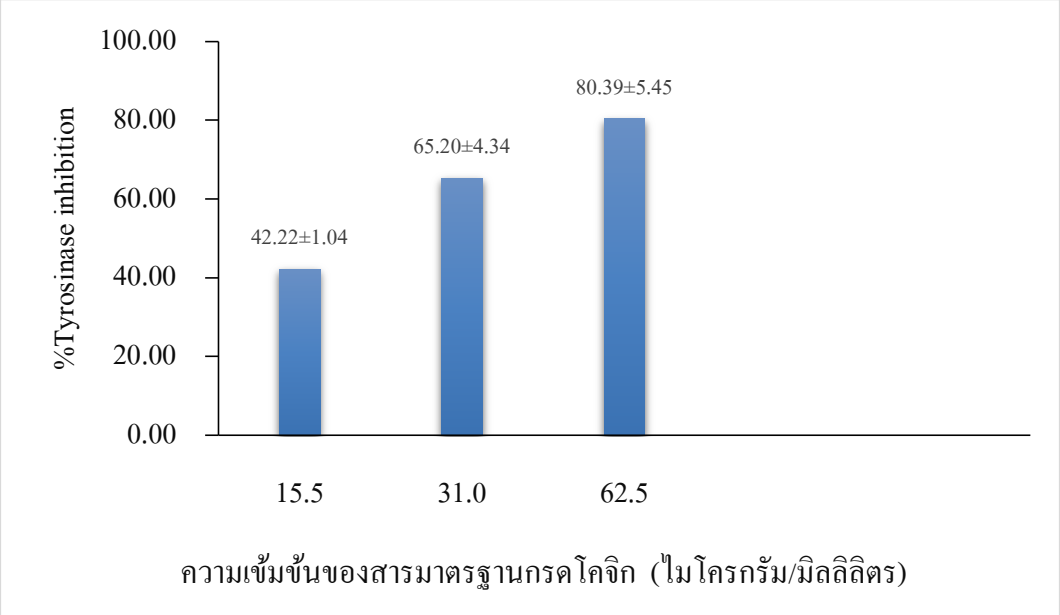
ภาพที่ 4-5 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

4.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Ttyrosinase Aassay) โดยใช้ *L*-DOPA เป็นซับสเตรต

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Masuda, Yamashita, Takeda, and Yonemori (2005) ใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังในตารางที่ 4-7 ,4-8 และภาพที่ 4-6,4-7

ตารางที่ 4-7 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยใช้ *L*-DOPA เป็นซับสเตรต

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	**ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)**
62.5	80.39±1.04
31.0	65.20±4.34
15.5	42.22±5.45



ภาพที่ 4-6 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยใช้ *L*-DOPA เป็นซับสเตรต

ตารางที่ 4-8 ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทย ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้ *L*-DOPA เป็นซับสเตรต

สารสกัดหยาบ	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)
เฮกเซน	-3.19±2.73
ไดคลอโรมีเทน	-9.68±5.03
เอทิลอะซีเตต	-20.52±3.89
เมทานอล	-13.34±7.57
น้ำมันหอมระเหย	-20.47±2.67

จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต พบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าทุกสารสกัดหยาบไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

4.7 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเหง้าเนระพูสีไทย

4.7.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

การแยกสารสารหยาบชั้นเฮกเซน จำนวน 723.9 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นสารสีเหลืองอ่อน ใช้วิธีการการแยกสารโดยเทคนิครงเลขผิวบางแบบเหวี่ยง (Centrifugal Thin-Layer Chromatography) เก็บ fraction ได้ทั้งหมด 25 fractions รวม fraction ที่มีรูปแบบ TLC เหมือนกันได้ทั้งหมด 9 fractions %recovery เท่ากับ 91.26% ทดสอบการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระบนแผ่น TLC ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-9

ตารางที่ 4-9 ผลการแยกสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (TC-hexane) จำนวน 723.9 มิลลิกรัม

กลุ่มสาร	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)	ร้อยละผลผลิต	การเรืองแสง UV λ = 254 nm	การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ
TC-hexane-F1	86.8	11.99	√	-
TC-hexane-F2	44.9	6.20	√	+
TC-hexane-F3-s	6.2	0.86	X	-
TC-hexane-F3-f	105.2	14.53	√	+
TC-hexane-F4-s	8.3	1.15	X	-
TC-hexane-F4-f	268.6	37.10	√	+
TC-hexane-F5-s	5.1	0.70	X	+
TC-hexane-F5-f	78.1	10.79	√	+
TC-hexane-F6	57.4	7.93	X	-
		%recovery = 91.26		

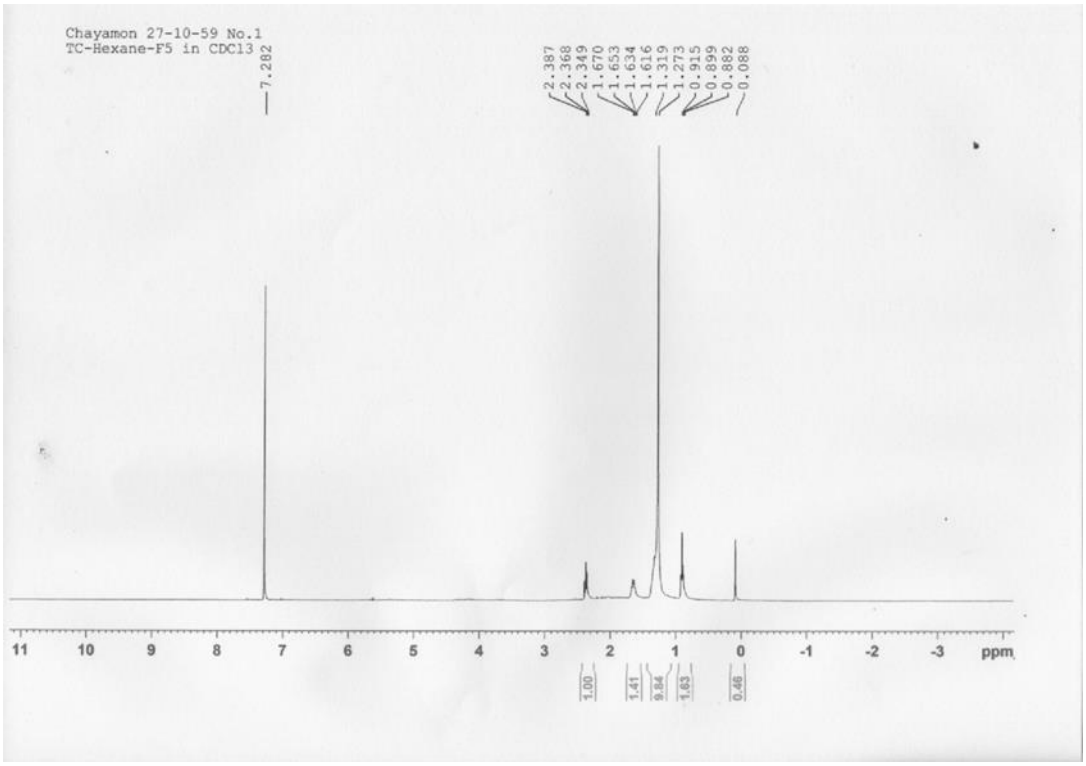
หมายเหตุ X = ไม่เรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

√= เรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

- = ไม่เกิดจุดฟอกจางสีม่วงของ DPPH reagent บน TLC

+ = เกิดจุดฟอกจางสีม่วงของ DPPH reagent บน TLC

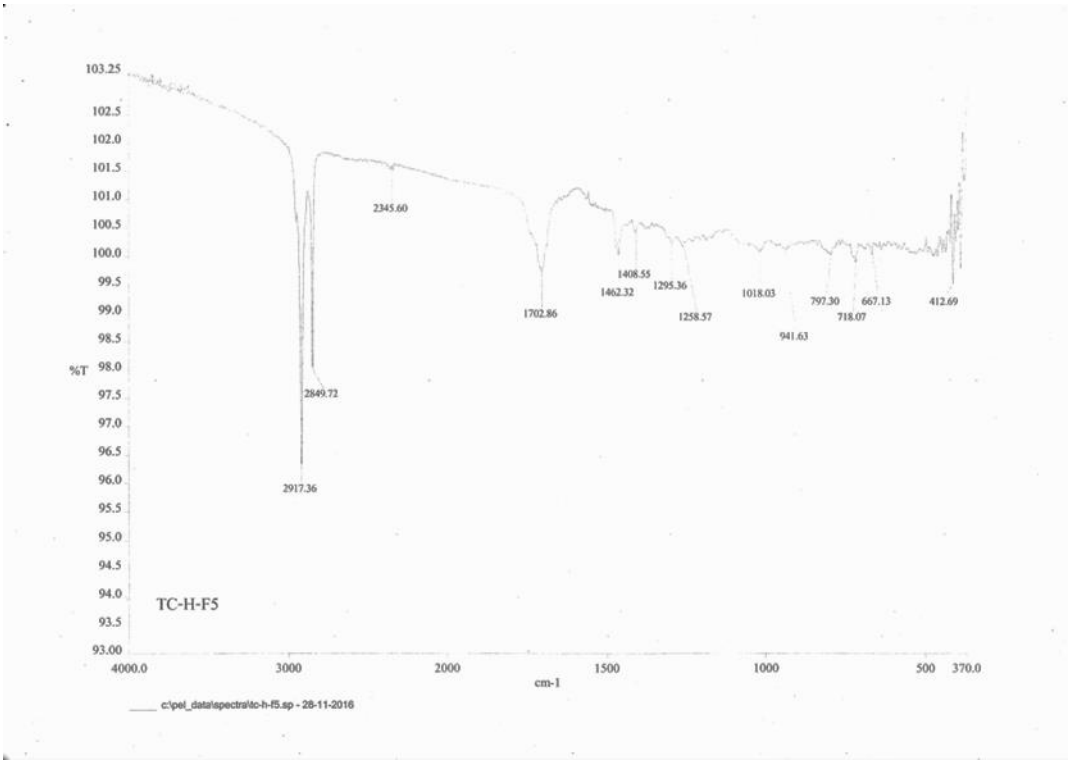
จากตารางที่ 4-8 มีสารเพียง 1 สารที่เป็นสารบริสุทธิ์ คือ สาร TC-hexane-F5s จึงนำสารไปการพิสูจน์โครงสร้าง ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-8 และวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันโดยเทคนิค IR ได้ผลการทดลองดังภาพที่ ภาพที่ 4-9



ภาพที่ 4-7 สเปกตรัมของสาร TC-hexane-F5s ได้จากเครื่อง NMR โดยเทคนิค ^{1}H NMR

ตารางที่ 4-10 ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง myristic acid **(IV-1)** โดยเทคนิค ^{1}H NMR เปรียบเทียบกับสาร myristic acid ที่เคยรายงาน

ตำแหน่ง	myristic acid	myristic acid **(IV-1)**
2	2.325 (t,2H)	2.387-2.349 (t,2H, J=15.2 Hz)
	1.2575 (m,22H)	1.319-1.273 (m,22H, J=21.6 Hz)
3-13	1.6104 (m,22H)	1.670-1.616 (d,22H, J=18.4 Hz)
14	0.8622 (t,3H)	0.915-0.882 (t,3H, J=13.2 Hz)

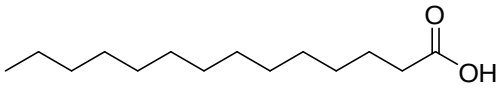


ภาพที่ 4-8 สเปกตรัมของสาร TC-hexane-F5s ได้จากเครื่อง IR

ตารางที่ 4-11 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสาร TC-hexane-F5s โดยเทคนิค IR

ความถี่	หมู่ฟังก์ชัน
1,736.19	C=O
2,850.00-2,918.26	-CH

ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สาร TC-Heaxae-F5s คือ myristic acid (IV-1) ดังแสดงในภาพที่ 4-8 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 5.1 มิลลิกรัม ยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบโครมาโทแกรม ^{1}H-NMR กับ ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน



(IV-1)

ภาพที่ 4- 9 โครงสร้าง myristic acid **(IV-1)**

4.7.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน

การแยกสารสารหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน จำนวน 801.9 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นสารสีเหลืองอ่อน ใช้วิธีการการแยกสารโดยเทคนิครงเลขผิวบางแบบเหวี่ยง (Centrifugal Thin-Layer Chromatography) เก็บ fraction ได้ทั้งหมด 49 fractions รวม fraction ที่มีรูปแบบ TLC เหมือนกันได้ทั้งหมด 21 fractions (TC-CH_2Cl_2-F1-TC-CH_2Cl_2-F21) และ % recovery เท่ากับ 94.59% ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-11

ตารางที่ 4-12 ผลการแยกสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (TC-CH_2Cl_2) จำนวน 801.9 มิลลิกรัม

กลุ่มสาร	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)	ร้อยละผลผลิต	การเรืองแสง UV λ = 254 nm	การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ
TC-CH_2Cl_2-F1	11.00	1.37	√	+
TC-CH_2Cl_2-F2	16.50	2.06	√	+
TC-CH_2Cl_2-F3	105.00	13.09	√	+
TC-CH_2Cl_2-F4	15.00	1.87	√	+
TC-CH_2Cl_2-F5	85.00	10.60	√	+
TC-CH_2Cl_2-F6	89.30	11.14	√	+
TC-CH_2Cl_2-F7	30.80	3.84	√	+
TC-CH_2Cl_2-F8	82.00	10.23	√	+
TC-CH_2Cl_2-F9	25.60	3.19	√	+
TC-CH_2Cl_2-F10	11.40	1.42	√	+
TC-CH_2Cl_2-F11	12.00	1.50	X	-
TC-CH_2Cl_2-F12	1.80	0.22	X	-
TC-CH_2Cl_2-F13	8.30	1.04	√	+
TC-CH_2Cl_2-F14	18.70	2.33	√	+
TC-CH_2Cl_2-15	28.40	3.54	√	+
TC-CH_2Cl_2-F16	24.90	3.11	√	+
TC-CH_2Cl_2-F17	43.20	5.39	√	+
TC-CH_2Cl_2-F18	19.70	2.46	√	+

ตารางที่ 4-12 (ต่อ)

กลุ่มสาร	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)	ร้อยละผลผลิต	การเรืองแสง UV λ = 254 nm	การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ
TC-CH_2Cl_2-F19	24.10	3.01	X	-
TC-CH_2Cl_2-F20	105.80	13.19	X	-
		%recovery = 94.59		

หมายเหตุ X = ไม่เรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

√= เรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

- = ไม่เกิดจุดฟอกจางสีม่วงของ DPPH reagent บน TLC

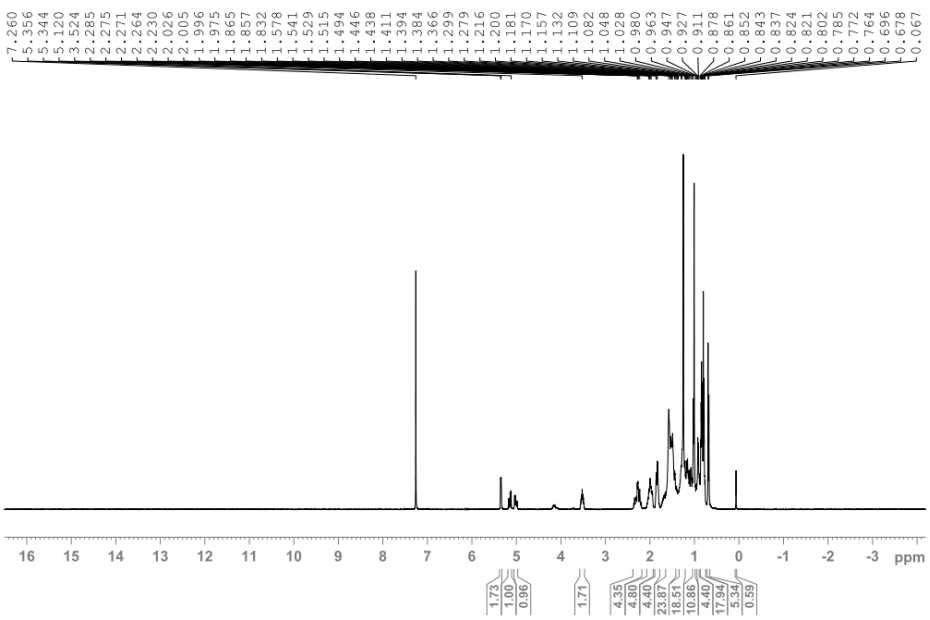
+ = เกิดจุดฟอกจางสีม่วงของ DPPH reagent บน TLC

4.7.2.1 การล้างผลึกที่ได้จากสารในกลุ่ม TC-CH_2Cl_2-F2, TC-CH_2Cl_2-F3, TC-CH_2Cl_2-F4, TC-CH_2Cl_2-F6, TC-CH_2Cl_2-F7, TC-CH_2Cl_2-F8, TC-CH_2Cl_2-F9, TC-CH_2Cl_2-F11, TC-CH_2Cl_2-F15, TC-CH_2Cl_2-F16, TC-CH_2Cl_2-F17, TC-CH_2Cl_2-F19, TC-CH_2Cl_2-F20, TC-CH_2Cl_2-F21 เมื่อล้างผลึกแล้ว นำสารที่ได้ไประเหยแห้ง จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-11 และ ภาพที่ 4-11 ถึง ภาพที่ 4-12

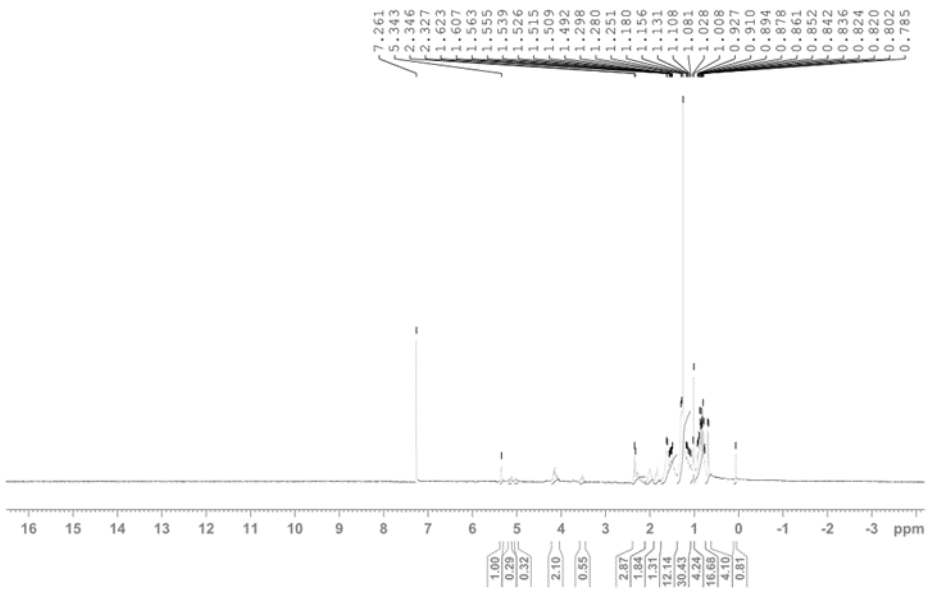
ตารางที่ 4-13 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร TC-CH_2Cl_2-F2s, TC-CH_2Cl_2-F3s, TC-CH_2Cl_2-F4s, TC-CH_2Cl_2-F6s, TC-CH_2Cl_2-F7s, TC-CH_2Cl_2-F8s, TC-CH_2Cl_2-F9s, TC-CH_2Cl_2-F11s, TC-CH_2Cl_2-F15s, TC-CH_2Cl_2-F17s, TC-CH_2Cl_2-F19s, และ TC-CH_2Cl_2-F20s

กลุ่มสาร	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)	โครงสร้างสาร
TC-CH_2Cl_2-F2s	16.50	ของผสมระหว่าง Stigmasterol และ sitosterol
TC-CH_2Cl_2-F3s	142.00	ของผสมระหว่าง Stigmasterol และ sitosterol
TC-CH_2Cl_2-F4s	19.00	-
TC-CH_2Cl_2-F6s	60.00	-
TC-CH_2Cl_2-F7s	1.70	-
TC-CH_2Cl_2-F8s	9.90	-
TC-CH_2Cl_2-F9s	13.70	-
TC-CH_2Cl_2-F11s	0.90	-
TC-CH_2Cl_2-F15s	10.00	-
TC-CH_2Cl_2-F16s	0.80	-
TC-CH_2Cl_2-F17s	25.00	เป็นสารที่มีโครงสร้าง แบบ Taccalonolide A
TC-CH_2Cl_2-F19s	1.20	-
TC-CH_2Cl_2-F20s	65.00	-

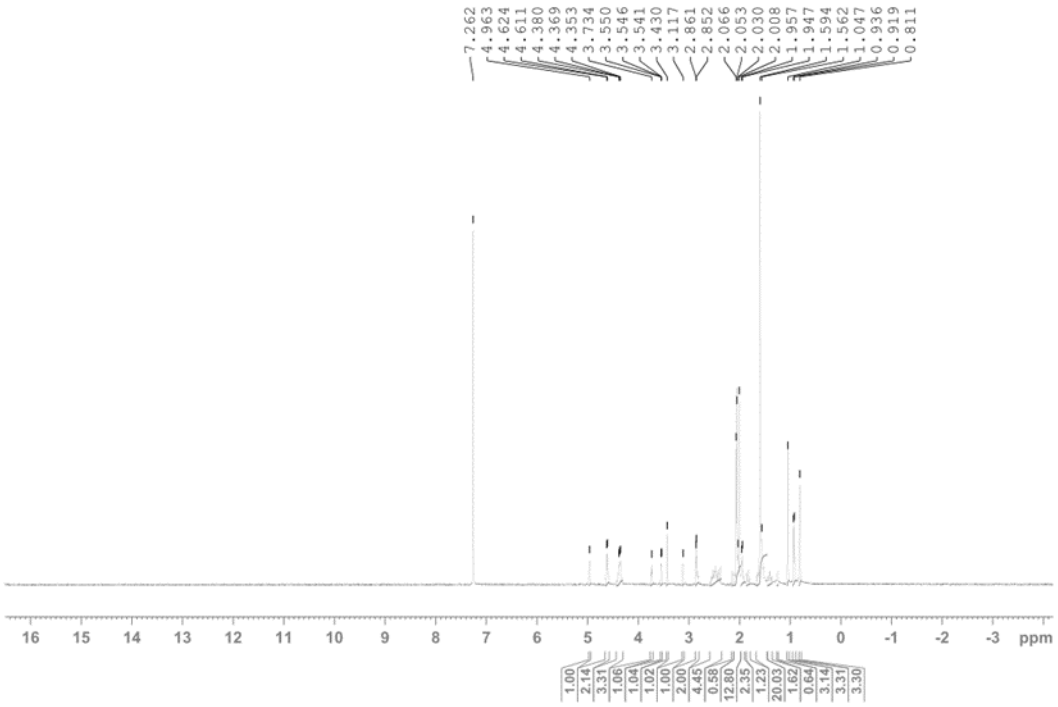
หมายเหตุ (-) ไม่สามารถวิเคราะห์โครงสร้างได้เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย



ภาพที่ 4-10 สเปกตรัมของสาร TC-CH_2Cl_2-F2s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



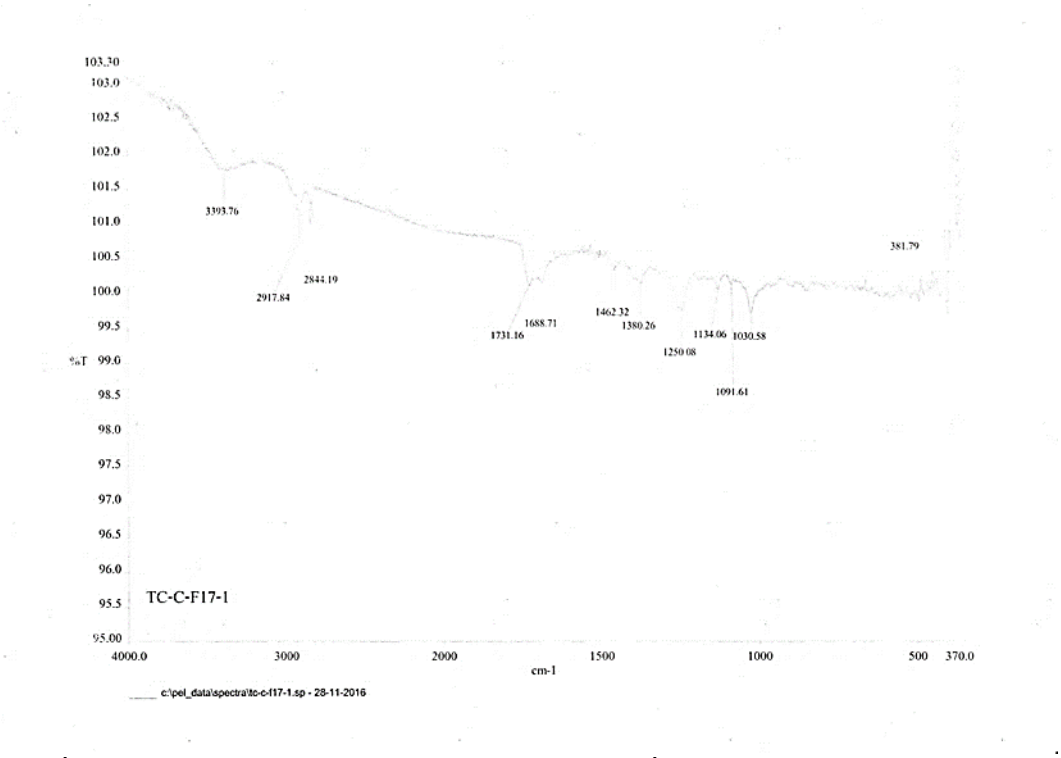
ภาพที่ 4-11 สเปกตรัมของสาร TC-CH_2Cl_2-F3s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



ภาพที่ 4-12 สเปกตรัมของสาร TC-CH_2Cl_2-F17s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR

ตารางที่ 4-14 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของผสมระหว่าง beta-sitosterol (IV-2) และ Sitgmasterol (IV-3) โดยเทคนิค ^{1}H NMR

ตำแหน่ง	**Stigmasterol**	**beta-Sitosterol**	**TC-CH_2Cl_2-F2s**
3	3.51 (tdd,1H, J=4.5,4.2,3.8 Hz)	3.53 (tdd,1H, J=4.5,4.2,3.8 Hz)	3.52 (m, 2H)
19	0.91 (d,3H,J=6.2 Hz)	0.93 (d,3H,J=6.5 Hz)	1.1 (m, 8H)
20	4.98 (m,1H)	-	5.012 (m,1H)
21	5.14 (m,1H)	-	5.15 (m,1H)
24	0.83 (t,3H, J=7.1 Hz)	0.84 (t,3H, J=7.2 Hz)	1.01 (m,10H)
26	0.82 (d,3H,J=6.6 Hz)	0.83 (d,3H,J=6.4 Hz)	0.92 (m,16H)
27	0.80 (d,3H,J=6.6 Hz)	0.81 (d,3H,J=6.4 Hz)	0.82 (m,15H)
28	0.17 (s,3H)	0.68 (s,3H)	0.69 (d, 6H, J=7.4)
29	1.03 (s,3H)	1.01 (s,3H)	1.25 (s,7H)



ภาพที่ 4-13 สเปกตรัมของสาร TC-CH_2Cl_2-F17s ได้จากเครื่อง IR

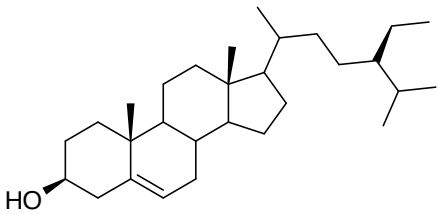
ตารางที่ 4-15 ผลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสาร TC- CH_2Cl_2-F17s โดยเทคนิค IR

ความถี่	หมู่ฟังก์ชัน
1,736.19	C=O
2,850.00-2,918.26	-OH

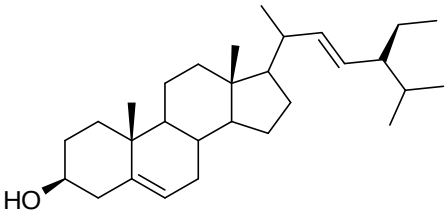
จากการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของเหง้าเนระพูสีไทย สามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน ได้จำนวน 3 ชนิด ดังนี้

4.7.2.1 ของผสมระหว่าง beta-sitosterol (IV-2) และ Sitgmasterol (IV-3)

Fraction TC-CH_2Cl_2-F2 และ TC-CH_2Cl_2-F3-1 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนัก 15 มิลลิกรัม ยืนยันโครงสร้างได้จากการเปรียบเทียบ TLC และ ^{1}H-NMR กับสารที่เคยแยกได้ในสารสกัดจากธรรมชาติและสอดคล้องกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้ จึงสรุปได้ว่าเป็นของผสมระหว่าง beta-sitosterol (IV-2) และ Sitgmasterol (IV-3) ดังแสดงในภาพที่ 4-15



(IV-2)



(IV-3)

ภาพที่ 4-14 โครงสร้างของ beta-sitosterol (IV-2) และSitgmasterol (IV-3)

4.7.2.2 Fraction TC-CH_2Cl_2-F17-1

Fraction TC-CH_2Cl_2-F17-1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 25 มิลลิกรัม ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR พบว่าโครงสร้างของสาร TC-CH_2Cl_2-F17-1 เป็นสารในกลุ่ม Taccalonolide แต่ไม่สามารถพิสูจน์หาโครงสร้างที่แท้จริงได้ เนื่องจากสารที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก

4.7.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตต

การแยกสารสารหยาบชั้นเอทิลอะซีเตต จำนวน 617.8 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นสารสีน้ำตาลอ่อน ใช้วิธีการการแยกสารโดยเทคนิครงเลขผิวบางแบบเหวี่ยง (Centrifugal Thin-Layer Chromatography) เก็บ fraction ได้ทั้งหมด 27 fractions รวม fraction ที่มีรูปแบบ TLC เหมือนกันได้ทั้งหมด 14 fractions (TC-EtOAc-F1- TC-EtOAc-F14) และ %recovery เท่ากับ 76.10% ทดสอบการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระบนแผ่น TLC ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-16

ตารางที่ 4-16 ผลการแยกสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (TC- EtOAc) จำนวน 723.9 มิลลิกรัม

กลุ่มสาร	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)	ร้อยละผลผลิต	การเรืองแสง UV λ = 254 nm	การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ
TC-EtOAc-F1	18.00	2.91	√	-
TC-EtOAc-F2	19.60	3.17	X	-
TC-EtOAc-F3	22.40	3.63	X	-
TC-EtOAc-F4	7.20	1.17	√	-
TC-EtOAc-F5	10.20	1.65	√	-
TC-EtOAc-F6	28.60	4.63	√	+
TC-EtOAc-F7	30.20	4.89	√	+
TC-EtOAc-F8	53.90	8.72	√	+
TC-EtOAc-F9	32.50	5.26	√	+
TC-EtOAc-F10	111.50	18.05	√	+
TC-EtOAc-F11	42.30	6.85	√	+
TC-EtOAc-F12	13.20	2.14	√	+
TC-EtOAc-F13	55.80	9.03	√	-
TC-EtOAc-F14	25.30	4.10	√	+
%recovery = 76.19				

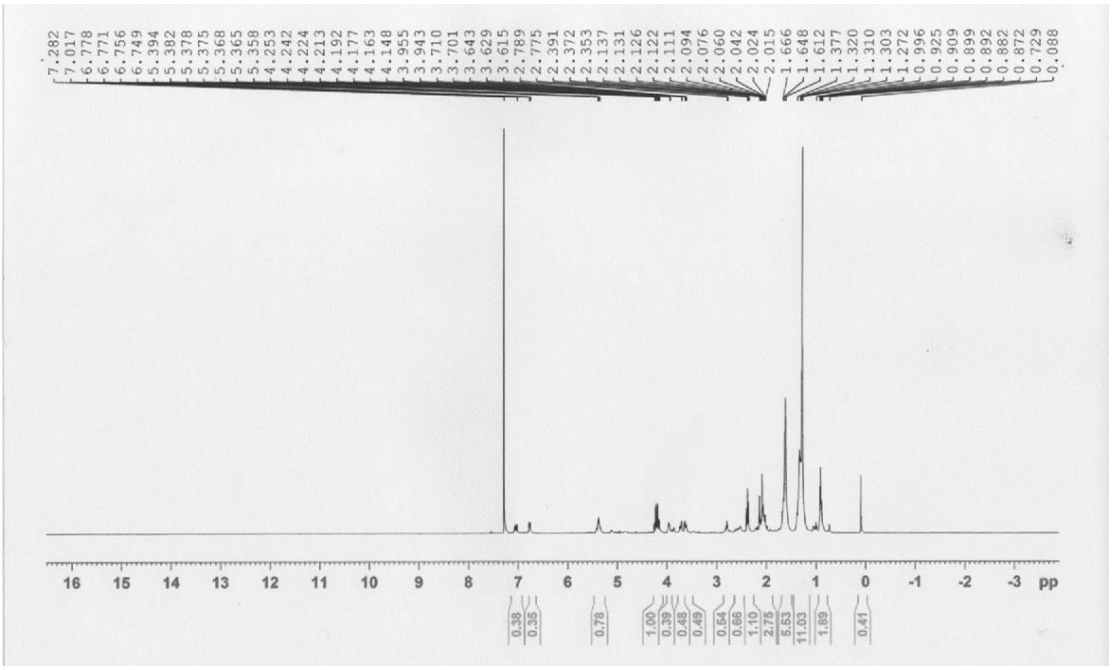
หมายเหตุ X = ไม่เรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

√ = เรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

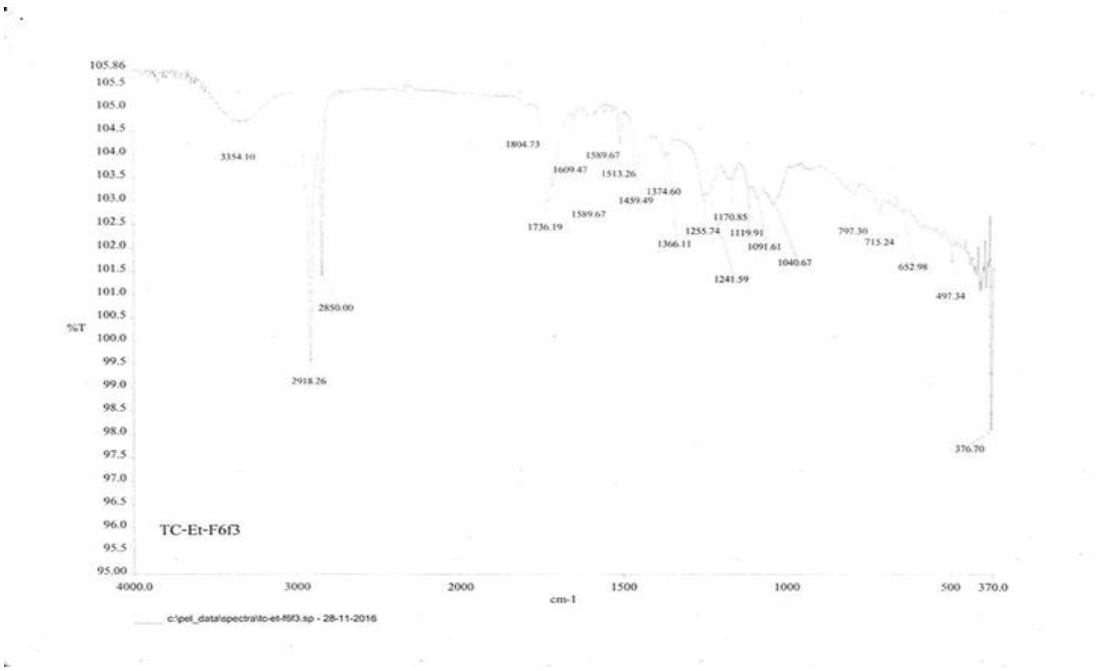
- = ไม่เกิดจุดฟอกจางสีม่วงของ DPPH reagent บน TLC

+ = เกิดจุดฟอกจางสีม่วงของ DPPH reagent บน TLC

จากการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของเหง้าเนระพูสีไทย โดยติดตามแยกสารตามการฟอกจางสีของสารละลาย DPPH สามารถแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตตได้จำนวน 1 ชนิด ดังนี้ Fraction TC-EtOAc-F6-3



ภาพที่ 4-15 สเปกตรัมของสาร TC-EtOAc-F6-3 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค 1H-NMR



ภาพที่ 4-16 สเปกตรัมของสาร TC-EtOAc-F6-3 ได้จากเครื่อง IR

ไม่สามารถพิสูจน์หาโครงสร้างที่แท้จริงได้ เนื่องจากสารที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก เมื่อนำสารไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบเนระพูสีไทยจากวิธีการสกัดทั้ง 2 วิธี คือวิธีการแช่หมัก และวิธีการกลั่นด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล มีร้อยละผลผลิต (% Yield) มากที่สุด คือ ร้อยละ 7.0325 รองลงมาได้แก่ สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตต (ร้อยละ 4.9349) สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (ร้อยละ 3.9118) สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (ร้อยละ 1.5673) และน้ำมันหอมระเหย (ร้อยละ 2.9238)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นโดยทดสอบจากปฏิกิริยาการเกิดสี และการตกตะกอน ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย จากเหง้าเนระพูสีไทย พบพฤกษเคมี 6 ชนิด คือ ฟลาโวนอยด์ มาริน ซาโปนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยสารสกัดหยาบชั้น เฮกเซนพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คูมาริน เทอร์ปีนอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทนพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คูมาริน สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน เทอร์ปีนอยด์ และ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกล-โคไซด์ และน้ำมันหอมระเหยพบสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ คูมาริน เทอร์ปีนอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ Akhito Yokosuka ที่พบสาร Spirostanol Saponin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มซาโปนิน (Akhito et al., 2002) April L. Risinger พบสาร taccalonolides ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ และ taccabulin A ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (April et al., 2013) และ Jiangnan Peng พบสาร Evelynin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Jiangnan et al., 2010)

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocaltue ใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (5.202±0.02 mgGAE/g) รองลงมาได้แก่ สารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (2.901±0.03 mgGAE/g) สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (2.604±0.14 mgGAE/g) น้ำมันหอมระเหย (2.203±0.24 mgGAE/g) และสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (2.023±0.02 mgGAE/g) ตามลำดับ การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium trichloride ($AlCl_3$) colorimetric โดยใช้เคอร์ซิติน (Qurecetin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (33.638±1.27

mgQE/g) รองลงมาได้แก่ สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซีเตต (21.586±3.02 mgQE/g) น้ำมันหอมระเหย (13.023±1.67 mgQE/g) สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (10.264±0.26 mgQE/g) และสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน (6.701±0.43 mgQE/g) ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมค่อนข้างสูง ซึ่งให้ผลตรงกับการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นที่ตรวจพบสารในกลุ่มของฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน คูมาริน และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ และยังสอดคล้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ April L. Risinger พบสาร taccabulin A ซึ่งเป็นสารกลุ่มกลุ่มฟลาโวนอยด์ (April et al., 2013) และ Jiangnan Peng พบสาร Evelynin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Jiangnan et al., 2010) ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดจัดเป็นสารประกอบฟีนอลิก

เมื่อนำสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าที่ความเข้มข้น 625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซีเตต มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด (ร้อยละ 58.700±0.01) ซึ่งออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ซึ่งมีค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ ร้อยละ 64.900±0.00 ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซีเตต เป็นผลมาจากการพบสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมในปริมาณสูง เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระที่เคยมีรายงานมักจะเป็นสารประกอบในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มาก ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระจะมากขึ้นด้วย (Kim et al., 2005) และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธีการทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH จากพืชวงศ์อื่นๆ ที่เคยมีรายงาน พบว่าพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดจะมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูง เช่นพืชในวงศ์ขิงเป็นต้น (Chan et al., 2008)

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก และสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหย โดยใช้ *L*-DOPA เป็นซับสเตรต พบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าทุกสารสกัดหยาบไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน สามารถแยกองค์ประกอบให้บริสุทธิ์ได้ สาร 1 ชนิด คือ myristic acid โดยจากการศึกษารายงานวิจัยของ G. E. Henry เรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบจากกรดไขมันที่พบในอาหาร มีรายงานว่า myristic acid นั้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ร้อยละ 71 (Geneive, Rafikali, Muraleedharan, & David,

2002) และสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน พบของผสมระหว่าง beta-sitosterol และ Sitgmasterol ซึ่งไม่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบสาร TC-CH_2Cl_2-F17s มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 25 มิลลิกรัม ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR พบว่าโครงสร้างของสาร TC-CH_2Cl_2-F17s เป็นสารในกลุ่ม Taccalonolide (April et al., 2013) แต่ไม่สามารถพิสูจน์หาโครงสร้างที่แท้จริงได้ เนื่องจากสารที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก เมื่อนำสารไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น และการทดสอบฤทธิ์อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์

2. การวิจัยต่อไปควรศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อเป็นข้อมูลที่สนับสนุนการพัฒนาสมุนไพรมาใช้แทนยาแผนปัจจุบันในการรักษาโรค หรือฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ และเครื่องสำอางต่อไป

บรรณานุกรม

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง.*วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, (ฉบับพิเศษ), 143-150.

กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาขันธ์, ปริยาภา เกตุกูล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา หริ่มเพ็ง, เบญจวรรณ ชิวปรีชา และคำรณ เลียดประถม. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมนุมบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, (ฉบับพิเศษ), 304-311.

ก่องกานดา ชยามฤต. (2557). *ทะเบียนรายชื่อพืชในประเทศไทย.* กรุงเทพฯ: สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

ไชยยง รุจจนเวท และดวงพร อมรเลิศพิศานต์. (2556). ฤทธิ์ระงับการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของเนระพูสีไทย. *วารสาร 10 ปีวิชาการแม่ฟ้าหลวง*, 505-509.

ธงชัย เปาอินทร์ และนิวัตร เปาอินทร์. (2544). *ต้นไม้ยาน่ารู้.* กรุงเทพฯ: ออฟเซ็ท เพรส.

ปรียนันท์ บัวสด. (2549). *การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี.*วิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พรรณทิพย์ แสงสุขเอี่ยม. (2548). *เคมีทั่วไป.* กรุงเทพฯ: พิทักษ์อักษร.

มยุรฉัตร เกื้อชู, ศิริพรรณ ตันตาคม และธรรมศักดิ์ ทองเกตุ. (2552). ฤทธิ์ควบคุมหนอนใยฝัก (*Plutella xylostella* L.) ของสารสกัดจากเหง้าค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andre.). *วิทยาสารกำแพงแสน, 8*, 14-19.

มณี ตันติรุ่งกิจ, พัชราภรณ์ ภูไพบูลย์ และอรวรรณ ชวนตระกูล. (2549). ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเนระพูสีไทย. ใน *การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ครั้งที่ 32*(หน้า 24-29). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เย็นหทัย แน่นหนา. (2549). *สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์.* กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. (2550). *คุณภาพทางเคมีของสมุนไพร เล่มที่ 1*. นครปฐม: สำนักพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

สุพัตรา ม่วงงาม. (2555). *ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพญายาและลูกเดือยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์.

เสาวนีย์ คำพันธ์. (2553). *องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกิ่งต้นไข่เน่า*. รายงานการวิจัย. กรุงเทพฯ: สาขาวิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.

อรัญญา มโนสร้อย และจีรเดช มโนสร้อย. (2548). *น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากสมุนไพรไทยการใช้ทางยาและเครื่องสำอางค์*. เชียงใหม่: โรงพิมพ์ครองช่าง.

โอภา วัชระคุปต์. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. กรุงเทพฯ: พีเอสพริ้นท์.

ออมบุญ ล้วนรัตน์. (2536). *การสกัดและตรวจสอบสาระสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ*. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Akhito, Y., Yoshihiro, M., & Yutaka, S. (2002). Steroidal and Pregnane Glycosides from the Rhizomes of *Tacca chantrieri*. *Journal of Natural Products, 65*, 1293-1298.

Akhito, Y., Yoshihiro, M., & Yutaka, S. (2003). Chantriolides A and B, Two New Withanolide Glucosides from the Rhizomes of *Tacca chantrieri*. *Journal of Natural Products, 66,* 876-878.

Akhito, Y., Yoshihiro, M., & Yutaka, S. (2002). Spirostanol saponins from the Rhizomes of *Tacca chantrieri* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, *61*, 73-78.

Akhito, Y., Yoshihiro, M., Chiseko, S., & Yutaka, S. (2005). New glycoside of the campesterrol derivative from the Rhizomes of *Tacca chantrieri*. *Steroids*, *70*, 257-265.

April, L. R., Jiangnan, P., Cristina, C. R., Hector, R. A., Doug, E. F., & Susan, L. M. (2013). The Bat Flower: A Source of Microtubule Destabilizing and-Stabilizing Compounds with Synergistic Antiproliferative Actions. *Journal of natural products*, *76*, 1923-1929.

Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardisation d'un extrait de Propolis et identification des principaux constituanats. *J. da Pharmacie de Belgique*, *49*, 462-468.

Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, 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 therap in southwestem Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7*(3), 1019-1024.

Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, L. F., Lianto, F. S., Wong, S. K., & Lim, K. K. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, *109*, 477-483.

Geneive, E. H., Rafikali, A. H., Muraleedharan, G. N., & David, L. D. (2002). Antioxidant and Cyclooxygenase Activities of Fatty Acids Found in Food. *American Chemical Society, 50*(8), 2231–2234.

Jiangnan, P., Evelyn, M. J., David, J. B., April, L. R., Gregory, H., Doug,E. F., & Susan, L. M. (2010). Evelynin, a Cytotoxic Benzoquinone-Type retro-Dihydrochalcone from *Tacca chantrieri*. *Journal of Natural Products, 73*, 1590-1592.

Kim, JH., Chen, F., Wang, X., Chung, HY., & Jin, Z. (2005). Evaluation of antioxidant activity of Vetiver (Vetiveria zizaniodes L.) oil and identification of its antioxidant constituents. *Agric Food Chem, 53*(20), 7691-7695.

Maghenic, L., Skerget, M., & Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of quarana seed extracts. *Food Chemistry*, *104*(3), 1258-1268.

ภาคผนวก

1. การคำนวณร้อยละผลผลิต (% Yield)

จากสูตรการคำนวณ

$$\%Yield = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นเฮกเซน

น้ำหนักของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เท่ากับ 1.5673 กรัม

น้ำหนักของเหง้าเนระพูสีไทยแห้ง เท่ากับ 1,100 กรัม

แทนค่า

$$\%Yield = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

$$\%Yield = \frac{1.5673 \text{ กรัม}}{1{,}000 \text{ กรัม}} \times 100$$

$$\%Yield = 0.1425$$

ดังนั้นสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นเฮกเซน มีร้อยละผลผลิต เท่ากับ 0.1425

ตารางที่ ก-1 น้ำหนักของเหง้าเนระพูสีไทย น้ำหนักสารสกัดหยาบ และร้อยละผลผลิต

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสาร		ร้อยละผลผลิต
		พืช (g)	ส่วนสกัดหยาบ (g)	
วิธีการแช่หมัก	เฮกเซน	1,100	1.5673	0.1425
(พืชแห้งบดละเอียด)	ไดคลอโรมีเทน	1,100	3.9118	0.3556
	เอทิลอะซีเตต	1,100	4.9349	0.4486
	เมทานอล	1,100	77.3577	7.0325
วิธีการกลั่นด้วยน้ำ	น้ำมันหอมระเหย	8,000	2.9238	0.0365
(พืชสด)				

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

2.1.1 Dragendroff's reagent

เตรียมโดยละลายบิทมัสไนเตรต 8 กรัม ในสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วผสมกับโพแทสเซียมไอโอไดด์ 27 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2.2 สารละลายเฟอริก (III) คลอไรด์ ร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร

เตรียมโดยชั่ง เฟอริก (III) คลอไรด์ จำนวน 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 2.4 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content)

3.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

3.1.1 สารละลาย Folin-Ciocalteu โดยเจือจางเป็น 1:10 (ร้อยละโดยปริมาตร/ปริมาตร) ด้วยน้ำกลั่น

3.1.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยมวล/ปริมาตร) โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 1.250 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

3.1.3 สารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในเอทานอล โดยชั่งกรดแกลลิก 0.025 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 25 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 75.00 - 0.146 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

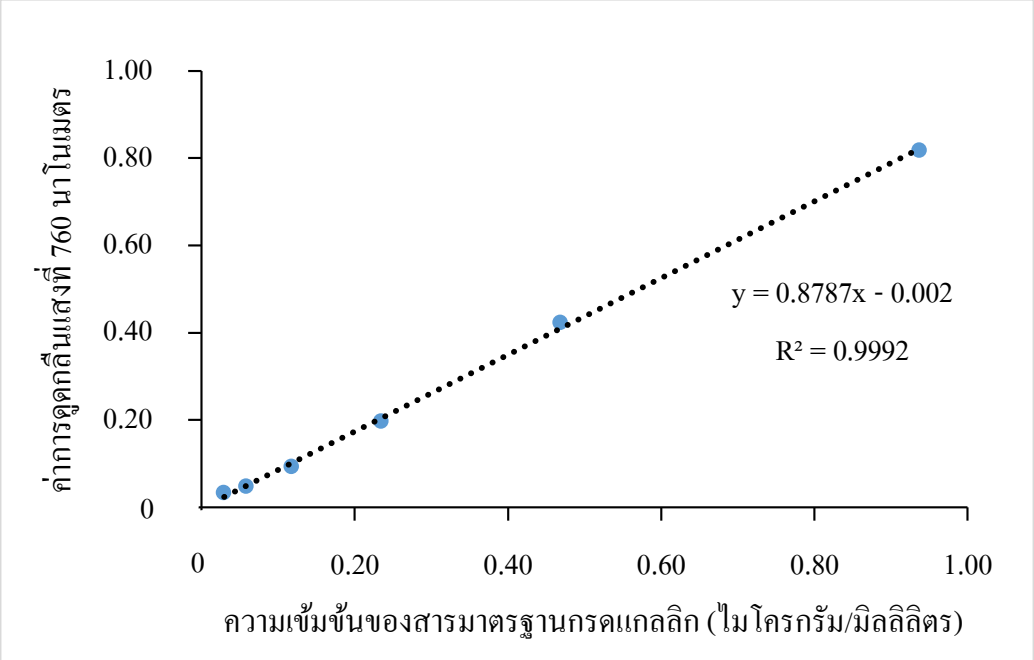
3.1.4 สารละลายตัวอย่างในตัวทำละลายเอทานอล เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งสารตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตร

3.2 การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก โดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 75.00 - 0.146 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10 ร้อยละโดยปริมาตร/ปริมาตร ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2.5 ร้อยละโดยมวลปริมาตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก หาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร			เฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
0.938	0.776	0.856	0.822	0.818
0.469	0.426	0.410	0.433	0.423
0.234	0.186	0.199	0.205	0.197
0.117	0.091	0.101	0.085	0.092
0.059	0.046	0.048	0.049	0.048
0.029	0.034	0.033	0.030	0.032



กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ได้สมการ $y = 0.08787x - 0.002$, $R^2 = 0.9992$

ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

3.2.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทย โดยผสมสารสกัดหยาบ (ความเข้มข้น 10.00 - 0.625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer และหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mg GAE/g dried extract)

ตารางที่ ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากเนระพูสีไทย

สารสกัดหยาบเนระพูสีไทย	**ความเข้มข้น**		**ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร**		
	เริ่มต้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	**สุดท้าย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)**	**ครั้งที่ 1**	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
เฮกเซน	2.50	0.25	0.440	0.450	0.440
ไดคลอโรมีเทน	2.50	0.25	0.635	0.642	0.629
เอทิลอะซีเตต	1.25	0.13	0.570	0.570	0.570
เมทานอล	2.50	0.25	0.600	0.570	0.540
น้ำมันหอมระเหย	2.50	0.25	0.510	0.520	0.420

3.2.3 การหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (mgGAE/g) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการคำนวณ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

ค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 1 ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เท่ากับ 0.440

จากสมการ $y = 0.08787x - 0.002$

แทนค่า $y = 0.441$

$0.441 = 0.08787x - 0.002$

$x = 0.5030$

ดังนั้นสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมเท่ากับ 0.5030 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ 0.0005 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.2.4 การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วย mgGAE/g

สารสกัดตัวอย่าง 0.25 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก 0.0005 mg/mL

ถ้าสารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก $\frac{0.0005 \text{ mg/mL} \times 1{,}000 \text{ mg}}{0.25 \text{ mg}}$

$= 2.0120$ mgGAE/g

ดังนั้น สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 2.0120 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม

ตารางที่ ค-3 ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเนระพูสีไทย

สารสกัดหยาบ	**ความเข้มข้น (mg/mL)**	**ปริมาณฟีนอลิกรวม (mgGA/g)**				
		ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**เฉลี่ย**	**SD**
เฮกเซน	0.25	2.021	2.044	2.003	2.023	0.02
ไดคลอโรมีเทน	0.25	2.900	2.932	2.872	2.901	0.03
เอทิลอะซีเตต	0.13	5.180	5.208	5.217	5.202	0.02
เมทานอล	0.25	2.754	2.586	2.472	2.604	0.14
น้ำมันหอมระเหย	0.25	2.322	2.358	1.930	2.203	0.24

4. การเตรียมสาร และการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content)

4.1 การเตรียมสารละลาย

4.1.1 เตรียมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยมวล/ปริมาตร ในตัวทำละลายเมทานอล

4.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin) ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล โดยชั่ง Quercetin 0.10 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 150.000 - 0.293 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน

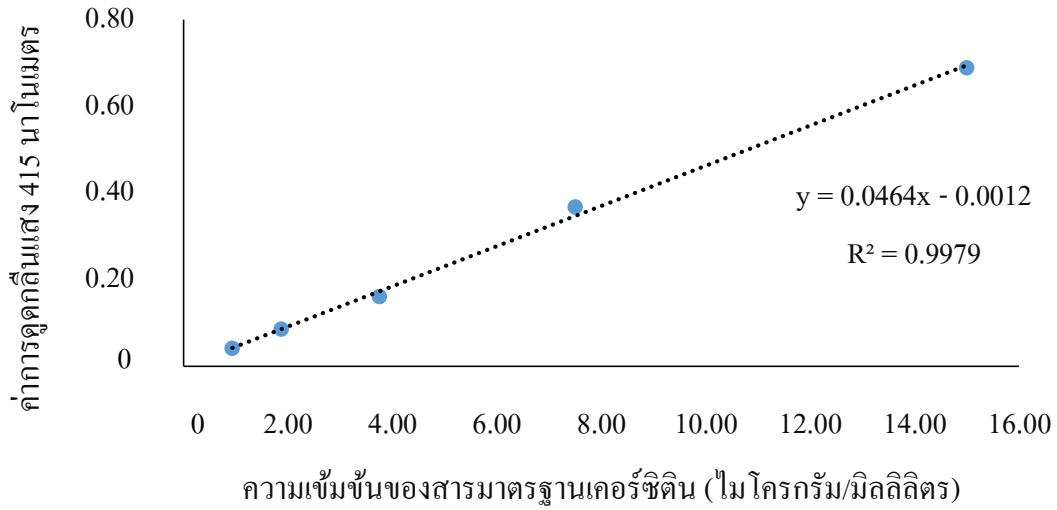
4.1.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 50.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในตัวทำละลายเมทานอล โดยชั่งสารตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน โดยผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (ความเข้มข้น 150.000 - 0.293 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

4.3 สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน หาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ง-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 4150 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin)

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร**			**เฉลี่ย**
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	
1.50	0.692	0.681	0.690	0.688
0.75	0.374	0.373	0.353	0.367
0.38	0.162	0.157	0.164	0.161
0.19	0.082	0.089	0.084	0.085
0.01	0.043	0.040	0.042	0.042



กราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซิติน ได้สมการ y = 0.0464x - 0.0012 , R2 = 0.9979

ภาพที่ ง-1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานเคอร์ซิติน

4.4 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) ผสมสารสกัดหยาบ (ความเข้มข้น 10.000-0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$ reagent) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE/g dried extract)

ตารางที่ ง-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทย

สารสกัดหยาบเนระพูสีไทย	ความเข้มข้น		ค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร		
	เริ่มต้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	สุดท้าย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
เฮกเซน	1.25	0.13	0.057	0.058	0.060
ไดคลอโรมีเทน	1.25	0.13	0.040	0.035	0.038
เอทิลอะซีเตต	1.25	0.13	0.106	0.141	0.125
เมทานอล	2.50	0.25	0.380	0.381	0.406
น้ำมันหอมระเหย	1.25	0.13	0.072	0.085	0.066

3.2.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม ($mgQE.g^{-1}$) โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาแทนในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

ค่าดูดกลืนแสงครั้งที่ 1 ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เท่ากับ 0.057

จากสมการ $y = 0.06464x - 0.0012$

แทนค่า $y = 0.057$

$0.057 = 0.06464x - 0.0012$

$x = 1.2543$

ดังนั้น สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 1.2543 โมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ 0.0013 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.2.4 การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในหน่วย mgQE/g

สารสกัดตัวอย่าง 0.125 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก 0.0013 mgQE

ถ้าสารสกัดตัวอย่าง 1,000 mg มีค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก $\frac{0.0013 \text{ mgQE} \times 1{,}000 \text{ mg}}{0.20 \text{ mg}}$

$= 10.034 \text{ mgQE/g}$

ดังนั้น สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนจากเหง้าเนระพูสีไทยมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 10.034 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักส่วนสกัดแห้ง 1 กรัม

ตารางที่ ง-3 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids Content) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าเนระพูสีไทย

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (mg/mL)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mgQE/g)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
เฮกเซน	0.13	10.034	10.207	10.552	10.264	0.263
ไดคลอโรมีเทน	0.13	7.103	6.241	6.759	6.701	0.434
เอทิลอะซีเตต	0.13	18.483	24.517	21.759	21.586	3.021
เมทานอล	0.25	32.862	32.948	35.103	33.638	1.270
น้ำมันหอมระเหย	0.13	12.621	14.862	11.586	13.023	1.675

5. การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH free radical scavenging

5.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

5.1.1 สารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยชั่ง DPPH 10 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 500 มิลลิลิตร

5.1.2 สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในตัวทำละลายเมทานอล โดยชั่งสารมาตรฐานกรดแกลลิก 2 มิลลิลิตร ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 0.625 - 0.039 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5.1.3 สารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบ 2-fold ให้มีความเข้มข้นในช่วง 10.000-0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.625 - 0.039 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้น 10.000 - 0.625 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตี กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition)

5.3 คำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

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

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

ตัวอย่างการคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

(A) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ เท่ากับ 0.637

(B) คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ความเข้มข้น 1.000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.3810

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

แทนค่า $$\% \text{ DPPH free radical inhibition} = \frac{[(0.637-0.3810)]}{0.637} \times 100$$

$$= 40.24$$

สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ครั้งที่ 1 มีร้อยละ การต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 40.24 นำร้อยละการต้านอนุมูลอิสระที่คำนวณได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยจะได้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) แสดงดังตารางที่ จ-1 และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นเฮกเซน แสดงดังตารางที่ จ - 2 ถึง ตางรางที่ จ - 6

ตารางที่ จ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานกรดแกลลิก

ความเข้มเข้มของกรดแกลลิก (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
625	0.685	0.682	0.693	64.77	64.77	65.17	64.90	0.01
313	0.039	0.039	0.035	63.67	64.07	64.27	64.00	0.00
156	0.050	0.046	0.044	51.17	55.47	58.17	54.93	0.00
78	0.175	0.132	0.105	24.47	27.77	29.77	27.33	0.04
39	0.442	0.409	0.389	17.37	17.97	16.17	17.17	0.03

ตารางที่ จ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นเฮกเซน

ความเข้มเข้มของสารสกัดหยาบ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 nm			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
1,000	0.3810	0.3720	0.372	40.24	41.65	41.65	41.18	0.82
500	0.4980	0.5030	0.501	21.87	21.09	21.40	21.45	0.40
250	0.5550	0.5520	0.585	12.93	13.40	8.22	11.51	2.86
125	0.6000	0.5960	0.595	5.86	6.49	6.65	6.33	0.42
63	0.6220	0.6021	0.625	2.41	5.53	1.94	3.29	1.95

ตารางที่ จ-3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นไดคลอโรมีเทน

ความเข้มเข้มของสารสกัดหยาบ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 nm			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
1,000	0.203	0.190	0.180	66.17	68.34	70.01	68.17	1.93
500	0.408	0.387	0.397	31.94	35.45	33.78	33.72	1.75
250	0.496	0.492	0.499	17.25	17.92	16.75	17.31	0.59
125	0.557	0.559	0.556	7.07	6.73	7.23	7.01	0.26
63	0.577	0.582	0.578	3.73	2.89	2.13	2.92	0.80

ตารางที่ จ-4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นเอทิลอะซิเตต

ความเข้มเข้มของสารสกัดหยาบ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 nm			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
1,000	0.012	0.005	0.013	97.99	99.16	97.82	98.32	0.73
500	0.323	0.320	0.308	45.90	46.40	48.41	46.90	1.33
250	0.448	0.435	0.476	24.96	27.14	20.27	24.12	3.51
125	0.506	0.505	0.547	15.24	15.41	8.38	13.01	4.01
63	0.563	0.566	0.566	5.70	5.19	5.19	5.36	0.29

ตารางที่ จ-5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นเมทานอล

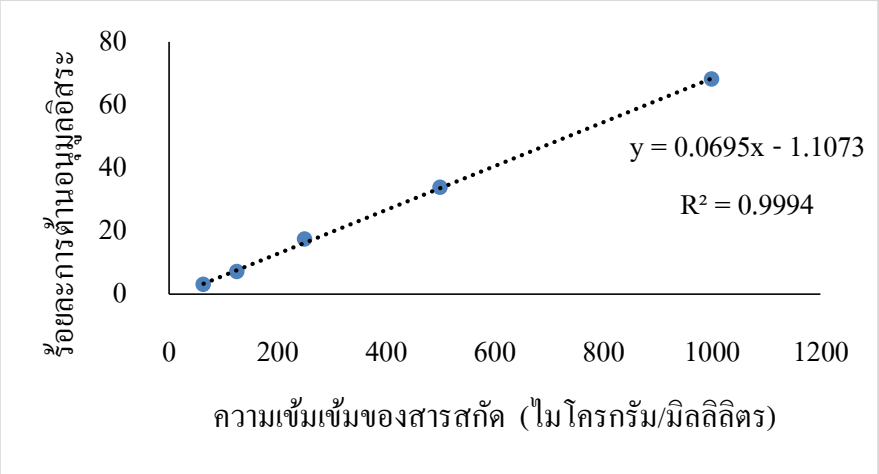
ความเข้มเข้มของสารสกัดหยาบ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 nm			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
1,000	0.060	0.059	0.059	89.47	89.64	89.64	89.58	0.10
500	0.375	0.375	0.379	35.95	35.95	35.27	35.72	0.39
250	0.474	0.473	0.475	19.13	19.30	18.96	19.13	0.17
125	0.529	0.529	0.530	9.79	9.79	9.62	9.73	0.10
63	0.550	0.560	0.569	6.22	4.52	2.99	4.58	1.61

ตารางที่ จ-6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยชั้นน้ำมันหอมระเหย

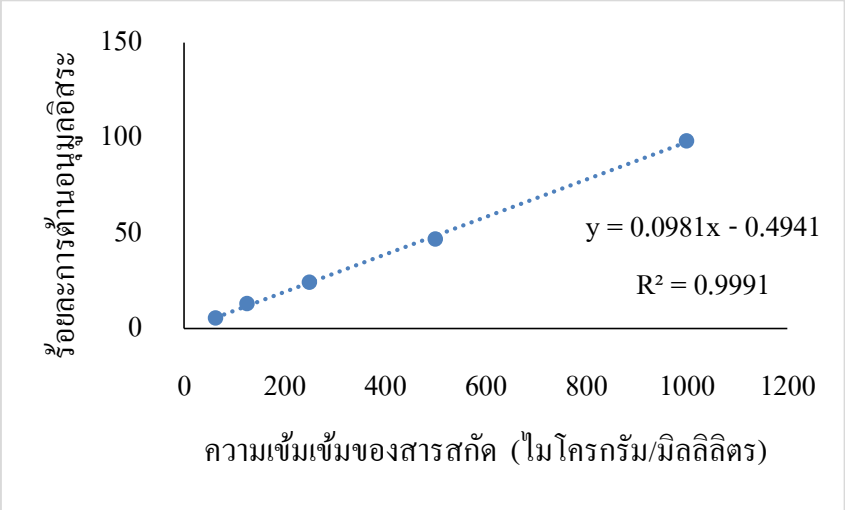
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 517 nm			%DPPH free radical inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
1,000	0.333	0.310	0.308	43.24	47.16	47.50	45.97	2.37
500	0.452	0.454	0.449	22.96	22.62	23.47	23.02	0.43
250	0.512	0.513	0.515	12.80	12.56	12.22	12.53	0.29
125	0.551	0.552	0.557	6.08	5.91	5.06	5.69	0.55
63	0.572	0.572	0.573	2.51	2.51	2.42	2.48	0.05

5.4 คำนวณหา IC_{50}

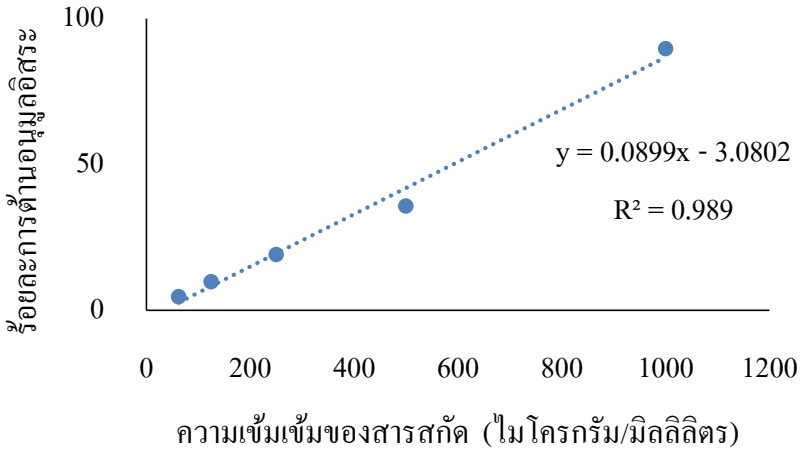
สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ หาสมการเส้นตรง และค่า R^2 จากกราฟมาตรฐาน ได้กราฟมาตรฐานแสดงดังภาพที่ จ-1 ถึง จ-3 และคำนวณหาค่า IC_{50} การสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ



ภาพที่ จ-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน



ภาพที่ จ-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต



ภาพที่ จ-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

ตัวอย่างการคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบชั้นไดคลอโรมีเทน

จากสมการ $y = 69.521x - 1.1481$

แทนค่า $50 = 69.521x - 1.1481$

$x = 0.83$

ดังนี้ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50 % มีค่าเท่ากับ 0.83 mg/mL

ตารางที่ จ-7 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

สารสกัดหยาบ	**ค่า IC_{50}**
เฮกเซน	-
ไดคลอโรมีเทน	1.83
เอทิลอะซิเตต	1.07
เมทานอล	3.72
น้ำมันหอมระเหย	-

6. การเตรียมสาร และการคำนวณฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้สารละลาย *L*-DOPA เป็นซับสเตรต

6.1 เตรียมสารละลายในการทดสอบ

6.1.1 การเตรียม phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยผสมสารดังต่อไปนี้

6.1.1.1 เตรียมสารละลาย A และ B

stock A : สารละลายโมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (Mono basic sodium phosphate, NaH_2PO_4•$2H_2O$) ความเข้มข้น 0.20 โมลาร์ โดยชั่งโมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต จำนวน 3.1202 กรัม (มวลโมเลกุล เท่ากับ 156.01 กรัม/โมล) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

stock B: สารละลายไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4•$7H_2O$) ความเข้มข้น 0.2 M ชั่งไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต 5.3614 กรัม (มวลโมเลกุล เท่ากับ 177.99 กรัม/โมล) ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

6.1.1.2 นำสารละลาย A ปริมาตร 51.00 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 49.00 มิลลิลิตร มาผสมกัน วัด pH ให้ได้ 6.8 ถ้า pH ต่ำกว่า 6.8 ปรับ pH ของสารละลายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือถ้า pH สูงกว่า 6.8 ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เมื่อได้ pH เท่ากับ 6.8 แล้ว ให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จะได้ได้สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

6.1.2 สารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้นเริ่มต้น 1.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (สารมาตรฐานกรดโคจิก 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร: ชั่งกรดโคจิก 1.0 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 625-39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

6.1.3 สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 (ชั่ง *L*-DOPA 5.9 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร)

6.1.4 สารสกัดตัวอย่าง ในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 1,000-625 ไมโครกรัม กรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเจือจางแบบ 2-fold จนได้ความเข้มข้นในช่วง 1,000 -625 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

6.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Anti-Tyrosinase Assay) โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นซับสเตรต โดยผสมสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้น 625- 39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้น 1,000-625 ไมโครกรัม/

มิลลิลิตร) ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร กับสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 120.0 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase from Mushroom) ความเข้มข้น 400 ยูนิต/มิลลิลิตร ใน Phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 20.0 ไมโครลิตร ลงในจานหลุม (96-well plate) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย *L*-DOPA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40.0 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องต่อเป็น เวลา 10 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader

6.3 ตัวคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Tyrosinase inhibition} = \frac{[\,(A-B)\,]}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารทดสอบ

ตัวอย่างการคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

(A) ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารทดสอบ เท่ากับ 0.627

(B) ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.649

จากสมการ $\% \text{ Tyrosinase inhibition} = \frac{[\,(A-B)\,]}{A} \times 100$

แทนค่า $\% \text{ Tyrosinase inhibition} = \frac{[\,(0.627-0.649)\,]}{0.649} \times 100$

สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ครั้งที่ 1 มีร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ -3.51

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) โดยใช้สารละลาย *L*-DOPA เป็นซับสเตรต แสดงดังตารางที่ ฉ-1 ถึง ตารางที่ ฉ-2

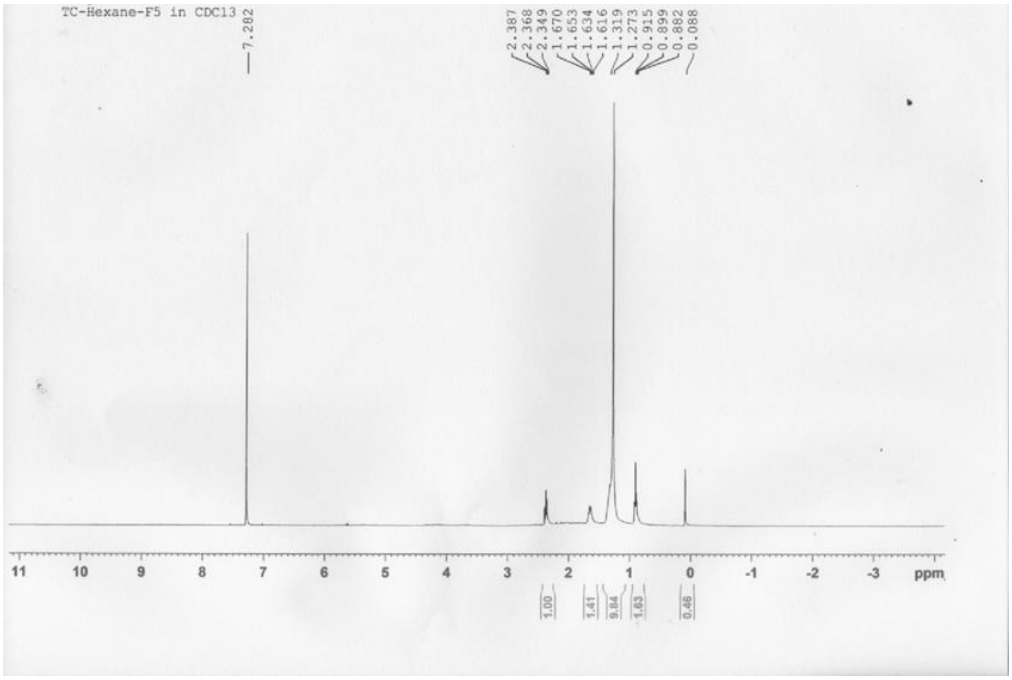
ตารางที่ ฉ-1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก โดยใช้สารละลาย *L*-DOPA เป็นซับสเตรต

ความเข้มเข้มของกรดโคจิก (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492 nm			% Tyrosinase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
0.625	0.071	0.069	0.064	79.52	80.10	81.54	80.39	1.04
0.313	0.138	0.111	0.113	60.20	67.98	67.41	65.20	4.34
0.156	0.207	0.179	0.215	40.29	48.37	37.99	42.22	5.45
0.078	0.366	0.403	0.341	-5.57	-16.24	1.64	-6.72	9.00
0.004	0.474	0.507	0.483	-36.72	-46.24	-39.31	-40.76	4.92

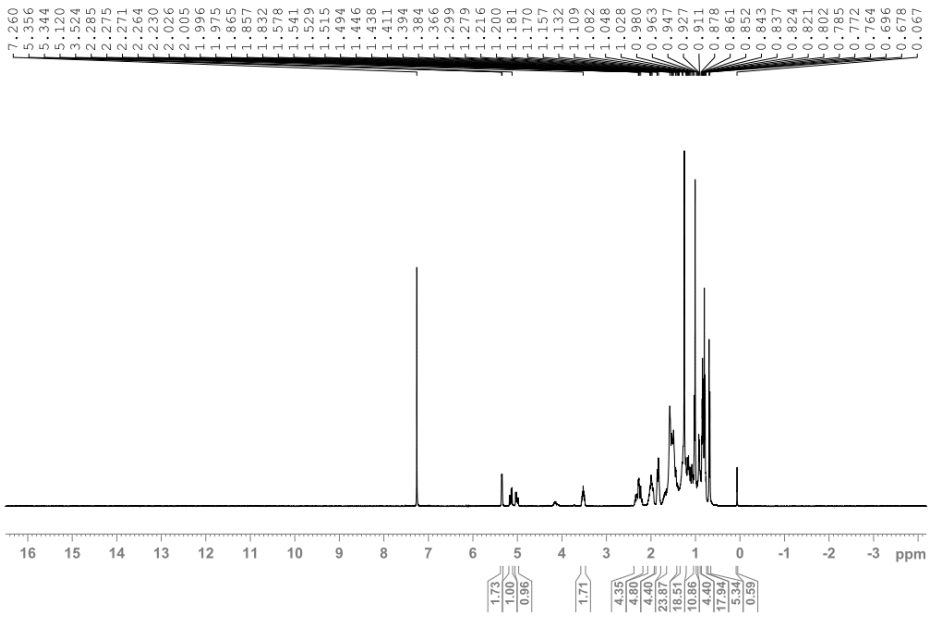
ตารางที่ ฉ-2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm และร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากเหง้าเนระพูสีไทยด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้สารละลาย *L*-DOPA เป็นซับสเตรต

สารสกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492 นาโนเมตร			% Tyrosinase inhibition				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
เฮกเซน	0.649	0.629	0.663	-3.51	-0.32	-5.74	-3.19	2.73
ไดคลอโรมีเทน	0.690	0.718	0.655	-10.05	-14.51	-4.47	-9.68	5.03
เอทิลอะซีเตต	0.774	0.765	0.728	-23.44	-22.01	-16.11	-20.52	3.89
เมทานอล	0.735	0.656	0.741	-17.22	-4.63	-18.18	-13.34	5.57
น้ำมันหอมระเหย	0.765	0.736	0.765	-22.01	-17.38	-22.01	-20.47	6.67

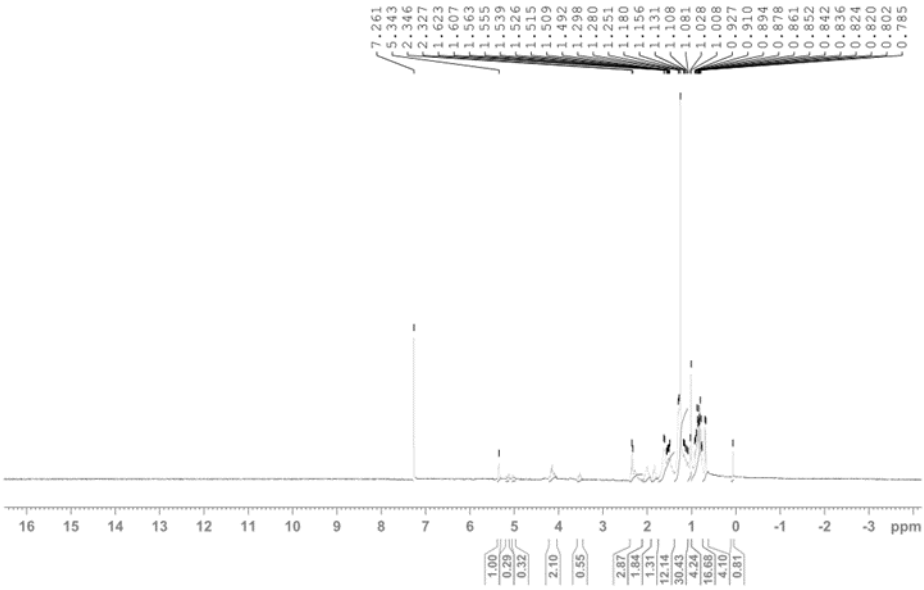
7. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี



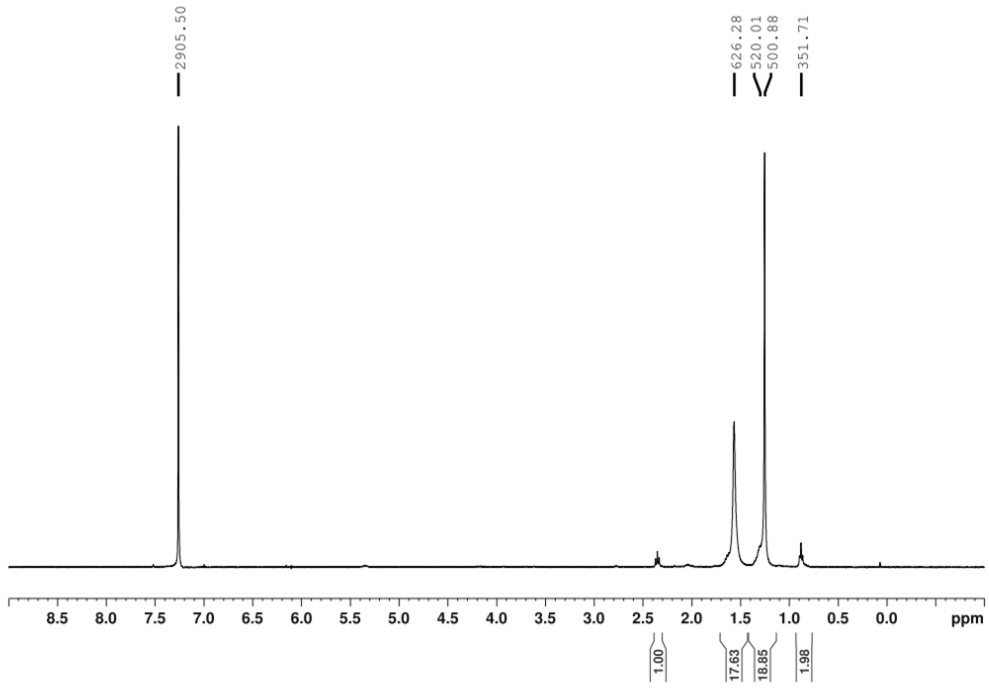
ภาพที่ ช-1 สเปกตรัมของสาร TC-hexane-F5s ได้จากเครื่อง NMR โดยเทคนิค ^{1}H NMR



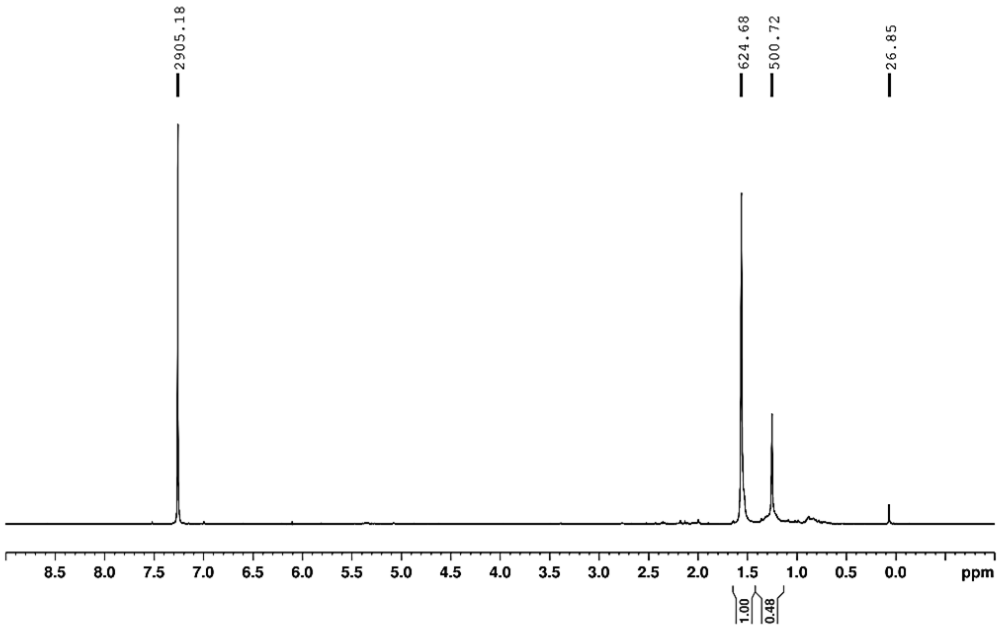
ภาพที่ ช-2 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F2s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



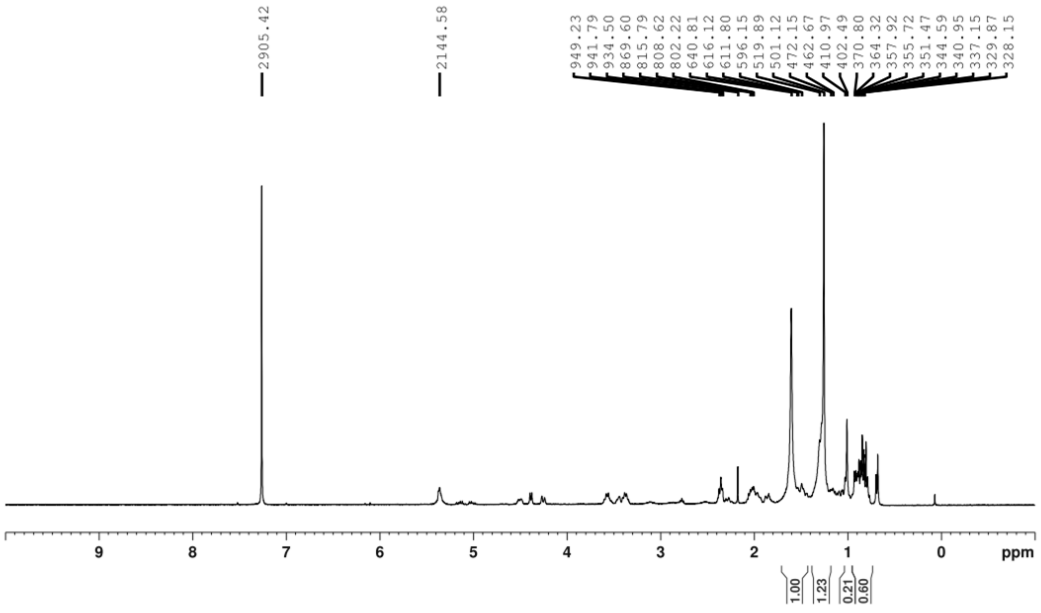
ภาพที่ ช-3 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F3s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



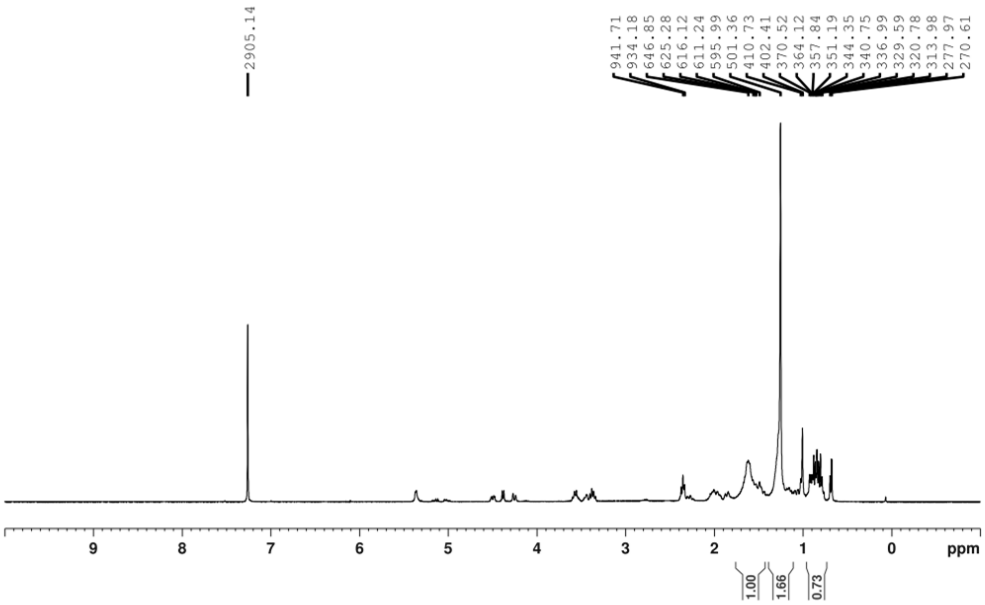
ภาพที่ ช-4 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F6s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



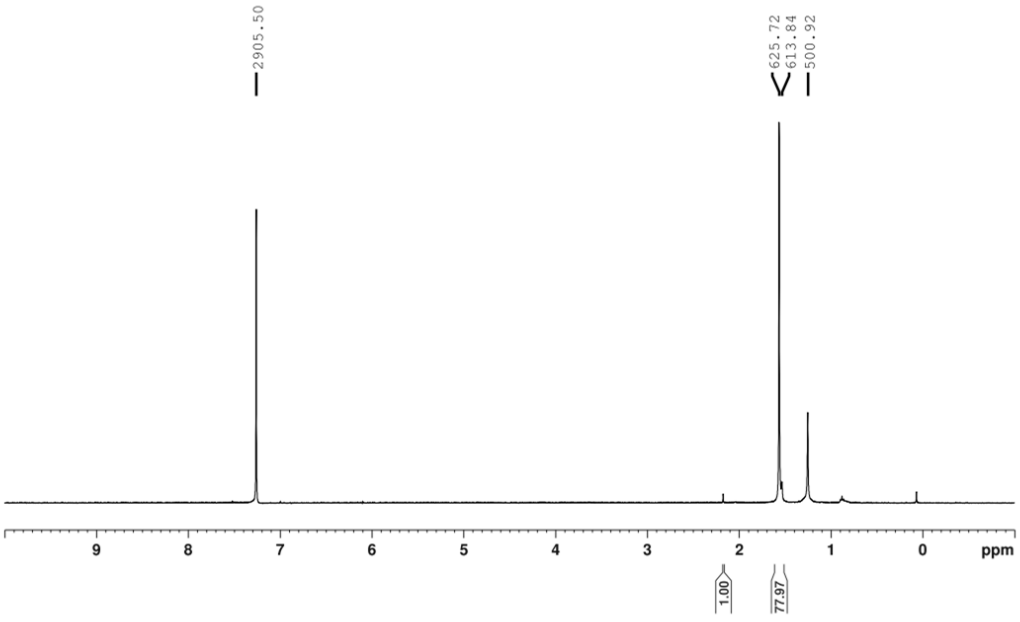
ภาพที่ ช-5 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F7s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



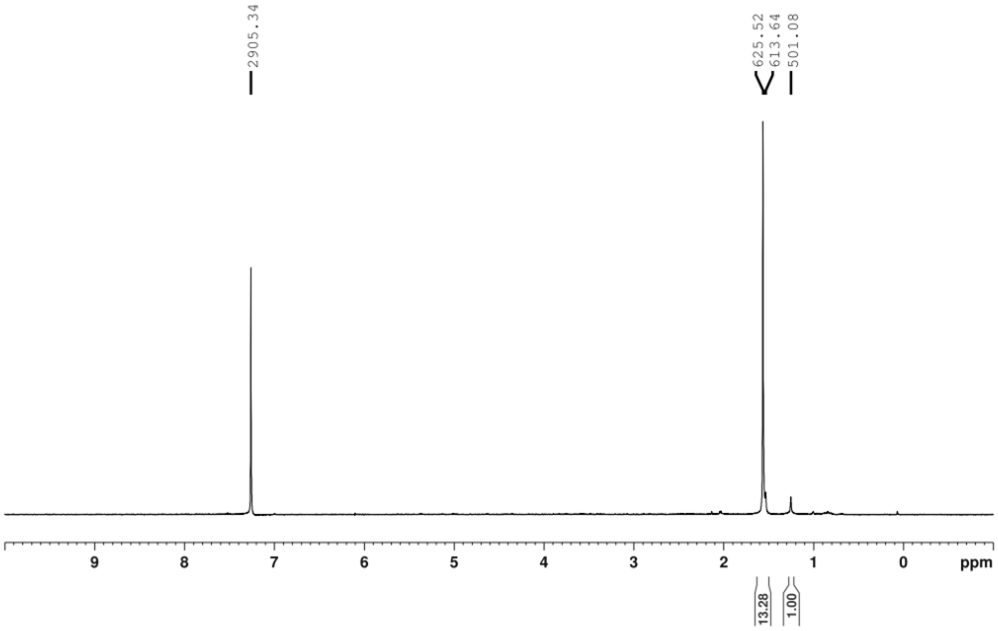
ภาพที่ ช-6 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F8s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



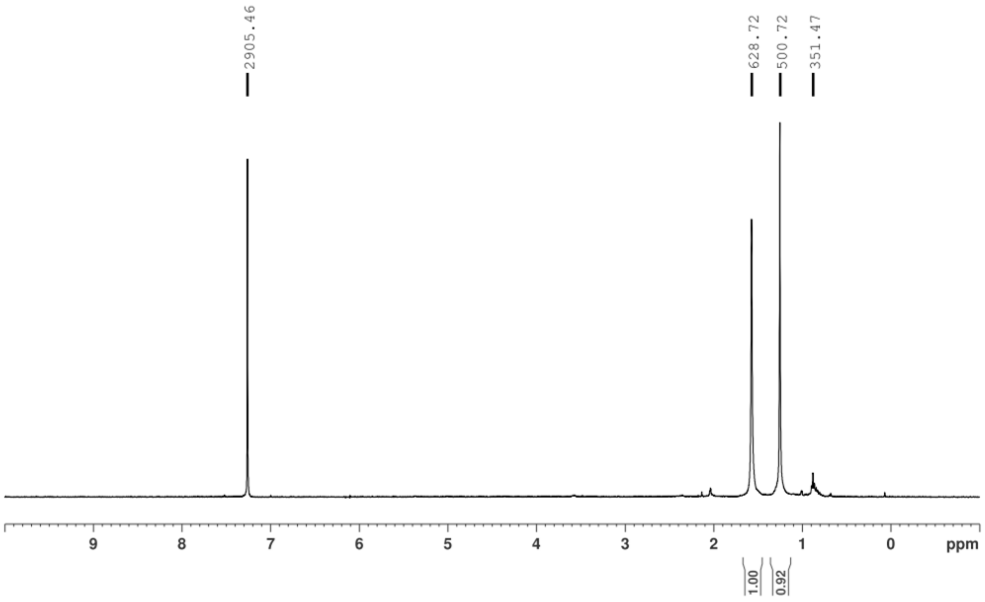
ภาพที่ ช-7 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F9s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



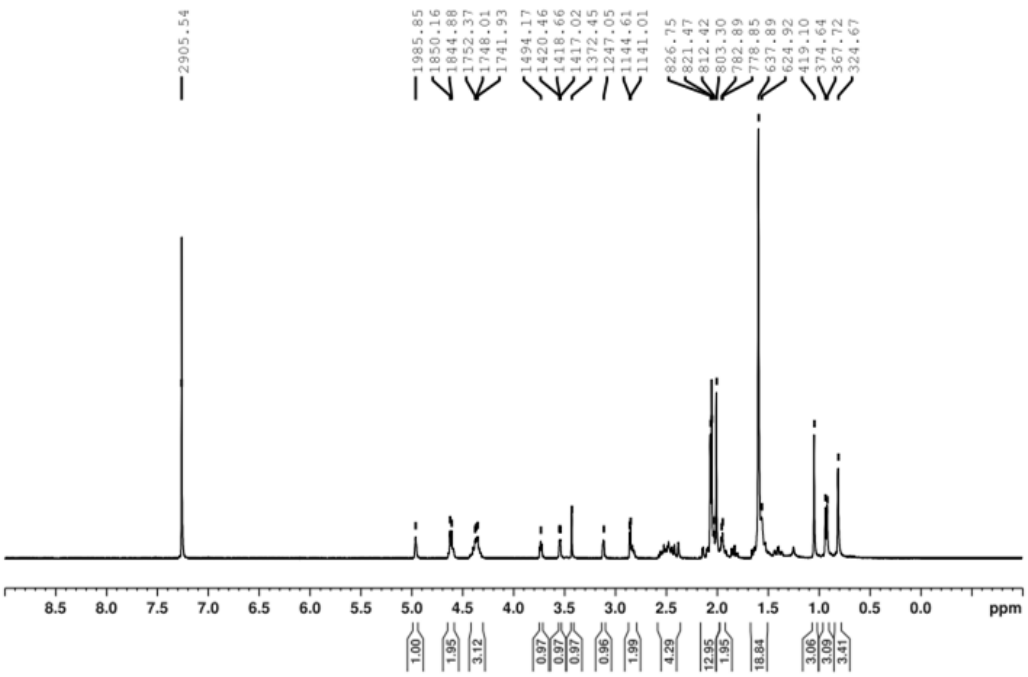
ภาพที่ ช-8 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F11s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



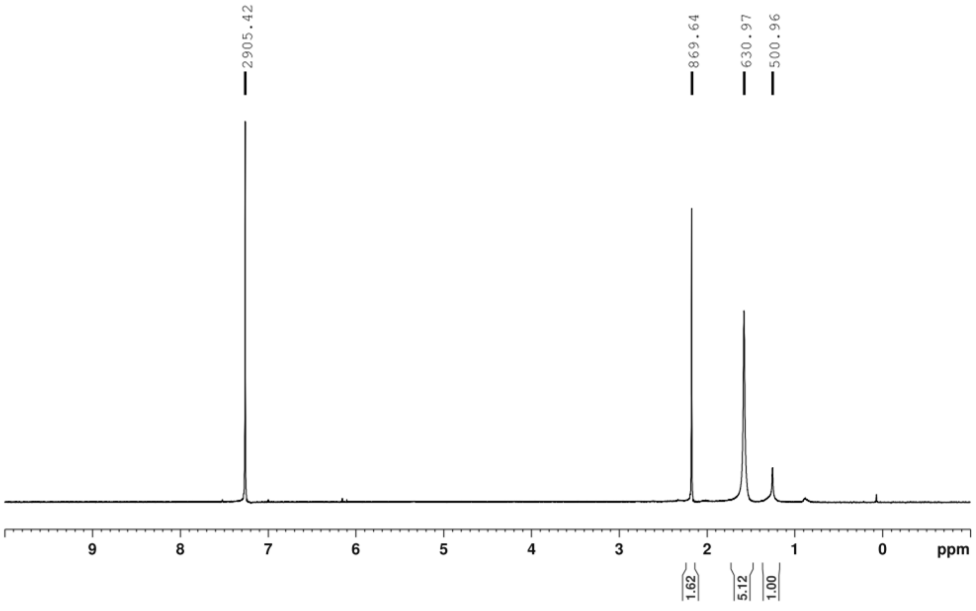
ภาพที่ ช-9 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F15s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



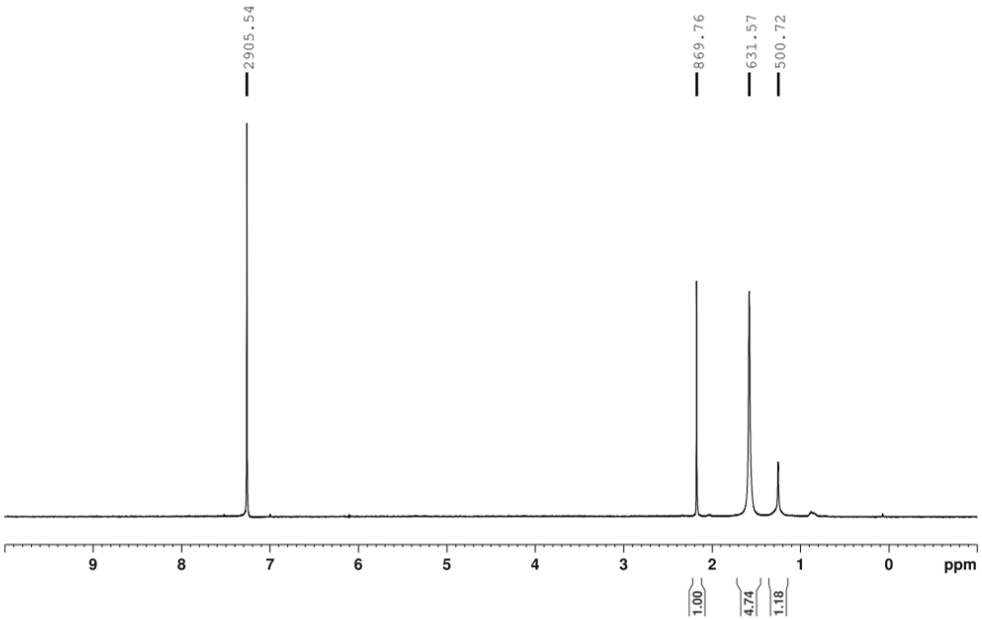
ภาพที่ ช-10 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F16s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



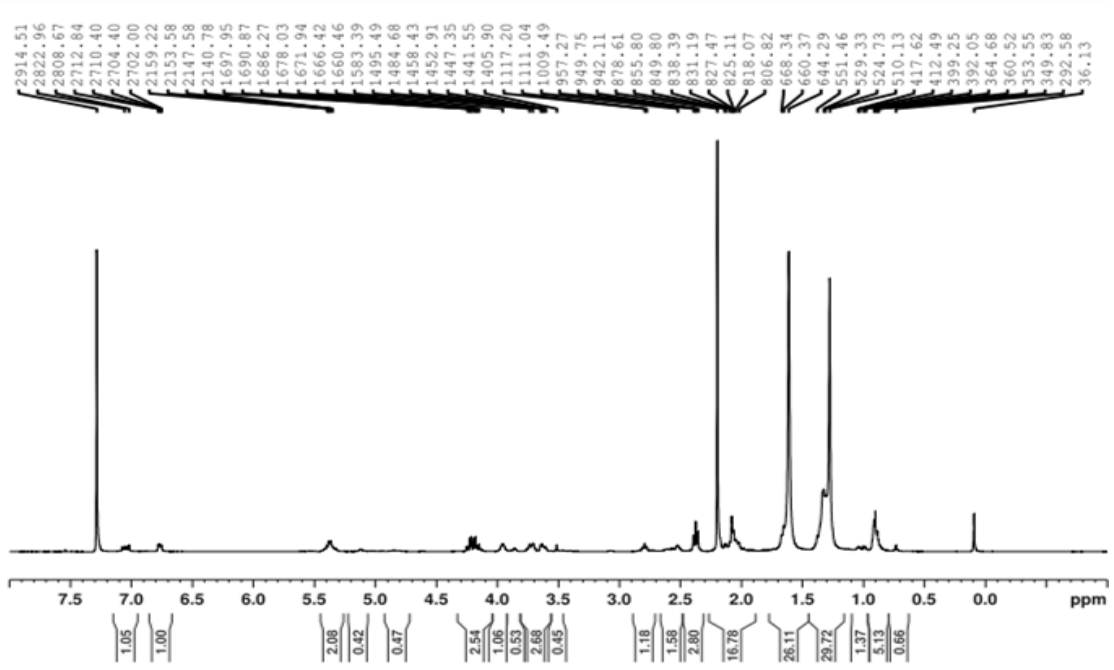
ภาพที่ ช-11 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F17s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



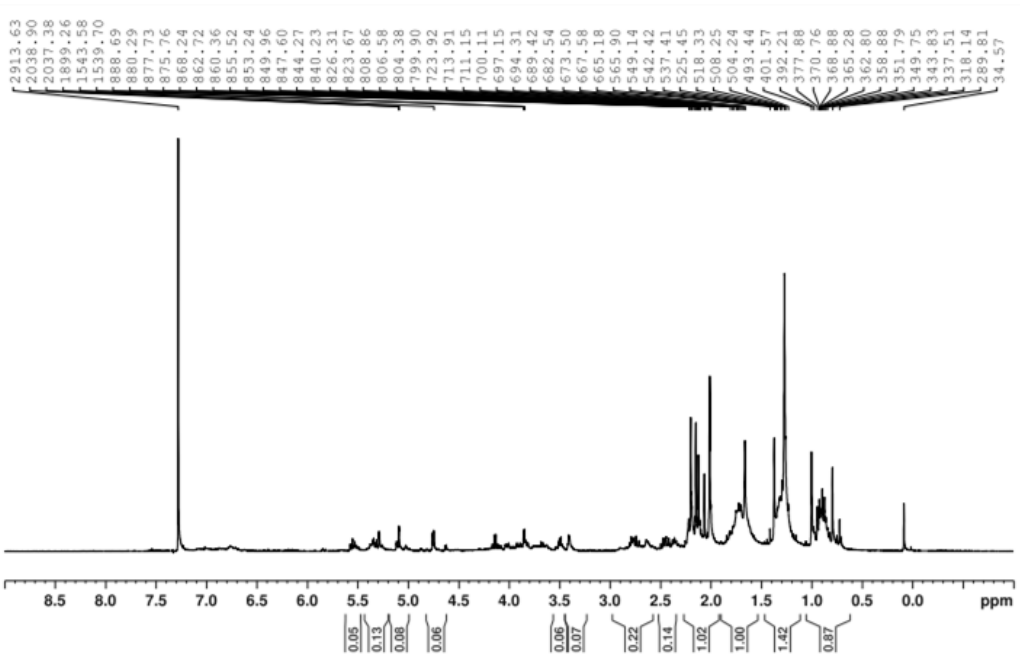
ภาพที่ ช-12 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH2Cl_2-F19s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



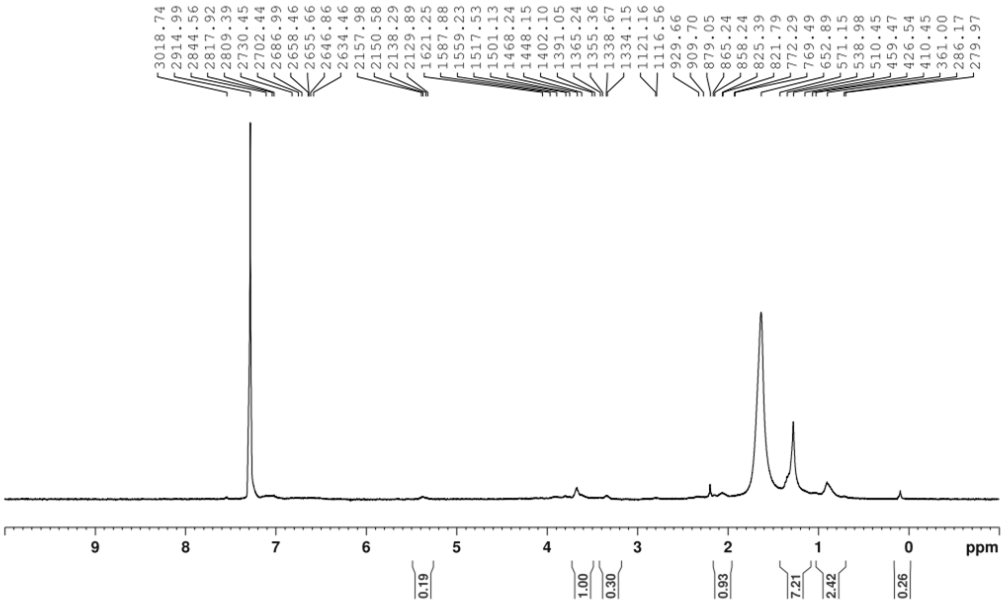
ภาพที่ ช-13 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F20s ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



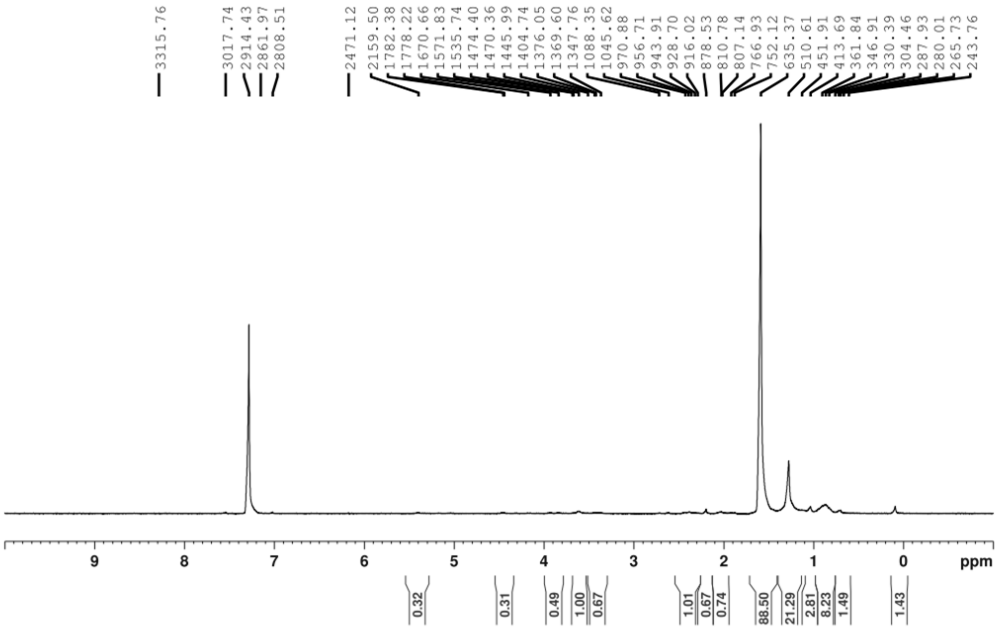
ภาพที่ ช-14 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F6-3ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



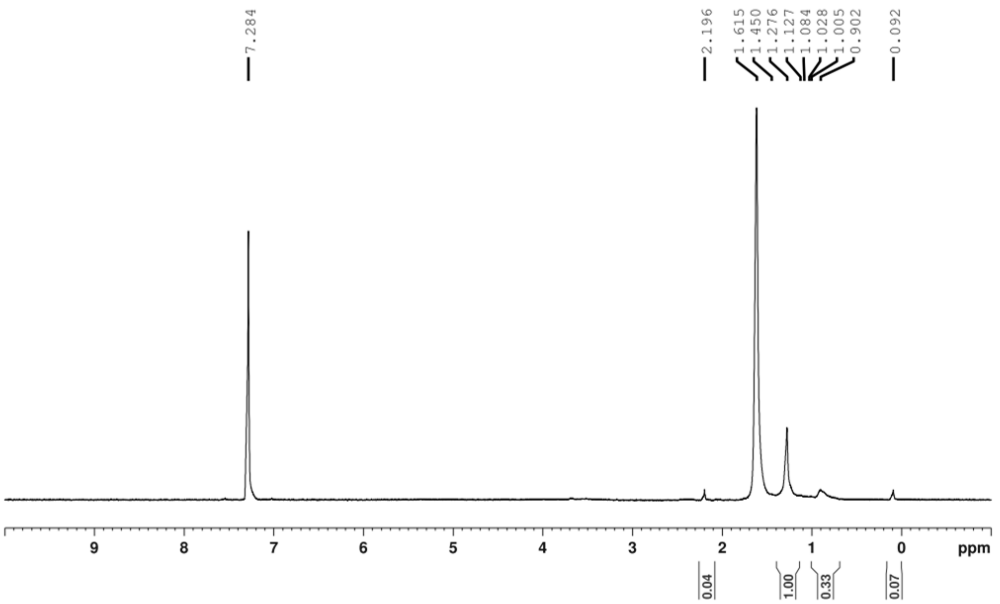
ภาพที่ ช-15 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F6-4 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



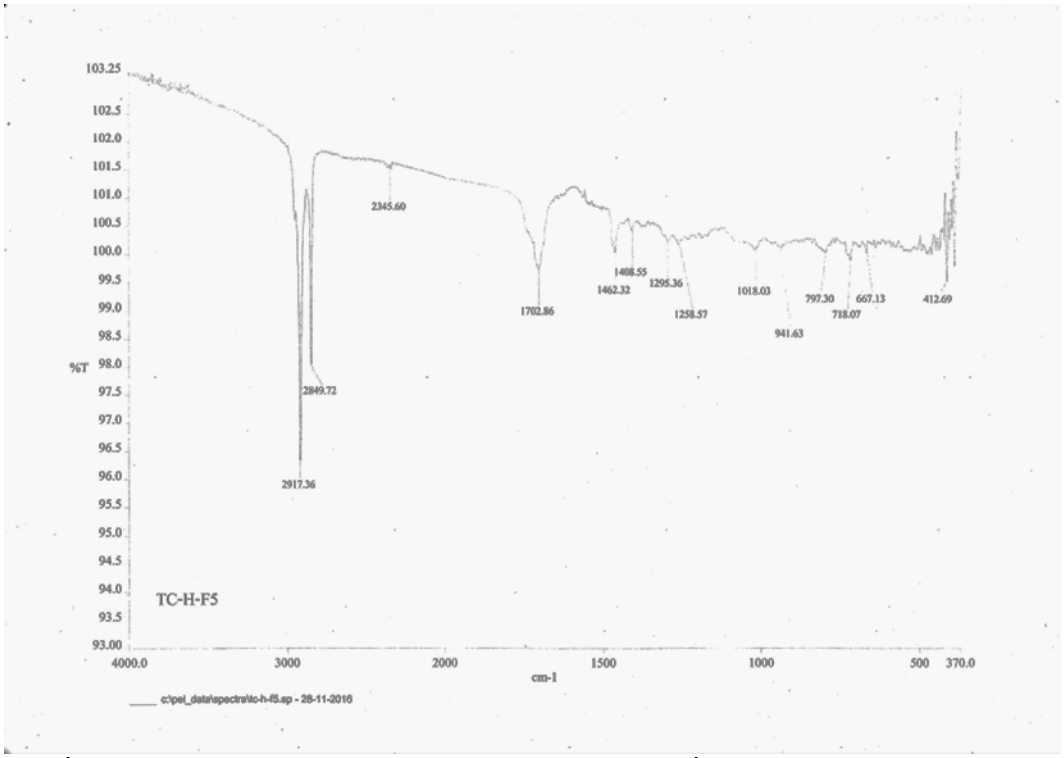
ภาพที่ ช-16 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F7-2 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



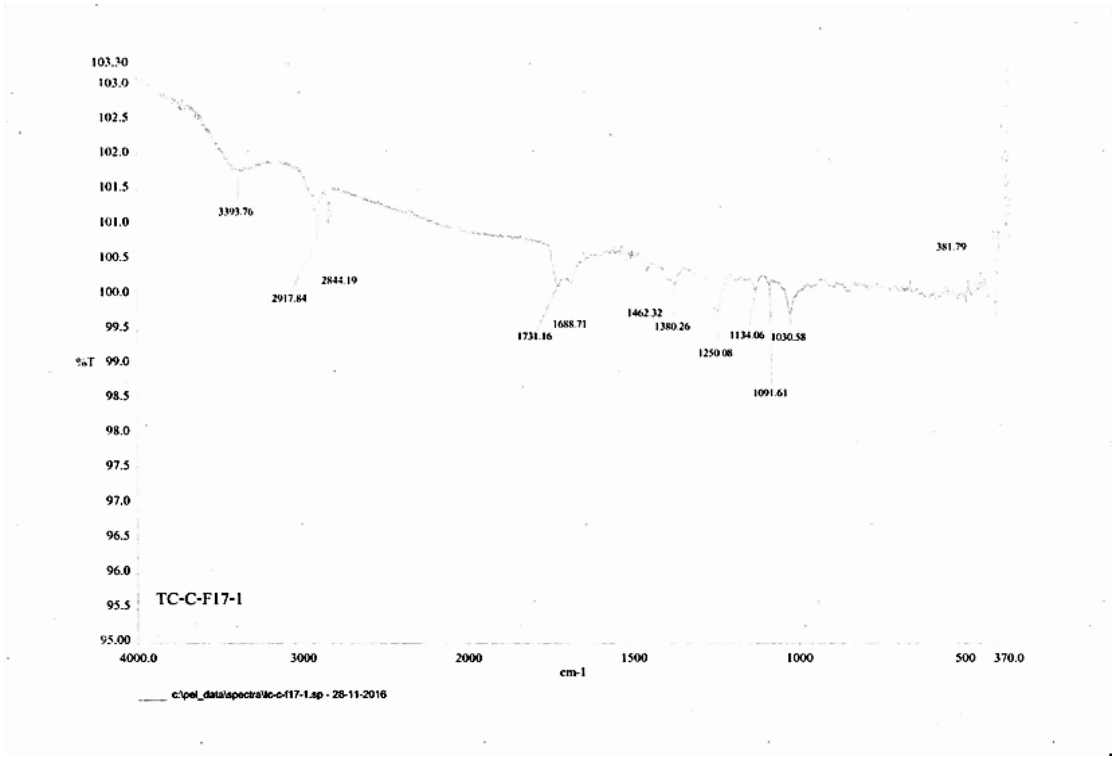
ภาพที่ ช-17 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F11-2 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



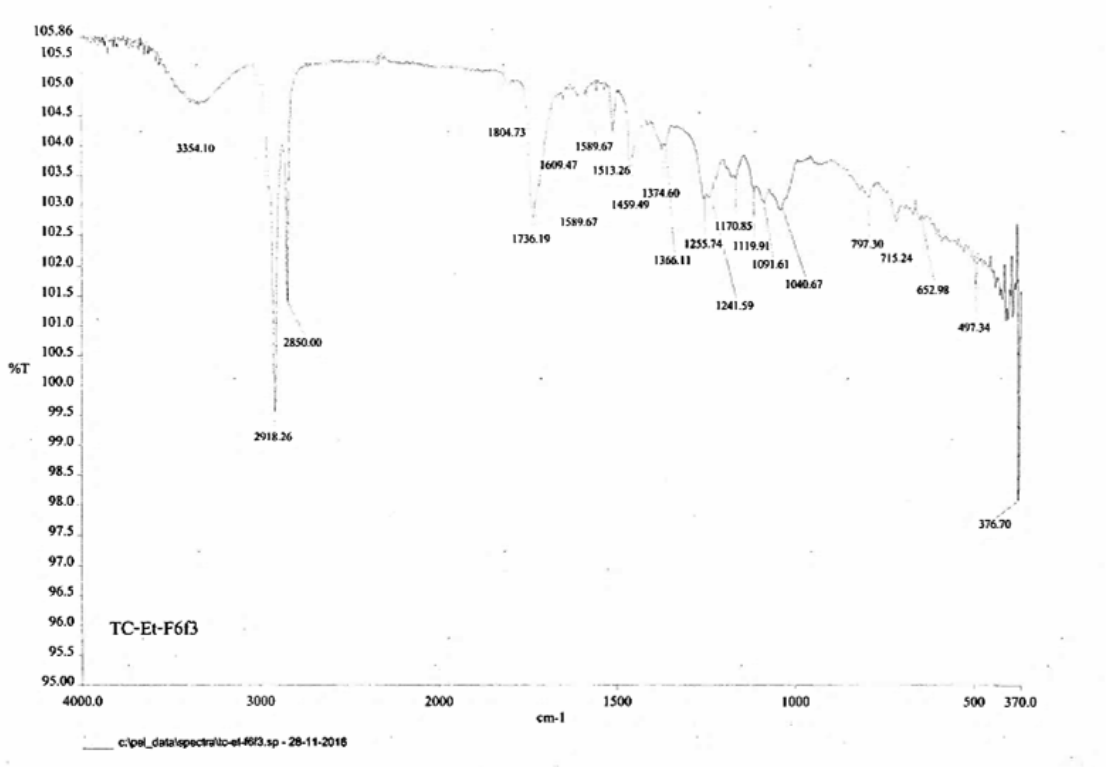
ภาพที่ ช-18 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F13-2 ได้จากเครื่อง NMR โดยใช้เทคนิค ^{1}H-NMR



ภาพที่ ช-19 สเปกตรัมของสารสาร TC-Hexane-F5s ได้จากเครื่อง IR



ภาพที่ ช-20 สเปกตรัมของสารสาร TC-CH_2Cl_2-F17s ได้จากเครื่อง IR



ภาพที่ ช-21 สเปกตรัมของสารสาร TC-EtOAc-F6-3 ได้จากเครื่อง IR