สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกชุมเห็ดเทศ

T049263

นางสาวจันทิกา ชูโชติรส
นางสาวจินตนา กูบกระโทก
นางสาวชมพูนุท อย่างละมัย

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 49263
วัน, เดือน, ปี 18 ก.พ. 2547

.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antioxidant Extraction from *Cassia alata* **Linn.** Barks

Miss Chantiga Choochottiros

Miss Jintana Goobkratoke

Miss Chompoonut Yanglamai

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกชุมเห็ดเทศ *Cassia alata* **Linn.**

นักศึกษา นางสาวจันทิกา ชูโชติรส

นางสาวจินตนา กูบกระโทก

นางสาวชมพูนุท อย่างละมัย

ภาควิชา เคมี

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2545

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ดร.ปุณณมา ศิริพันธ์โนน	
กรรมการ ดร.ชลลดา ฤตวิรุฬห์	
กรรมการ ดร.พัชนี เจริญยิ่ง	

(รศ.ดร.สมศักดิ์ วรมงคลชัย)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

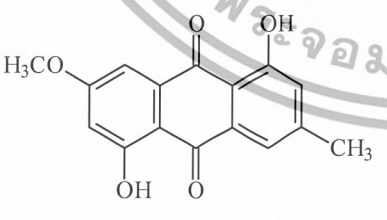
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกต้นชุมเห็ดเทศ

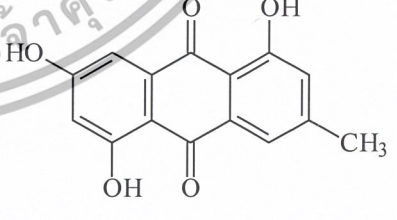
นักศึกษา นางสาวจันทิกา ชูโชติรส
นางสาวจินตนา กูบกระโทก
นางสาวชมพูนุท อย่างละมัย
ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2545
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. พัชนี เจริญยิ่ง

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสารสกัดจากเปลือกต้นชุมเห็ดเทศด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ด้วยวิธีการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธีพ่นด้วยสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) และวิธี Radical Scavenging Assay พบว่ามีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ จึงนำสารสกัดมาทำการแยกให้ได้สารปนเปื้อนน้อยที่สุดโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี และทำการศึกษาโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตสโกปี พบว่าสารที่ได้มีโครงสร้างอยู่ในกลุ่มแอนทราควิโนน โดยคาดว่าจะได้สารที่มีโครงสร้างดังนี้



โครงสร้าง 2/2/1



โครงสร้าง 2/3/2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

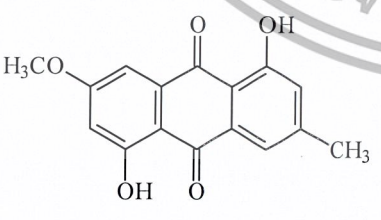
Special Project Title Antioxidant Extraction from *Cassia alata* **Linn.** Barks

Name	Miss Chantiga Choochottiros
	Miss Jintana Goobkratoke
	Miss Chompoonut Yanglamai
Department	Chemistry
Program	Industrial Chemistry
Academic Year	2002

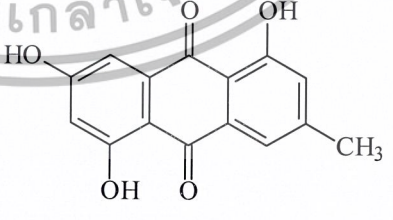
Special Project Advisor Dr. Patchanee Charoenying

Abstract

This research was to investigate an antioxidant activity from the crude chloroform extract of *Cassia alata* barks. The antioxidant activity in vitro was measured by means of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) free radical scavenging assay. The results found that the crude chloroform extract had moderately activity. Moreover, the pure compounds were purified by chromatography techniques. The structures of pure compounds, 2/2/1 and 2/3/2, were determined by spectroscopy techniques that they are in the group of antraquinone.



structure 2/2/1



structure 2/3/2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. พัชนี เจริญยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำสั่งสอนและให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน

ขอขอบคุณ ดร. ปุณณมา ศิริพันธ์โนน และดร. ชลลดา ฤตวิรุฬห์ คณะกรรมการทั้งสองท่านที่ได้แก้ไขและตรวจสอบโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ให้ความรู้ และข้อชี้แนะต่างๆทั้งในด้านการเรียนและการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณ นักศึกษาปริญญาโทในห้องปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

ขอขอบคุณ รุ่นพี่และเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือจนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

นางสาวจันทิกา ชูโชติรส

นางสาวจินตนา กูบกระโทก

นางสาวชมพูนุท อย่างละมัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญกราฟ	ญ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
อักษรย่อ	ฐ
บทที่1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 ทฤษฎี	4
2.1.1 สมุนไพร	5
2.1.2 สารสำคัญในสมุนไพร	5
2.2 การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร	12
2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช	12
2.2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืช	12
2.2.3 การเลือกใช้ตัวทำละลาย	13
2.3 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช (Phytochemical Screening)	14
2.3.1 การเตรียมสารสกัด	16
2.3.2 การตรวจสอบโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี	16
2.3.3 การตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.4 การตรวจสอบสารต่อต้านอนุมูลอิสระด้วย
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) 17
2.4 การแยกส่วนผสม 17
2.4.1 Stationary phase 18
2.4.2 การเลือก adsorbent 19
2.4.3 ตัวทำละลายที่ใช้ในโครมาโตกราฟี 19
2.4.4 Thin-layer Chromatography (TLC) 19
2.5 ชุมเห็ดเทศ 20
2.5.1 ลักษณะ 21
2.5.2 สารประกอบที่สำคัญ 21
2.5.3 ลักษณะทางภูมิศาสตร์ 21
2.5.4 พฤษเคมี 21
2.5.5 เภสัชวิทยา 22
2.6 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literature survey) 23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 25
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 25
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 25
3.3 ขั้นตอนการวิจัย 26
3.4 วิธีการทดลอง 27
บทที่ 4 ผลการวิจัย 31
4.1 ผลการสกัดตัวอย่างพืชด้วยวิธีแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 31
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด โดยวิธี
DPPH Radical Scavenging Assay 31
4.3 ผลการแยกสารสกัดหยาบจากชั้นคลอโรฟอร์มโดยเทคนิคคอลัมน์โตรมาโตกราฟี
และผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด 35
4.3.1 ผลการแยกสารสกัดจากสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม (Crude Extract) 35
4.3.2 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2 36
4.3.3 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/2 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.4 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/3	39
4.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2	41
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	43
5.1 สรุปผลการวิจัย	43
5.2 ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.1	สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH)	1
รูปที่ 1.2	สูตรโครงสร้างของ BHT, BHA และ TBHQ	2
รูปที่ 2.1	สูตรโครงสร้างของ caffeic acid (1) และ gallic acid (2)	5
รูปที่ 2.2	สูตรโครงสร้างของน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต	6
รูปที่ 2.3	สูตรโครงสร้างของเอมีน	6
รูปที่ 2.4	สูตรโครงสร้างของแอลคาลอยด์	7
รูปที่ 2.5	สูตรโครงสร้างของนิวคลีโอไซด์, นิวคลีโอไทด์, กรดนิวคลีอิก	7
รูปที่ 2.6	สูตรโครงสร้างของ Non-Phenolic Aromatics	8
รูปที่ 2.7	สูตรโครงสร้าง Simple Phenols	9
รูปที่ 2.8	สูตรโครงสร้างของ Phenol Ethers	9
รูปที่ 2.9	สูตรโครงสร้างของ Phenylpropanoids	10
รูปที่ 2.10	สูตรโครงสร้างของ Quinones	10
รูปที่ 2.11	สูตรโครงสร้างของ Flavonoids	11
รูปที่ 2.12	ชุมเห็ดเทศ	20
รูปที่ 2.13	สูตรโครงสร้างของ emodin และ rhein	21
รูปที่ 2.14	สูตรโครงสร้างของแอนทราควิโนนที่มีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซีและเมททอกซีที่แตกต่างกัน	23
รูปที่ 2.15	สูตรโครงสร้างของ kaempferol	24
รูปที่ 3.1	ลักษณะของแผ่น TLC ก่อนและหลังพ่น DPPH	28
รูปที่ 4.1.ก.	แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน	32
รูปที่ 4.1.ข.	ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน	32
รูปที่ 4.2.ก.	แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม	33
รูปที่ 4.2.ข.	ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม	33
รูปที่ 4.3.ก.	แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล	34
รูปที่ 4.3.ข.	ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.4.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/2/1 38

รูปที่ 4.4.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/2/1 39

รูปที่ 4.5.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/3/2 40

รูปที่ 4.5.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/3/2 40

รูปที่ 4.6.1 โครงสร้างของสารส่วนย่อย 2/2/1 41

รูปที่ 4.6.2 โครงสร้างของสารส่วยย่อย 2/3/2 42

รูปที่ 5.1 โครงสร้างของสารที่สกัดได้จาก ส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2 44

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตาราง 4.1	แสดงค่าน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย	31
ตาราง 4.2	แสดงค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายต่างๆ	35
ตาราง 4.3.1	ผลการแยกสารสกัดหยาบจากชั้นคลอโรฟอร์มและค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ	35
ตาราง 4.3.2	ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2 และค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ	36
ตาราง 4.3.3	ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/2	38
ตาราง 4.3.4	ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/3	39
ตาราง 4.4.1	แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 2/2/1ด้วยเครื่อง FT-NMR spectrometer	41
ตาราง 4.4.2	แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 2/3/2 ด้วยเครื่อง FT-NMR spectrometer	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญกราฟ

หน้า

กราฟ 4.3.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 7 ส่วยย่อย 36

กราฟ 4.3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 3 ส่วนย่อย 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก

		หน้า
ภาคผนวกที่ 1	วิธีการพล็อตกราฟเพื่อหาค่า ED_{50}	46
ภาคผนวกที่ 2	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ตัวทำละลายชั้นต่าง ๆ	46
กราฟผนวกที่ 2-1	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ชั้นตัวทำละลายเฮกเซน	46
กราฟผนวกที่ 2-2	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ชั้นตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม	47
กราฟผนวกที่ 2-3	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใน ชั้นตัวทำละลายเมทานอล	47
ภาคผนวกที่ 3	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของ BHT	48
ภาคผนวกที่ 4	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัด 7 ส่วนย่อย จากสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม	49
กราฟผนวกที่ 4-1	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 1	49
กราฟผนวกที่ 4-2	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2	49
กราฟผนวกที่ 4-3	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 3	50
กราฟผนวกที่ 4-4	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 4	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาคผนวก (ต่อ)

		หน้า
กราฟผนวกที่ 4-5	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 5	51
กราฟผนวกที่ 4-6	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 6	51
กราฟผนวกที่ 4-7	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 7	52
ภาคผนวกที่ 5	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2	53
กราฟผนวกที่ 5-1	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/1	53
กราฟผนวกที่ 5-2	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/2	53
กราฟผนวกที่ 5-3	กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/3	54
ภาคผนวกที่ 6	ข้อมูลการวิเคราะห์สารสกัดที่บริสุทธิ์ ด้วย FT-NMR spectrometer	55
ตารางผนวกที่ 6-1	ตารางแสดงค่า ^{1}H-NMR Chemical shift ของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/2/1	55
รูปผนวกที่ 6-2	รูปแสดงพีก ^{1}H-NMR ของสารสกัดส่วน ย่อยที่ 2/2/1	56
รูปผนวกที่ 6-3	รูปแสดงการขยายพีก ^{1}H-NMR ของสาร สกัดส่วนย่อยที่ 2/2/1	56
ตารางผนวกที่ 6-4	ตารางแสดงค่า ^{1}H-NMR Chemical shift ของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/3/2	57
รูปผนวกที่ 6-5	รูปแสดงพีก ^{1}H-NMR ของสารสกัดส่วน ย่อยที่ 2/3/2	58
รูปผนวกที่ 6-6	รูปแสดงการขยายพีก ^{1}H-NMR ของสาร สกัดส่วนย่อยที่ 2/3/2	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษรย่อ

ชื่อย่อ	ความหมาย
BHT	Butylated hydroxytoluene
ED_{50}	Effective Dose 50
TLC	Thin Layer Chromatography
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
FT-NMR	Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance

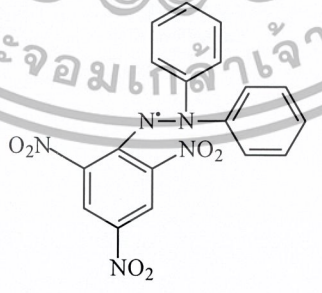
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ [1]

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เป็นสาเหตุให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้เกิดโรคต่างๆได้มากมาย เช่นโรคมะเร็ง เนื้องอก การเกิดริ้วรอยก่อนวัย เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีงานวิจัยมากมายที่ให้ความสนใจ ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช สมุนไพร โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีคุณสมบัติ ในการยับยั้งการเกิดรีแอกทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species) หรือจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยตรง โดยกลไกที่เกิดขึ้นคือ สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนอะตอม (H) แก่อนุมูลอิสระ ในพืชสมุนไพรจะมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีโนลิก (phenolic) โดยเฉพาะสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavoniod) และสารประกอบโพลีไฮดรอกซี (polyhydroxy) ซึ่งจะมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนในงานวิจัยนี้เราได้เลือกสมุนไพรชุมเห็ดเทศ โดยใช้ส่วนของเปลือกมาทำการสกัดเพื่อหาสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งก่อนหน้านั้นมีงานวิจัยที่ได้รายงานว่าในส่วนของใบพบสารต้านอนุมูลอิสระ และทำการทดสอบสารที่สกัดได้โดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) นำสารที่ได้มาแยกให้บริสุทธิ์และหาโครงสร้างต่อไป



รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH)

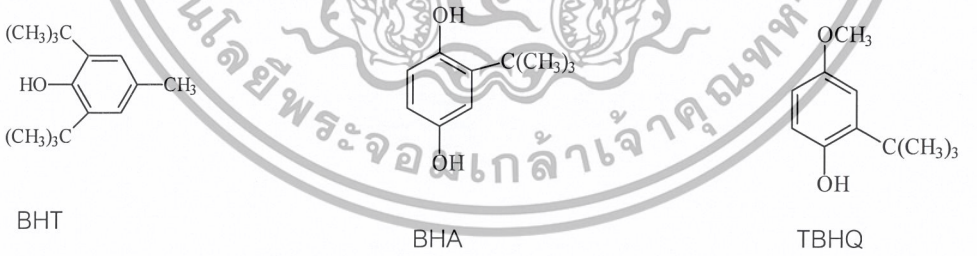
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากพืชสมุนไพรสกุล Cassia โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล
2. เพื่อนำสารสกัดที่แยกได้ไปศึกษาสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay
3. เพื่อศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากเปลือกต้นชุมเห็ดเทศ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรธรรมชาติ ที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสมุนไพรที่นำมาศึกษานี้คือ เปลือกของต้นชุมเห็ดเทศ โดยทำการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมี จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อดูว่าสารที่สกัดได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับใดเมื่อเทียบกับสารสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT), Butylated hydroxyanisole (BHA) และ *tert*-Butylhydroquinone (TBHQ) แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบที่มีในสมุนไพร [2]



รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างของ BHT, BHA และ TBHQ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1. ซื้อตัวอย่างของพืชที่สนใจที่ร้านเจ้ากรมเป๋อ ในที่นี้คือ ต้นชุมเห็ดเทศนำมาตากให้แห้ง จากนั้นแกะเอาเฉพาะเปลือกแล้วนำไปบดให้ละเอียด
2. นำตัวอย่างพืชที่ได้ในข้อ 1 มาสกัดโดยวิธีการแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล เป็นเวลา 1 สัปดาห์โดยจะแช่ในเฮกเซนก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์จากนั้นนำมากรองแยกส่วนที่เป็นกากและชั้นตัวทำละลาย แล้วจึงนำกากไปแช่ในตัวทำละลายตัวต่อไปที่มีขั้วสูงกว่า คือ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ตามลำดับ
3. นำชั้นตัวทำละลายที่ได้จากการสกัดแต่ละชั้นตัวทำละลายมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ จะเรียกส่วนนี้ว่า สารสกัดหยาบ (crude extract)
4. แบ่งสารสกัดหยาบ มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยวิธี DPPH radical scavenging assay
5. ทำการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่างๆ ด้วยเทคนิค TLC
6. ทำการแยกสารโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
7. วิเคราะห์ตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระในแต่ละส่วนย่อย

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีเตรียมและเก็บรักษาสมุนไพร ที่จะไปใช้ในงานวิจัย
2. ทราบเทคนิคในการสกัดสารอินทรีย์จากพืชสมุนไพรในธรรมชาติ
3. ทราบถึงวิธีการหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสม
4. ทราบเทคนิคการแยกสารโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
5. ทราบวิธีตรวจสอบและวิเคราะห์เบื้องต้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้
6. ทราบถึงโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

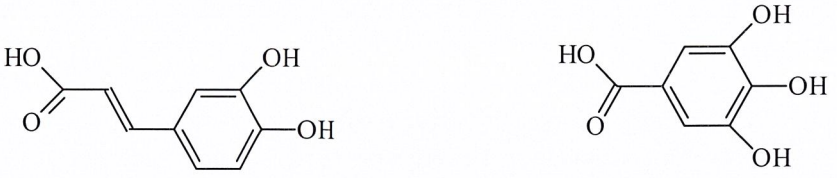
บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ทฤษฎี [3]

ปัจจุบันพบว่าโรคซึ่งเป็นสาเหตุการตายของมนุษย์ที่สำคัญ ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคอื่นๆอีกหลายชนิด เช่น โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ อาการบวมอักเสบ และโรคมะเร็ง ล้วนมีสาเหตุมาจากการที่อนุมูลอิสระ (free radical) ที่เกิดขึ้นภายในร่างกายเข้าไปทำลายสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ เช่นชั้นไขมันในเซลล์เมมเบรน โปรตีนในเนื้อเยื่อ เอนไซม์ รวมทั้งดีเอ็นเอเป็นผลให้เกิดความผิดปรกติในร่างกายและนำมาซึ่งโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมา โดยปกติร่างกายจะมีกลไกควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะด้วยเอนไซม์ได้แก่ superoxide dismutase และ peroxidase เป็นต้น แต่ในปัจจุบันพบว่าอนุมูลอิสระภายในร่างกายเกิดในระดับที่สูงขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนไปของสภาวะแวดล้อมไม่ว่าจะเป็นมลพิษด้านต่างๆ หรือความเครียดที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ร่างกายไม่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระเหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะได้ ดังนั้นการเสาะหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติชนิดใหม่ๆ ซึ่งสามารถนำไปชะลอหรือป้องกันการเกิดโรคร้ายต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน

สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถยับยั้งการเกิดรีแอคทีฟ ออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive Oxygen Species) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน แรดิคัล (superoxide anion radical) และไฮดรอกซิล แรดิคัล (hydroxyl radical) โดยการจับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเพื่อทำให้อนุมูลอิสระไม่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาอีกต่อไป สารต้านอนุมูลอิสระที่มีโครงสร้างดังเช่น ฟีนอล จะให้อนุมูลอิสระที่มีความเสถียร ซึ่งสามารถหยุดยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ เป็นที่ทราบกันดีว่าวิตามินบางชนิดเช่น วิตามินซี วิตามินอี และสารที่พบในพืชเช่น แคโรทีนอยด์ เบต้าแคโรทีนนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่วนสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรนั้นพบว่ามักเป็นสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เช่น quercetin และ rutin และสารในกลุ่มของกรดฟีโนลิก (phenolic acids) เช่น gallic acids, caffeic acids และ tannin เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระ สามารถสกัดแยกได้จากพืชหลายชนิด เช่น เมล็ดที่มีน้ำมัน, ธัญพืช, ผัก, ผลไม้ และส่วนต่างๆของพืชสมุนไพร เช่น ใบ เปลือก และราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(1) (2)

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของ caffeic acid (1) และ gallic acid (2)

2.1.1 สมุนไพร [3]

สมุนไพร หมายถึง พืชที่มีสรรพคุณในการรักษาโรค หรืออาการเจ็บป่วยต่างๆ การใช้สมุนไพรสำหรับรักษาโรค หรืออาการเจ็บป่วยต่างๆ นี้ จะต้องนำเอาสมุนไพรตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปมาผสมรวมกันซึ่งจะเรียกว่า "ยา" ในตำรับยานอกจากพืชสมุนไพรแล้วยังอาจประกอบด้วยสัตว์และแร่ธาตุอีกด้วย เราเรียกพืช สัตว์ หรือแร่ธาตุที่เป็นส่วนประกอบของยานี้ว่า "เภสัชวัตถุ" พืชสมุนไพรบางชนิดเช่น เร่ว กระวาน กานพลู และจันทน์เทศ เป็นต้น เป็นพืชที่มีกลิ่นหอม และมีรสเผ็ดร้อน ใช้เป็นยาสำหรับขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ พืชเหล่านี้ถ้านำมาปรุงอาหาร เราจะเรียกว่า "เครื่องเทศ" ในพระราชบัญญัติยาฉบับที่ 3 ปีพุทธศักราช 2522 ได้แบ่งยาที่ได้จากเภสัชวัตถุนี้ไว้เป็น 2 ประเภทคือ

1. ยาแผนโบราณ หมายถึงยาที่ใช้ในการประกอบโรคศิลปะแผนโบราณหรือในการบำบัดโรคของสัตว์ ซึ่งมีปรากฏอยู่ในตำรายาแผน โบราณที่รัฐมนตรีประกาศ หรือยาที่รัฐมนตรีประกาศให้เป็นยาแผนโบราณ หรือได้รับอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนตำรับยาเป็นยาแผนโบราณ

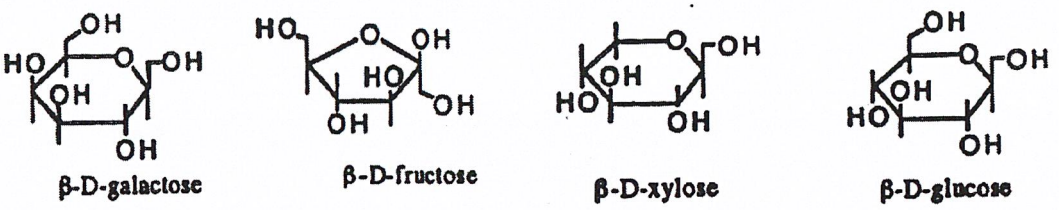
2. ยาสมุนไพร หมายถึงยาที่ได้จากพืช สัตว์ แร่ธาตุที่ยังมิได้ผสมปรุงหรือแปรสภาพ

2.1.2สารสำคัญในสมุนไพร [4]

1. ไขมัน (Lipids) เป็น biomolecule ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว มีโครงสร้างที่หลากหลาย โดยส่วนมากแล้วจะมีโครงสร้างเป็นไฮโดรคาร์บอนขนาดใหญ่

2. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) น้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการสังเคราะห์แสงของพืช เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของพืช จะสะสมอยู่ในรูปของแข็งและเกิดการรวมตัวเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่อยู่ในรูปเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของพืช สุดท้ายแล้วจะรวมกันอยู่ในรูปกลัยโคไซด์ ซึ่งจะมีหลายชนิดตามหมู่ฟังก์ชันที่มาเกาะอยู่ เช่น แอลกอฮอลิค กลัยโคไซด์ จะมีหมู่ไฮดรอกซิล และฟีโนลิก กลัยโคไซด์ จะมีสารประกอบฟีโนลิก

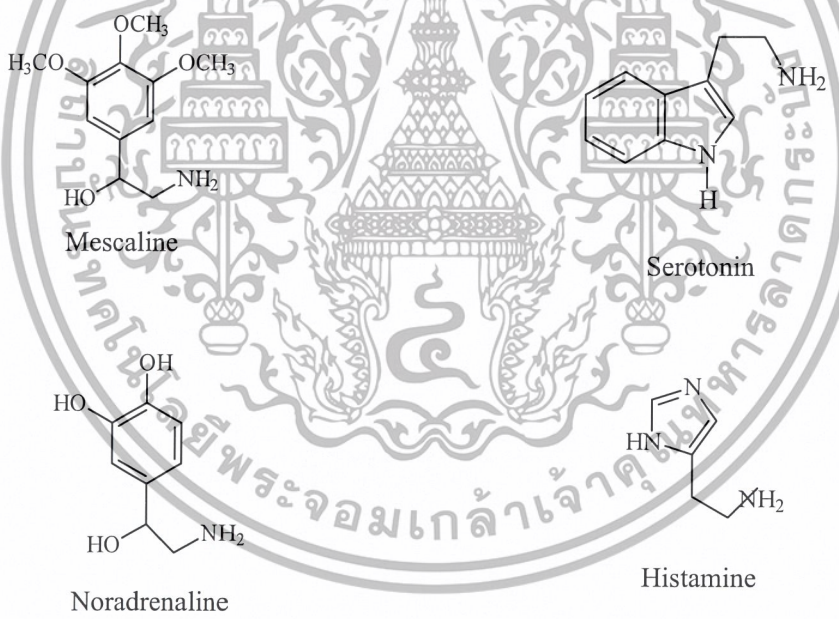
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



β-D-galactose β –D-fructose β-D-xylose β –D-glucose

รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต

3. เอมีน กรดอะมิโน และโปรตีน (Amines, Amino Acids and Proteins) เป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจนอยู่ในสายโซ่ โดยเอมีนจะอยู่ในรูปของเบส ส่วนอะมิโนเอซิดจะเป็นไดโพลาร์ (dipolar) โดยสภาวะความเป็นกรด-เบสจะขึ้นกับสภาพแวดล้อม

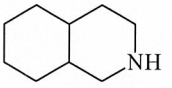


รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของเอมีน

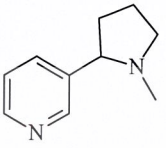
1. **แอลคาลอยด์** (Alkaloids) เป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจนอยู่ในโครงสร้างโดยไนโตรเจนจะอยู่ในวง แอลคาลอยด์ได้มาจากกรดอะมิโน (amino acids) และเทอร์ปีน (terpene) แอลคาลอยด์มีสมบัติเป็นยา เช่น คาเฟอีน (caffeine) ควินีน (quinine) และนิโคติน (nicotine)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

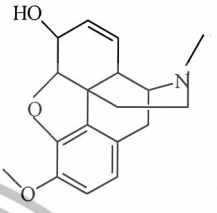
Tropane



Isoquinoline



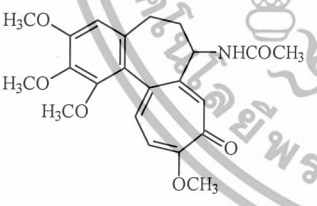
Nicotine



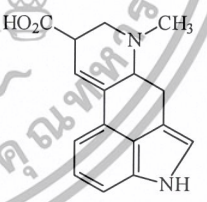
Morphine

รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของแอลคาลอยด์

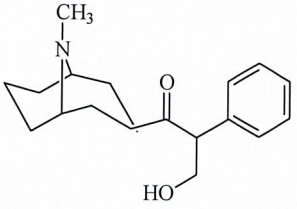
5. นิวคลีโอไซด์ นิวคลีโอไทด์ กรดนิวคลีอิก (Nucleosides, Nucleotides and Nucleic acids) **เป็นสารที่ทำหน้าที่รับและส่งข้อมูลของระบบพันธุกรรมของเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ซึ่งก็คือ DNA และ RNA ซึ่งจะเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่เกิดจากการรวมตัวของสารโมเลกุลเล็กๆที่แตกต่างกัน เช่น** adenine, thymine, uracil, cytosine และ guanine



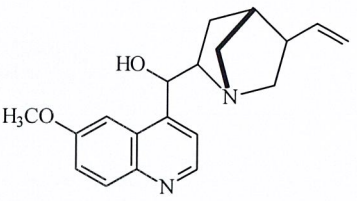
Colchicine



Lysergic Acid

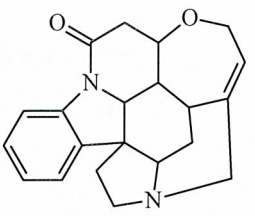


Atropine



Quinine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

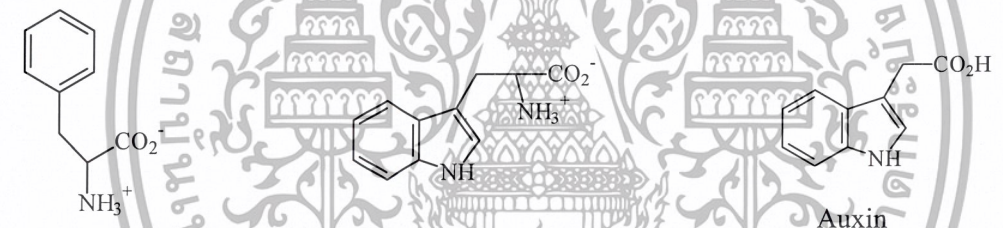


Strychnine

รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของนิวคลีโอไซด์, นิวคลีโอไทด์, กรดนิวคลีอิก

6. อะโรมาติก (Aromatics) จะแบ่งออกได้สองชนิดดังนี้

6.1 Non-Phenolic Aromatics เป็นสารประกอบอะโรมาติกที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้าง แต่จะมีหมู่ฟังก์ชันอื่น เช่น หมู่เอมีน และหมู่คาร์บอกซิลอยู่ในโครงสร้าง



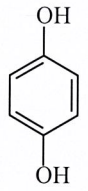
Phenylalanine Trytophan Auxin (Indole-3-acetic) acid)

รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของ Non-Phenolic Aromatics

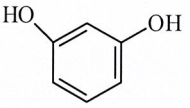
6.2 Phenols เป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโครงสร้าง ซึ่งเป็นสารส่วนใหญ่ที่พบในพืชสมุนไพร สามารถแบ่งออกได้อีกดังนี้

6.2.1 Simple Phenols เป็นสารมอนอเมอร์ของสารประกอบพอลิเมอริก พอลิฟี นอล (polymeric polyphenols) และ กรดซึ่งสร้างจากเนื้อเยื่อของพืช ประกอบด้วย ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) ฟลาโวแลน (flavolan) และ แทนนิน (tannins) โดยทั่วไป แล้วจะไม่ค่อยพบฟีนอลอิสระในพืช

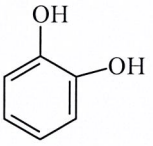
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



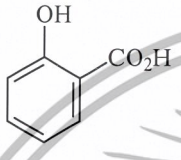
Hydroquinone

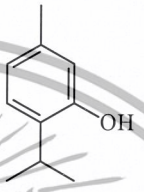


Resorcinol



Catechol



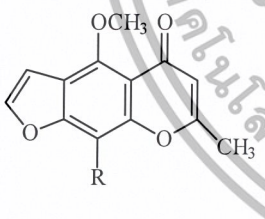


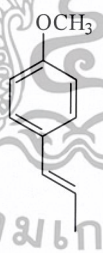
Salicylic acid

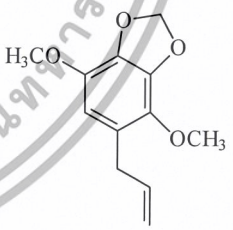
Thymol

รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้าง Simple Phenols

6.2.2 Phenol Ethers ส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปเมทิลอีเธอร์ (-OCH_3)







Khelin: R = OCH_3

Visnagin: R = H

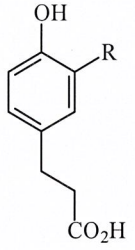
trans-Anethole

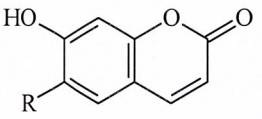
Apiol

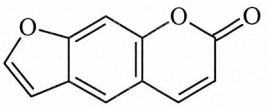
รูปที่ 2.8 สูตรโครงสร้างของ Phenol Ethers

6.2.3 Phenylpropanoids เป็นสารประกอบที่มีสายโซ่คาร์บอนที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอมต่ออยู่กับ โมเลกุลของสารประกอบฟีนอล เช่น ไฮดรอกซีคูมาริน (hydroxycoumarins) ฟีนิลโพรพีน (phenylpropenes) ลิกแนน (lignans) และกรดคูมาริก (coumaric acids)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้







p-Coumaric (R=H)
Caffeic acid (R=OH)

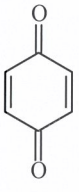
Umbelliferone (R=H)
Scopoletin (R=Ome)

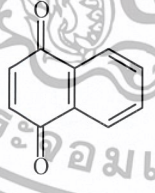
Psoralen

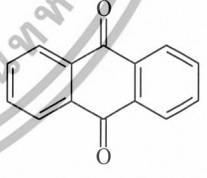
รูปที่ 2.9 สูตรโครงสร้างของ Phenylpropanoids

6.2.4 Tannins จะพบในพืชที่มีท่อ ประกอบไปด้วยสารประกอบฟีโนลิกหลากหลายชนิด เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนได้เป็นพอลิเมอร์ร่วม (copolymer) ที่ไม่ละลายน้ำ แทนนินจะมีรสขม

6.2.5 Quinones เป็นสารที่มีสีเข้ม สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ที่พบทั่วไปได้แก่ เบนโซควิโนน (benzoquinone) แนฟโทควิโนน (naphthoquinone) และแอนโทรควิโนน (anthroquinone)







Benzoquinone

Naphthoquinone

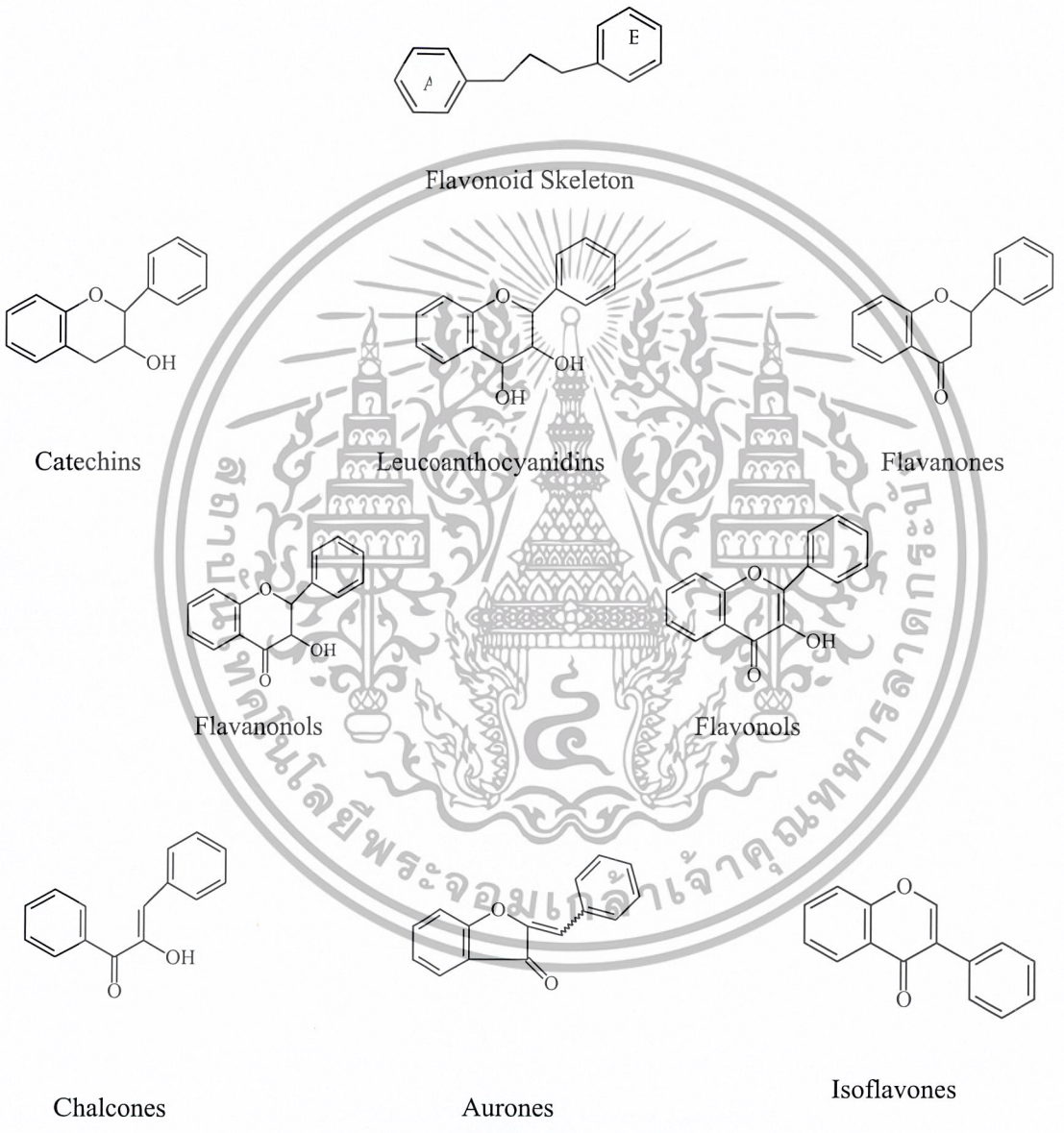
Anthroquinone

รูปที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของ Quinones

6.2.6 Flavonoids โครงสร้างประกอบด้วยวงเบนซีน (benzene) 2 วง โดยจะมีสายโซ่คาร์บอน 3 อะตอมเชื่อมวงเบนซีนทั้งสอง เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ มีสีสด เป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป เช่น catechines, leucoanthocyanidins, flavanones, flavanonols, flavones, anthocyanidins,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

flavonols, chalcones, aurones และ isoflavones โดยทั่วไป flavanones และ flavanonols จะพบอยู่ในรูปกลัยโคไซด์ ส่วน flavones และ flavonols จะพบในรูปฟีโนลิก



รูปที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของ Flavonoids

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญจากสมุนไพร [3]

ในการนำสารบริสุทธิ์จากสมุนไพรมาใช้จะต้องผ่านขบวนการต่างๆ คือ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (Plant material preparation)
2. การสกัด (Extraction)
3. การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)
4. การแยกส่วนประกอบ (Separation)
5. การตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification)

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชนับเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญซึ่งต้องคำนึงถึง สิ่งที่มีผลต่อความแตกต่างของสารสำคัญในพืช ได้แก่

1. การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง
2. ไม่มีพืชอื่นปน เพราะจะทำให้ได้สารแปลกปลอม ซึ่งอาจเป็นอันตรายได้
3. ไม่มีโรคพืช ถ้าตัวอย่างที่เก็บมามีจุลินทรีย์อันเป็นสาเหตุของโรคพืช จุลินทรีย์อาจให้สารซึ่งถูกสกัดออกมาพร้อมกับสารที่เราต้องการ นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืชที่ได้สารแตกต่างออกไปจากธรรมชาติ
4. ความแตกต่างของสารสำคัญในพืช (Variation of plant constituents) ในการเก็บพืชแต่ละครั้งเพื่อนำมาสกัดสารสำคัญในพืชอาจแตกต่างกันทั้งปริมาณและชนิด ซึ่งเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น ความแตกต่างเนื่องจากสายพันธุ์ แหล่งที่ปลูก เป็นต้น
5. ผลของการเก็บรักษาและการเตรียมพืช (Effect of preserving and processing process) ในการทำพืชให้แห้งบางครั้งจะทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเสียไป

2.2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่

1. Maceration เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถ เป็นต้น ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อยๆรินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกาก (marc)ให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้นำไปกรอง การสกัดสารถ้าจะสกัดให้หมดจด (exhausted) อาจจำเป็นต้องสกัดซ้ำหลายๆครั้ง วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Percolation เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator นำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ช.ม. เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อยๆบรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลงใน percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (solvent head) ประมาณ 0.5 ซ.ม. ทิ้งไว้ 24 ช.ม. จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก โดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์ บีบสารเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง

3. การสกัดด้วย Soxhlet Extractor เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปใน flask ด้วยวิธีกาลักน้ำ Flask นี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไป ทิ้งสารสกัดไว้ในflask ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งสารสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

4. **Liquid-liquid Extraction** เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก

5. **การสกัดน้ำมันหอมระเหย** (Extraction of volatile oil)

6. **การสกัดน้ำมันพืช** การสกัดน้ำมันพืชจากเมล็ดพืชอาจทำได้โดยใช้ความร้อนหรือไม่ใช้ความร้อนก็ได้ การบีบโดยใช้ความร้อนอาจได้น้ำมันออกมามากกว่า แต่จะบริสุทธิ์น้อยกว่า

1. **Extraction by Thermomicrodistillaton** เป็นการสกัดสารโดยใช้เครื่องมือ Thermomicro Analysis and Separation Ovens (TAS oven) เป็นการสกัดสารขนาดน้อยมาก

2.2.3 การเลือกใช้ตัวทำละลาย

ในการสกัดจะได้ผลดีหรือไม่ อยู่ที่การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติ

1. เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่เราต้องการสกัดได้พอดี
2. ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป
3. ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
4. ไม่เป็นพิษ
5. ราคาพอสมควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้คือ

1. สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน

2.ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุดในขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (selectivity)

3. แรง (force) แรงซึ่งเกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญคือ

3.1 Dispersion force เป็นแรงที่เกิดจาก transient charger induced ในโมเลกุล พวกตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจะประกอบด้วยโมเลกุลซึ่งเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้พวกสารที่ไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลได้ง่าย

3.2 Dipole-dipole force เป็นแรงที่พบในตัวทำละลายที่มีขั้วเกิดการเหนี่ยวนำในโมเลกุลเกิดเป็นขั้วบวก และขั้วลบ ทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกันแน่น พวกสารซึ่งไม่มีขั้วจะแทรกตัวเข้าไปได้ยาก

3.3 H-bonding สารที่สามารถสร้าง H-bonding กับตัวทำละลายได้ดีก็จะละลายได้ดี

โดยทั่วไปแล้วตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะกับสารที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมาะกับสารที่ไม่มีขั้ว การผสมระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วอาจทำให้การละลายดีขึ้น เช่นกรดสามารถละลายได้ทั้งในเอธานอล อะซีโตน

การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารที่สกัดได้มักมีปริมาตรโตและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธีคือ

1. Free evaporation คือการระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือ hot plate บางครั้งอาจจะเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ระเหยได้เร็วขึ้น

2. Distillation in vacuo เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ vacuum pump จะหมุนตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ

3. การแช่แข็ง (Freezing) ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำใช้ Iyophilizer หรือ freeze dryer แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งเราแยกจาก concentrated extract โดย centrifuge

4. Ultrafiltration เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้เมมเบรนใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช (Phytochemical Screening) [3]

การศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ได้สารซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษา การค้นพบพืชซึ่งมีคุณค่าดังกล่าวเป็นกระบวนการที่ยาวและใช้ทั้งเวลาและทุนทรัพย์ นักวิจัยจึงได้พยายามที่จะลดขั้นตอนในการศึกษาวิจัย ซึ่งอาจทำได้ 2 แนวทาง

1. การศึกษาโดยอาศัยการตรวจสอบทางเภสัชวิทยา ซึ่งเป็นกระบวนการศึกษาหาสารเคมีซึ่งออกฤทธิ์ในการรักษา โดยเริ่มต้นคัดเลือกพืชที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคที่ต้องการจากตำรายาพื้นบ้าน นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม นำสารสกัดที่ได้มาตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เมื่อได้ผลตามต้องการ จึงนำไปแยกส่วน นำเฉพาะส่วนที่ให้ผลไปแยกต่อ และตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของส่วนที่แยกได้ ทำเช่นนี้จนกระทั่งแยกได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2. การศึกษาโดยอาศัยการตรวจสอบสารเคมีวิธีนี้อาศัยข้อมูลเบื้องต้นที่ว่ามีสารเคมีกลุ่มใดบ้างที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน เป็นต้น นำพืชต่าง ๆ มาตรวจสอบหาสารเคมีกลุ่มดังกล่าวข้างต้น พืชใดที่มีสารเคมีกลุ่มที่ตรวจสอบมาก ก็จัดเป็นพืชที่ควรนำมาสกัดแยกต่อจนได้สารบริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา วิธีนี้จึงอาจจะไม่ได้สารออกฤทธิ์ ได้เพียงสารที่มีปริมาณมากในพืชเท่านั้น จึงอาจทำให้การวิจัยไม่ได้ผลตามความมุ่งหมาย

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิจัยทั้ง 2 แนวทาง จะเห็นว่าแนวทางแรกจะมีโอกาสพบสารออกฤทธิ์มากกว่าแนวทางที่ 2 ปัจจุบันนิยมใช้แนวทางแรกในการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ในสมุนไพร แต่เนื่องจากการตรวจสอบทางเภสัชวิทยานอกเหนือขอบข่ายของวิชาเภสัชวินิจฉัยจึงจะขอกล่าวถึงเฉพาะการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้น

วิธีการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหาสารเคมีในพืชควรจะต้องเป็นวิธีที่มีลักษณะดังต่อไปนี้คือ

1. เร็วและง่าย
2. ใช้เครื่องมือน้อยที่สุด
3. เป็นวิธีตรวจสอบที่ค่อนข้างเฉพาะสำหรับกลุ่มของสารเคมีที่ต้องการ
4. สามารถบอกปริมาณของสารคร่าวๆได้
5. สามารถบอกได้ว่าเป็นสารตัวใดตัวหนึ่ง

แต่การจะหาวิธีการซึ่งมีคุณสมบัติครบถ้วนค่อนข้างยาก ส่วนมากจะได้เพียงคุณสมบัติข้อ 1-4 อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นนี้ก็ยังมีประโยชน์กล่าวคือช่วยในการวางแผนการสกัดแยกโดยเฉพาะในการแยกส่วนของสารสกัดเบื้องต้น เมื่อทราบว่าในสารสกัดหรือส่วนสกัดที่ตรวจสอบก็ตามมีสารเคมีกลุ่มใด ทำให้สามารถวางแผนการแยกตามคุณสมบัติทางเคมีของสารกลุ่มนั้น เช่น ตรวจพบว่ามีแอลคาลอยด์ การสกัดแยกก็สามารถทำได้โดยวิธีสกัดแอลคาลอยด์โดยทั่วไป แทนการเสียเวลาลองโดยไม่ทราบคุณสมบัติของสารในสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 การเตรียมสารสกัด

เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิดและมีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก การเลือกตัวทำละลายที่จะให้ได้สารทุกกลุ่มที่ต้องการจึงทำได้ยาก นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องการที่สารหลายชนิดอยู่ปนกัน อาจเกิดการจับกันอย่างหลวมๆทำให้การละลายของสารแตกต่างออกไปจากคุณสมบัติในการละลายของสารแต่ละชนิด จะพบบ่อยๆว่าสารที่แยกจากตัวทำละลายชนิดหนึ่ง เช่น น้ำเมื่อแยกเป็นสารบริสุทธิ์แล้วกลับไม่ละลายในน้ำเป็นต้น อย่างไรก็ตามเพื่อไม่ให้ผลการทดลองผิดพลาดจึงมีผู้แนะนำให้สกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายหลายๆชนิด แต่การใช้ตัวทำละลายหลายชนิดอาจทำให้เสียเวลามาก เมื่อครบกำหนดเวลานำสารสกัดมากรองผ่านสำลี หรือกระดาษกรองแล้วแต่ความเหมาะสมในการกรอง สารสกัดบางชนิดซึ่งมีแป้งอยู่มาก จะประสบปัญหาเรื่องการอุดตัน ซึ่งอาจแก้ปัญหาได้โดยเปลี่ยนกระดาษกรองหรือสำลีบ่อยๆ และใช้เครื่องกรองสุญญากาศช่วยการตรวจสอบสารกลุ่มต่างๆทำได้ 2 วิธีคือ

1. ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาสี หรือปฏิกิริยาเคมี
2. ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคTLC

2.3.2 การตรวจสอบโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี

การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดในพืช อาจทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีง่ายๆ ซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่างๆ หรือการเกิดตะกอนในการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการตรวจสอบสารสกัดผู้ตรวจสอบจะต้องนึกเสมอว่า การตรวจสอบเบื้องต้นนี้ไม่สามารถยึดถือผลได้ 100% แม้ว่าจะได้มีการพยายามเลือกใช้วิธีการสกัดและสารเคมีที่ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงแล้วก็ตาม ส่วนในงานวิจัยนี้พบว่ามีสารประกอบคือฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และแอนทราควิโนน (Anthraquinone) ซึ่งมีวิธีการตรวจสอบดังนี้

2.3.2.1 การตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มที่พบมากในพืช ทั้งในรูปของ aglycone และไกลโคไซด์ ซึ่งไกลโคไซด์มักพบมากในดอก ผล และใบ สำหรับการตรวจสอบพวกฟลาโวนอยด์มีหลายวิธีที่ใช้กันมากคือ Cyaniding test ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้แม็กนีเซียมและกรดเกลือตรวจสอบฟลาโวนอยด์ที่มี benzopyrone อยู่ในโมเลกุลได้แก่ ฟลาโวน (flavone) ฟลาวานอล (flavanone) และแซนโทน (xanthone) เป็นต้น สารเหล่านี้จะให้สีต่างๆกันคือ ฟลาโวน จะให้สีส้มไปถึงสีแดง ฟลาวานอลจะให้สีแดงไปถึง crimson และฟลาโนนจะให้สี crimpson ไปจนถึง margenta มีบางครั้งอาจให้สีเขียวหรือน้ำเงิน สีจะเกิดภายใน 1-2 นาทีหลังจากเติมกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 การตรวจสอบเบื้องต้นสำหรับแอนทราควิโนน (Anthraquinone)

แอนทราควิโนน เป็นสารกลุ่มที่ออกฤทธิ์เป็นยาระบาย การตรวจสอบอาศัยหลักเกณฑ์การย่อยไกลโคซ์ออกเป็น aglycone โดยใช้ด่างเนื่องจากไกลโคไซด์ของแอนทราควิโนนหลายชนิดจะคงตัวในกรด เมื่อย่อยด้วยด่างจะได้ aglycone ในรูปของเกลือโปแตสเซียมหรือโซเดียม โดยโลหะจะจับที่ phenolic group ทำให้ละลายน้ำได้ เพื่อให้การตรวจสอบชัดเจนขึ้น เราจึงทำให้เป็นกรดเพื่อเปลี่ยนเกลือเป็น free anthraquinone ซึ่งละลายได้ในเบนซีน เมื่อสกัดด้วยเบนซีนแล้วนำไปหยดด้วยด่างจะได้สีแดง แอนทราควิโนนบางชนิดอยู่ในรูป C-glycoside ซึ่งต้องใช้ปฏิกิริยาที่แรงขึ้นซึ่งทำได้โดยใช้ ferric chloride

2.3.3 การตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC

ได้มีผู้พยายามทดลองหาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารได้มากกลุ่ม แต่ก็พบว่ามีสารปนเปื้อนมากทำให้ผลการทดลองไม่ดี การตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ควรที่จะต้องมีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกบ้าง การตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธีเทคนิค TLC ดีกว่าการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาสีเนื่องจากเป็นการแยกสารและตรวจสอบสารไปพร้อมกัน ทำให้ทราบจำนวนสารโดยประมาณ และยังได้แนวทางในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และเพื่อให้ตรวจได้มากกลุ่มจึงต้องใช้ตัวทำละลายและระบบของตัวทำละลายหลายชนิด

2.3.4 การตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)

DPPH จะเป็นสารละลายสีม่วงเข้มเมื่อละลายในตัวทำละลายเมทานอล เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียรชนิดหนึ่ง ใช้เป็นรีเอเจนต์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสิ่งสกัดและสารที่แยกได้จากพืช ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและง่ายต่อการทดสอบเบื้องต้น ณ ตำแหน่งของสารใดก็ตามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะปรากฏการฟอกสีบนพื้นสีม่วงของ DPPH เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วงของ DPPH หายไป และการมองเห็นสี ณ ตำแหน่งนั้นจะเป็นสีเดิมของสารนั้นๆ ก่อนทำการพ่น DPPH ลงไป

2.4 การแยกส่วนผสม [4]

ในพืชแต่ละชนิดจะมีสารเคมีหลายชนิด ดังนั้นสารสกัดที่ได้เบื้องต้นจึงเป็นส่วนผสมของสารเคมี เพื่อให้ได้สารสำคัญที่บริสุทธิ์ จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการแยกโดยใช้เทคนิคและอุปกรณ์ต่าง ๆ ซึ่งการแยกอาจทำได้โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

49263

1. Chemical means โดยอาศัยคุณสมบัติและปฏิกิริยาทางเคมี

2.Physical means เป็นการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติทางฟิสิกส์ อาจใช้วิธีการต่างๆคือ distillation, steam distillation, sublimation, solvent separation, solvent/solvent precipitation, chromatography, fractional crystallization, dialysis, electrophoresis, และ centrifugation

โดยวิธีที่งานวิจัยนี้นำมาใช้คือ โครมาโตกราฟี (Chromatography)

โครมาโตกราฟีเป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยหลักการกระจายตัวของสารระหว่าง เฟส 2 ชนิด ซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ stationary phase และ mobile phase สารจะเคลื่อนที่ (migrate) ไปบน stationay phase โดยการพาของ mobile phase ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับ interaction ระหว่างสาร (solute) กับ stationary phase และระหว่างสาร กับ mobile phase สารใดที่มีการ interact กับ stationary phase ได้ดี สารนั้นก็จะเคลื่อนที่ไปได้ช้า interaction ที่เกิดอาจจะเกิดโดยกระบวนการต่อไปนี้

1. การดูดซับที่ผิว particles ของ stationary phase (adsorption)

2. การดูดซึมเข้าไปในช่องว่าง (pores) ของ stationary phase (absorption)

3. การกระจายตัว (partition) เข้าไปในของเหลวที่เคลือบอยู่ที่ผิว particle ของ stationary phase หรืออยู่ในช่องว่างของ particles ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการละลายของสาร

4. การสร้าง heteropolar bonds กับ ion ของ stationary phase

5. การระเหย (volatility)

โดยทั่วไปแล้วการแยกไม่ได้ผ่านกระบวนการข้างต้นอย่างใดอย่างหนึ่ง แต่อาจผ่านกระบวนการดังกล่าวร่วมกัน เช่นมีทั้ง adsorption และ absorption เป็นต้น

2.4.1 Stationary phase

มี 2 ชนิด คือ เป็นของแข็งหรือของเหลว ถ้า stationary phase ที่เป็นของแข็งเราอาจเรียกว่า adsorbentหรือsorbent ซึ่งจะทำหน้าที่ดูดซับสารไว้ชั่วคราว สำหรับ stationary phase ที่เป็นของเหลว บางครั้งอาจเคลือบอยู่บนเม็ดของแข็งซึ่ง inert adsorbent ที่ใช้กันมากได้แก่

1. Silica Gel or Kieselgele

2. Alumina

3. Cellulose และอนุพันธ์

4. Charcoal และ Carbons

5. Clays และ related substance

6.Polyamide

7.Adsorbent ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อใช้ใน ion exchange chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การเลือก adsorbent

ในการเลือก adsorbent เราต้องคำนึงถึงคุณสมบัติต่อไปนี้

1. คุณสมบัติในการละลายของสาร ว่าสารที่จะแยกเป็นสารที่มีขั้วหรือไม่มีขั้ว

2. ความเป็นกรด ด่าง หรือเป็นกลางของสารที่จะแยก

3. ปฏิกิริยาทางเคมีระหว่าง adsorbent กับสารหรือสารกับตัวทำละลาย

โดยทั่วไปพวก hydrophilic ใช้ adsorbent ต่อไปนี้คือ cellulose, kieseguhr, polyamide ถ้าเป็นพวก hydrophobic จะใช้ alumina, silica gel, acetylated polyamide layer

Mobile phase

อาจจะเป็นก๊าซหรือของเหลวก็ได้ ถ้าเป็นของเหลวอาจเรียกว่า solvent, wash liquid, developer หรือ eluent ก็ได้ mobile phase ที่ใช้ในโครมาโตกราฟีควรจะเป็นตัวทำละลายที่ค่อนข้างบริสุทธิ์เช่น chromatography grade ถ้าใช้ analytical grade อาจจะต้องนำไปกลั่นในเครื่องกลั่นที่ทำด้วยแก้วครั้งหนึ่งก่อน หรือผ่าน alumina column โดยเฉพาะในกรณีของโครมาโตกราฟีบางอย่างเช่น high pressure liquid chromatography

2.4.3 ตัวทำละลายที่ใช้ในโครมาโตกราฟี

แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. Isocratic เป็นตัวทำละลายเดี่ยว หรือเป็นส่วนผสมของตัวทำละลาย

2. Gradient เป็นการใช้ ตัาทำละลาย ซึ่งส่วนผสมของตัวทำละลาย เปลี่ยนตลอดเวลาที่ทดลอง

ใน normal phase chromatography การ development หรือ elution นั้น เราจะค่อยๆเพิ่ม polarity ของตัวทำละลายขึ้นไปเรื่อยๆ ตัวทำละลายจะมีความมีขั้วจากน้อยไปมากดังนี้ petroleum ether, cyclohexane, carbon tetrachrolide, trichloroethylene, toluene, benzene, dichloromethane, chloroform, diethyl ether, ethyl acetate, acetone, *n*-propanol, ethanol, methanol และน้ำ

2.4.4 Thin-layer Chromatography (TLC)

เป็นการแยกสารโดยใช้ Stationary phase ซึ่งแผ่เป็นแผ่นเคลือบบน support ซึ่งอาจเป็นแก้ว aluminium หรือ polyethylene เมื่อหยดสารผสมลงบน stationary phase แล้ว จึงนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ใน tank ซึ่งบรรจุ mobile phase ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านไปบน stationary phase ซึ่งเรียกว่า Development ขณะที่เกิด development สารก็จะแยกออกจากกัน กลวิธีในการแยกจะมีทั้ง adsorption และ partition แต่จะมีกลวิธีใดมากกว่า ขึ้นกับว่าแผ่น TLC โดยอบที่ 110°C เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง จะทำให้น้ำระเหยออกไปจาก particle ของ adsorbent กลวิธี จึงเป็น adsorption มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่า partition แต่ถ้าไม่ได้นำ plate ไป activate น้ำที่จับอยู่ที่ particle จะทำหน้าที่เป็น liquid stationary phase จะมี partition mechanism เกิดมากกว่าเดิม น้ำที่เคลือบอยู่นี้มาจากความชื้นในอากาศนั่นเอง

2.5 ชุมเห็ดเทศ [6]

รูปที่ 2.12 ชุมเห็ดเทศ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cassia alata* Linn.
ชื่อวงศ์ : Leguminosae
ชื่ออังกฤษ : Acapulo, Candelabra bush, Candle bush, Ringworm bush
ชื่อท้องถิ่น : ขี้คาก, ชุมเห็ดใหญ่, หมากกะลิงเทศ, ลับมืนหลวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 ลักษณะ

ชุมเห็ดเทศเป็นไม้พุ่มค่อนข้างสูง สูง 1-5 เมตร แตกแขนงมาก ใบเป็นใบประกอบ ก้านใบแข็ง ตั้งฉากกับกิ่ง ใบเรียงตัวเป็นคู่อยู่ในระนาบเดียวกัน ใบรูปไข่ขอบขนาน ปลายใบมน หรือมีรอยเว้าตอนปลาย ใบกว้าง 3-7 ซม.ยาว 5-15 ซม. ดอกเป็นช่อสีเหลืองฝักมีปีก 4 ปีก คล้ายถั่วพู ฝักอ่อนมีสีเขียว ฝักแก่มีสีดำ เมล็ดในรูปสามเหลี่ยม

2.5.2 สารประกอบที่สำคัญ

แอนทราควิโนน กลัยโคซายด์ หลายชนิดได้แก่ emodin, aloe-emodin และ rhein

emodin rhein

รูปที่ 2.13 สูตร โครงสร้างของ emodin และ rhein

2.5.3 ลักษณะทางภูมิศาสตร์

ชุมเห็ดเทศปลูกง่ายในดินเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะดินร่วนซุย เป็นพืชที่ชุ่มชื้นมาก ไม่ชอบที่ร่ม

2.5.4 พฤษเคมี

ใบ ประกอบด้วย aloe-emodin anthraquinones, chrysophanol, deoxycoeluatin 4,5-dihydroxyl-1-hydroxymethylanthron, 4,5-dihydroxy-2-hydroxymethylanthrone, emodin, rhein, isochrysophanol, kaempferol, physionmonoglucoside, sitosterol, 1,3,8-trihydroxy-2-methylanthraquinone, sennoside, flavonoids, terpenoids

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5 เภสัชวิทยา

2.5.5.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungalactivity)

- สารสกัดด้วยน้ำจากใบชุมเห็ดเทศ สามารถฆ่าเชื้อรา Trichophyton mentagrophytes ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกลาก และสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% (25.0 mg/ml) จากทุกส่วนของชุมเห็ดเทศก็มีฤทธิ์เช่นเดียวกันและยังสามารถต้านเชื้อรา Microsporum canis, Candida albicans และ Aspergillus niger

- นอกจากนี้สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม อีเทอร์ แอลกอฮอล์ และน้ำจากใบชุมเห็ดเทศยังสามารถฆ่าเชื้อราอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคกลากได้เช่นกัน ได้แก่ T. rubrum, T.mentagrophytes, Epidermophyton floccosum และ M. gypseum แต่ไม่สามารถฆ่า C. albicans, A. fumigatus และ Penicillium puberulum (Imwidthaya) โดยเฉพาะสารสกัดในชั้นแอลกอฮอล์ สามารถฆ่าเชื้อ T. rubrum และE.floccosumได้ดี

2.5.5.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterialactivity)

- สารสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ จากใบชุมเห็ดเทศ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ได้แก่ Bacillus subtilis, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus, Escherichia coli และ Klebsiella pneumoniae

- สารสกัดด้วย 50% แอลกอฮอล์ จากทุกส่วนของชุมเห็ดเทศ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ B.subtilis, S. aureus, Salmonella typhosa และ E. coli รวมทั้ง Agrobacterium tumefaciens

- สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากใบชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ B. subtilis แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ S. anreus, E. coli, Sh. Dysenteriae และ S. typhi ในขณะที่สารสกัดด้วยน้ำไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้

- สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ไม่สามารถฆ่าเชื้อ K. pneumoniae และ Ps. aeruginosa ได้ (Imwidthaya)

2.5.5.3 ฤทธิ์เป็นยาระบาย(laxative)

- เมื่อให้หนูกินสารสกัดน้ำร้อนจากใบชุมเห็ดเทศ ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว หรือให้โดยการฉีดสารสกัดด้วยน้ำร้อนดังกล่าวขนาด 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว พบว่ามีฤทธิ์ระบายได้ดี

- ใบชุมเห็ดเทศมีสารสำคัญคือ anthraquinone glycoside มีฤทธิ์กระตุ้นให้ลำไส้ใหญ่เกิดการบีบตัวเพื่อขับถ่าย ได้แก่ physion-l-glycoside, chrysophanol, emodin, rhein, aloe-emodin เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Literature survey)

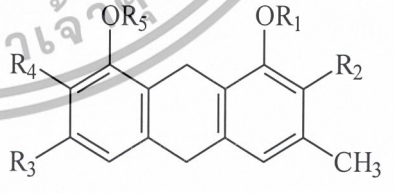
ในปี 1977 P. Vashney & Raj Pal ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเกี่ยวกับดอกไม้ในตระกูล Leguminoseae ได้แก่ *Cassia siamea* **Lamk.**, *Peltophorum ferrugineum* **Benth** และ *Caesalpinia pulcherrima* **SW.** โดยพบว่าดอกไม้ทั้ง 3 จะมีองค์ประกอบที่เหมือนกันได้แก่ β-sitosterol, lupeol และ ซูโคลส (sucrose) แต่จะมี ฟลาโวนอยด์ (flavonoid), โมโน (mono-), ได (di-), และโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ที่แตกต่างกัน [7]

ในปี 1977 Manjusree Pal, D. K. Roy และ P. R. Pal จากการค้นพบแอนทราควิโนน (antraquinone) ในเมล็ดของชุมเห็ดไทย (*cassia tora* **Linn**.) และพบเซนโนไซด์ (sennoside) จากใบ จึงได้ทำการสกัดสารอีโมดิน (emodin) จากใบที่แห้งของชุมเห็ดไทย [8]

ในปี 1996 Jae Sue Choi, Hee Jung Lee, Kun-Young Park, Jung-Ok Ha, และ Sam Sik Kang ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของชุมเห็ดไทย (*Cassia tora)* ได้แก่ แอนทราควิโนน อะไกลโคน (antraquinone Aglycones) และ แนฟโทไพโรน ไกลโคไซด์ (Naphthopyrone Glycosides) เกี่ยวกับผลในการต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) ซึ่งเกิดจากแอลฟาทอกซินแบคทีเรีย (aflatoxin bacteria)

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวสารต้านการกลายพันธุ์ชนิดแอนทราควิโนน 3 ชนิด โดยจากผลการวิจัยพบว่า แอนทราควิโนนที่มีหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy group) 3 หมู่ และมีหมู่เมททอกซี (methoxy group) 1 หมู่ จะให้ผลที่มีประสิทธิภาพที่สุด ซึ่งแสดงสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.12 จากผลการวิจัยนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า ตำแหน่งของ เมททอกซีและไฮดรอกซี จะมีผลต่อการต้านการกลายพันธุ์ [9]

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1	H	H	H	H	H
2	CH_3	OH	OCH_3	OCH_3	CH_3
3	CH_3	OH	OH	OCH_3	H

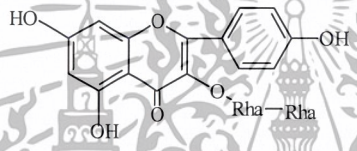


รูปที่ 2.14 สูตรโครงสร้างของแอนทราควิโนนที่มีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซีและเมททอกซีที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี 1998 P.R. Sakharkar และ A.T. Pati ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสมบัติจากการสกัดใบของชุมเห็ดเทศ *(Cassia alata)* ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และแบคทีเรีย ได้แก่ *S.aureus, S. aureus coagulase positive, B. subtilis, B. subtilis, B. cereus, B. stearothermophillus, E. coli, V. cholerae, S. typhi, S. dysenteriae* และ *K. pheumoniae* โดยจะพบว่าสารสกัดที่ได้จากการใช้อะซีโตนและเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายในการสกัด จะได้ผลที่ใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน [10]

ในปี 1998 K. V. Rao, A. G. Damu, B. Jayaprakasam, และ D. Gunasekar ได้ทำการค้นพบฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ตัวใหม่จากดอกไม้ของต้น *Cassia hirsuta* สารที่พบได้แก่ kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→2)- α-L-rhamnopyranoside และรูทิน (rutin) [11]



รูปที่ 2.15 สูตร โครงสร้างของ kaempferol

ในปี 2000 ภาคภูมิ พาณิชยูปการนันท์ และ ทรงศรี แก้วสุวรรณ ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านออกซิเดชันจากชุมเห็ดเทศ โดยทำการสกัดสารจากใบ, ฝัก และดอก โดยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยจะพบว่าสารสกัดจากส่วนของใบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าสารสกัดจากส่วนดอกและฝัก โดยพบว่าสารที่ได้คือ kaempferol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า BHT ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ [2]

ในปี 2001 Hiroyoshi Moriyama, Toru Iizuka, และ Masahiro Nagai ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของใบชุมเห็ดเทศ *(Cassia alata)* เมื่อทำการให้ความร้อน โดยเทียบกับตัวอ้างอิง โดยจะพบว่าจากการศึกษาพบว่าจะมีปริมาณของ kaempferol 3-gentiobioside ที่เพิ่มมากขึ้น [12]

ในปี 2001 จาก Mahidol University Annual Research Abstracts Vol.28 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบแอนทราควิโนน (antraquinone) ที่พบได้ในใบของต้นชุมเห็ดเทศ *(Cassia alata)* ซึ่งมีประโยชน์ในการนำมาทำเป็นยาระบาย และรักษาโรคทางผิวหนัง [13]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. คอลัมน์
2. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)
3. TLC tank
4. TLC plate (silica gel on aluminium)
5. แผ่นให้ความร้อน (hot plate)
6. ชุดปั๊ม
7. aspirator
8. ขวดรูปชมพู่
9. ขวดก้นกลม
10. หลอดทดลอง
11. กระบอกตวง
12. บีกเกอร์
13. แท่งแก้วคนสาร
14. ช้อนตักสาร
15. กระดาษกรอง
16. กรวยกรอง
17. Aluminium Floid
18. Stand and Clamp
19. Vial
20. forcep

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เฮกเซน (Hexane) เกรดการค้า
2. เมทานอล (Methanol) เกรดการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เกรดการค้า
4. เอทิล อะซิเตต (Ethyl Acetate) เกรดการค้า
5. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เกรดการค้า
6. แอบโซลูท เอทานอล (Absolute Ethanol)
7. 2-บิวทานอล (2-butanol) เกรดการค้า
8. อะซิโตน (Acetone) เกรดการค้า
9. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium Sulfate)
10. ซิลิกาเจล เบอร์ 7729 ของ MERCK (Silica Gel 7729)
11. ซิลิกาเจล เบอร์ 7734 ของ MERCK (Silica Gel 7734)
12. 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
13. แอนนิซอลดีไฮด์ (Anisaldehyde)
14. Butylated hydroxytoluene (BHT)

3.3 ขั้นตอนการวิจัย

1. ซื้อตัวอย่างของพืชที่สนใจที่ร้านเจ้ากรมเป๋อ ในที่นี้คือ เปลือกชุมเห็ดเทศนำมาตากให้แห้ง จากนั้นแกะเอาเฉพาะเปลือกแล้วนำไปบดให้ละเอียด

2. นำเปลือกชุมเห็ดเทศที่ได้ในข้อ 1 มาสกัดโดยวิธีการแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยเริ่มแช่เฮกเซนก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์จากนั้นนำมากรองแยกส่วนที่เป็นกากและชั้นตัวทำละลาย แล้วจึงนำกากไปแช่ในตัวทำละลายตัวต่อไปที่มีขั้วสูงกว่า คือ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ตามลำดับ

3. นำชั้นตัวทำละลายที่ได้จากการสกัดแต่ละชั้นตัวทำละลาย มาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ จะเรียกส่วนนี้ว่า สารสกัดหยาบ (crude extract)

4. แบ่งสารสกัดหยาบ มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

5. ทำการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการแยกสารที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ ด้วยเทคนิค TLC

6. ทำการแยกสารโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

7. วิเคราะห์ตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระในแต่ละส่วนย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

1. <u>การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) ในแต่ละชั้นตัวทำละลาย</u>

1.1 นำเปลือกของต้นชุมเห็ดเทศที่แห้งมาบดให้ละเอียดหนัก 2.30 กิโลกรัม แช่ในชั้นในตัวทำละลาย เฮกเซนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ คนสม่ำเสมอทุกวัน

1.2 ค่อย ๆ รินกรองเอาสารสกัดออก บีบสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด

1.3 ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ

1.4 ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบ ชั้นเฮกเซน

1.5 นำกากที่ได้จากการกรองในข้อ 1.2 มาผึ่งให้แห้งจากนั้นนำมาแช่ในตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม และทำเหมือนในข้อ 1.1-1.4 จากนั้นนำกากที่ได้มาแช่ต่อในตัวทำละลาย เมทานอล และปฏิบัติเหมือนเดิม จะได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 3 ชั้นตัวทำละลาย

2. <u>การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในชั้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโตกราฟี</u>

2.1 ตัดแผ่น TLC ขนาด 2x5 เซนติเมตร ทำการจุดสารสกัดหยาบ ที่ละลายด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทน

2.2 เตรียม TLC tank โดยมีกระดาษกรองวางด้านใน tank และเตรียมกระจกไว้ปิด

2.3 ทดสอบอัตราส่วนของสารละลายที่ค่าต่างๆ โดยเริ่มจากสารละลายในอัตราส่วน 5 : 95 แล้วจึงค่อยๆลดหรือเพิ่มสารละลายชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับการแยกสารในสารสกัดหยาบบนแผ่น TLC

2.4 จุ่มแผ่น TLC ที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 ลงใน tank ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปถึงระดับที่กำหนดไว้

2.5 ถ้าสารบนแผ่น TLC สามารถแยกเห็นเป็นจุดอย่างชัดเจนแสดงว่าอัตราส่วนที่ผสมใน TLC tank เป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม แต่ถ้ายังไม่พบต้องทำการเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของสารละลายเพื่อให้ได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

2.6 นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและ 366 นาโนเมตร

2.7 นำแผ่น TLC ที่ได้ไปย้อมด้วย developing solvent โดยวางแผ่น TLC ไว้บนกระจก นำสำลีชุบ developing solvent ป้ายให้ทั่วแผ่น จากนั้นนำไปอุ่นบนแผ่นให้ความร้อน จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของจุดที่เกิดขึ้น

2.8 ใช้ระบบตัวทำละลายที่หาได้ไปใช้ในการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. <u>การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC Screening for Radical Scavengers</u>

เป็นการตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้นเพื่อดูว่า สารหรือองค์ประกอบใดจากสารสกัดอาจมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีวิธีทำง่ายๆโดย

3.1 หาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารแต่ละชนิดจากสารสกัดของพืชด้วยเทคนิค TLC

3.2 เมื่อได้ระบบที่เหมาะสมให้ทำการจุดสาร (หรือสารสกัดที่ต้องการทดสอบ) และ develop แผ่น TLC ด้วยระบบตัวทำละลายนั้นๆ ทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดที่ปรากฏไว้ด้วยดินสอ

3.3 เตรียมสารละลายของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในเมทานอลให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.2 mM โดยมีการเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งก่อนการทดสอบ

3.4 พ่นสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วงเข้ม ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมได้ในตอนแรกให้ทั่วถึง พยายามพ่นให้เป็นละอองเล็กๆ และระวังอย่าให้แผ่น TLC เปียกโชกเกินไป

3.5 ณ ตำแหน่งของสารใดก็ตามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะปรากฏการฟอกจางสีบนพื้นสีม่วง เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วงของ DPPH หายไป จึงปรากฏการฟอกจางสีของสารบนพื้น silica gel บนแผ่น TLC และควรมองเห็นสี ณ ตำแหน่งนั้นเป็นสีเติมของสารนั้น ๆ (ถ้ามี) ก่อนพ่น DPPH ลงไป

รูปที่ 3.1 ลักษณะของแผ่น TLC ก่อนและหลังพ่นด้วย DPPH

วิธีทดสอบเชิงคุณภาพวิเคราะห์นี้จะช่วยให้ผู้ตรวจสอบประหยัดเวลามากขึ้น เมื่อทราบแล้วว่าองค์ประกอบใดอาจมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผู้ทดลองก็ต้องทำการแยกองค์ประกอบนั้น ๆ ออกจากสารสกัดให้ได้เป็นสารบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Radical scavenging assay [1]

4.1 เตรียมสารละลายของสารที่แยกได้จากสารสกัดซึ่งเป็นสารที่ให้ผลการทดสอบเบื้องต้นแล้วว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้ได้ประมาณ 5-6 ความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-1000 ppm และให้สารละลายแต่ละความเข้มข้นมี ปริมาตรสุดท้ายอย่างน้อย 2.0 ml.

4.2 เตรียมสารละลาย methanolic DPPH radical ให้มีความเข้มข้น 0.2 mM

4.3 เติมสารละลาย methanolic DPPH radical 1 ml. ลงไปในสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 2.1 (ใช้สารละลายแต่ละความเข้มข้นเป็นปริมาตร 0.5 ml.)

4.4 ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที

4.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 516-518 nm ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer

4.6 สำหรับสารแต่ละความเข้มข้นให้ทำการทดลองข้อ 2.3-2.5 ซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

4.7 วัดค่า การดูดกลืนแสง ของสารละลาย DPPH ในตัวทำละลายที่ใช้ที่ 516-518 nm

4.8 คำนวณ % radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} \quad [= 1 - A_{sample}/A_{control}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารละลายที่ผสมกับ DPPH แล้ว

$A_{control}$ = ค่า absorbance ที่วัดได้ของ DPPH และตัวทำละลายที่ใช้

5. การแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

5.1 นำซิลิกาเจล เบอร์ 7729 มาผสมด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำที่สุดของระบบ

5.2 ใส่สำลีให้อยู่ที่ตำแหน่งทางออกของคอลัมน์เพื่อป้องกันการรั่วไหลของซิลิกา

5.3 เทซิลิกาที่ผสมด้วยตัวทำละลายในข้อ 4.1 ลงในคอลัมน์ แล้วเคาะด้วยจุกยางหรืออาจต่อปั๊มเพื่อให้อากาศดันตัวทำละลายให้ไหลได้ดีขึ้น ทำการปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออกมาเรื่อย ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลจัดเรียงตัวได้แน่นมากที่สุด

5.4 เมื่อคอลัมน์แน่นแล้ว จึงเติมแมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium Sulfate) เพื่อคลุมผิวหน้าของซิลิกาเจลไว้

5.5 นำสารสกัดหยาบที่ได้มาเติมซิลิกาเจล เบอร์ 7734 คนจนสารสกัดหยาบร่วนและแห้ง

5.6 เติมสารสกัดหยาบที่ผสมด้วยซิลิกาเจลในข้อ 4.5 ลงในคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.7 เติมตัวทำละลายเพื่อชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้ทำการหาไว้

5.8 เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมา เพื่อนำไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการสกัดตัวอย่างพืชด้วยวิธีแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

จากการทดลองได้นำเอาเปลือกชุมเห็ดเทศปริมาณ 2.30 กิโลกรัม บดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า จากนั้นนำไปแช่ด้วยตัวทำละลายในชั้นเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอลตามลำดับ แล้วทำการกรองสารสกัดและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ พบว่ามีน้ำหนักของสารสกัดหยาบ (Crude Extract) ดังตารางที่ 4.1

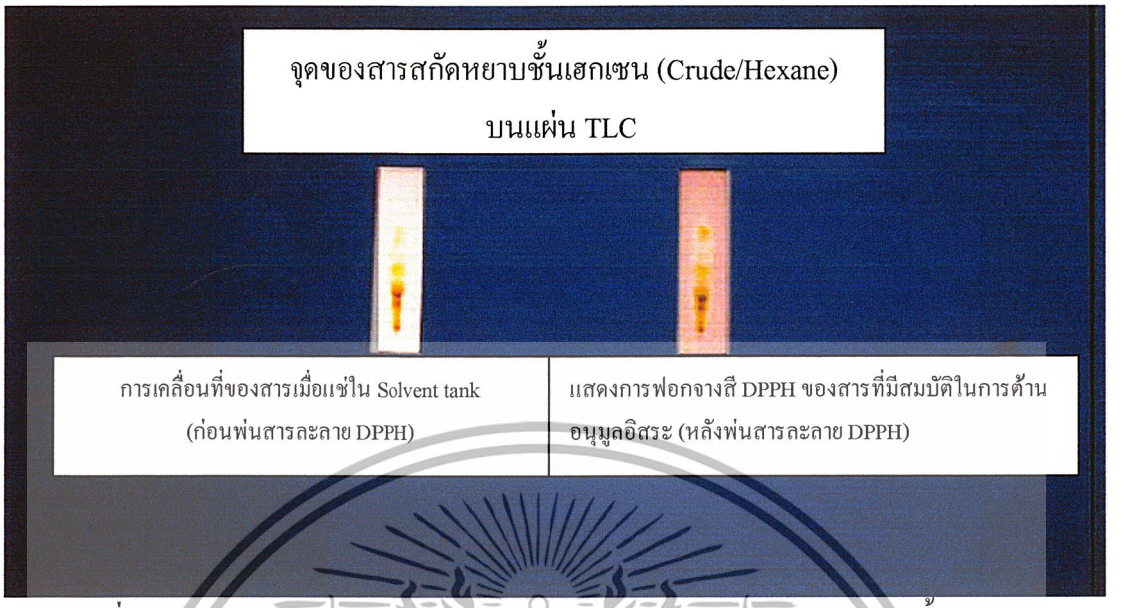
ตาราง 4.1 แสดงค่าน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)
เฮกเซน	20.00
คลอโรฟอร์ม	21.47
เมทานอล	57.67

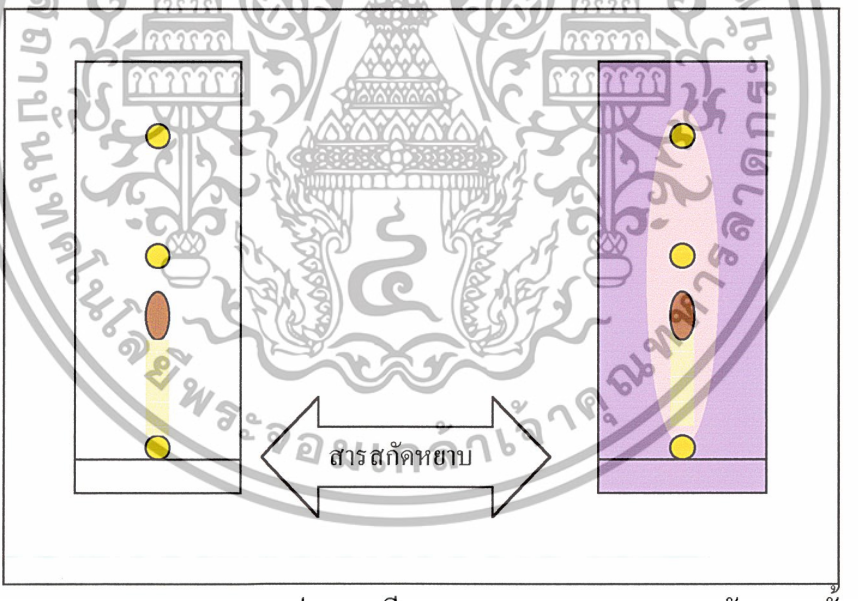
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด โดยวิธี การฟอกจางสีสารละลาย DPPH และวิธี DPPH radical scavenging assay

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดจากทั้ง 3 ชั้นตัวทำละลายมาทดสอบการฟอกจางสีสารละลาย DPPH พบว่าจะได้ผลดังรูปที่ 4.1.ก.และ 4.1.ข. จะพบว่าจุดของสารที่เคลื่อนที่ จะสามารถฟอกจางสีของสารละลาย DPPH ได้ ซึ่งแสดงว่ามีสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



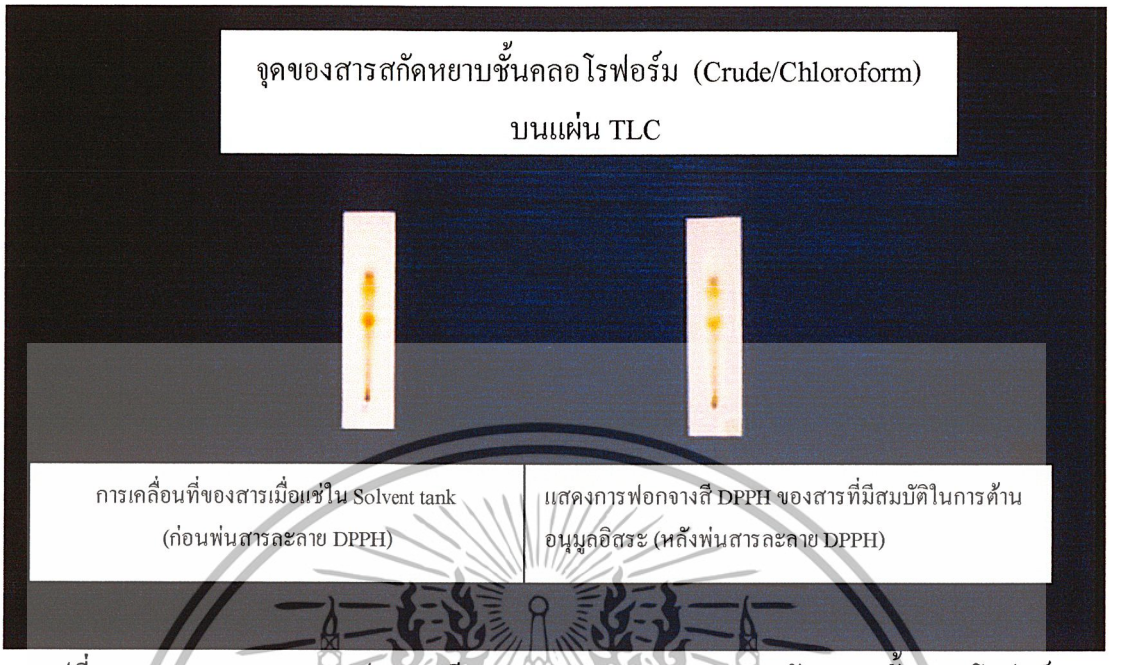
รูปที่ 4.1.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน



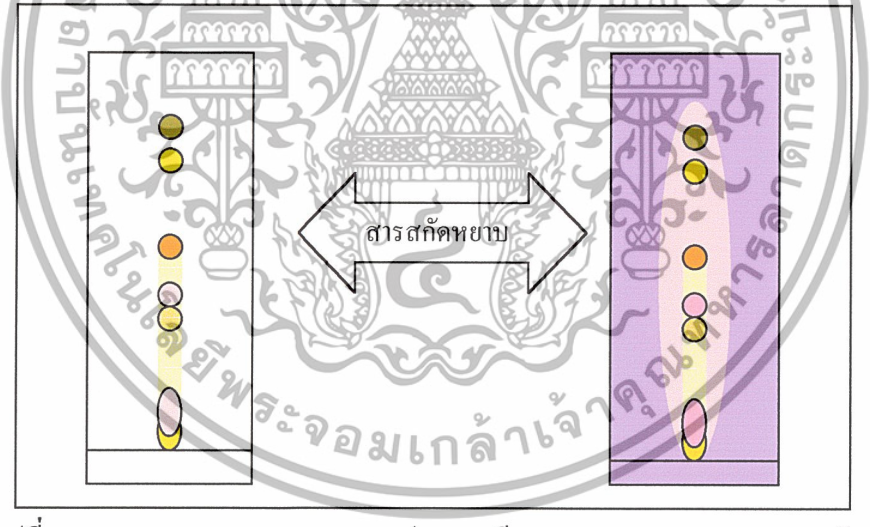
รูปที่ 4.1.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

จากรูปที่ 4.1.ก. และ 4.1.ข. การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 4 จุด จากจุดของสารสกัดหยาบซึ่งมีสีเหลือง ต่อมาก็คือสีส้ม สีแดงอมส้ม สีเหลือง และสีเหลืองตามลำดับ และเมื่อพ่นสารละลาย DPPH จะพบว่าจุดของสารทั้ง 4 จุด สามารถฟอกจางสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้ทั้งหมด โดยจะสังเกตเห็นเป็นสีเดิม แสดงว่ามีสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



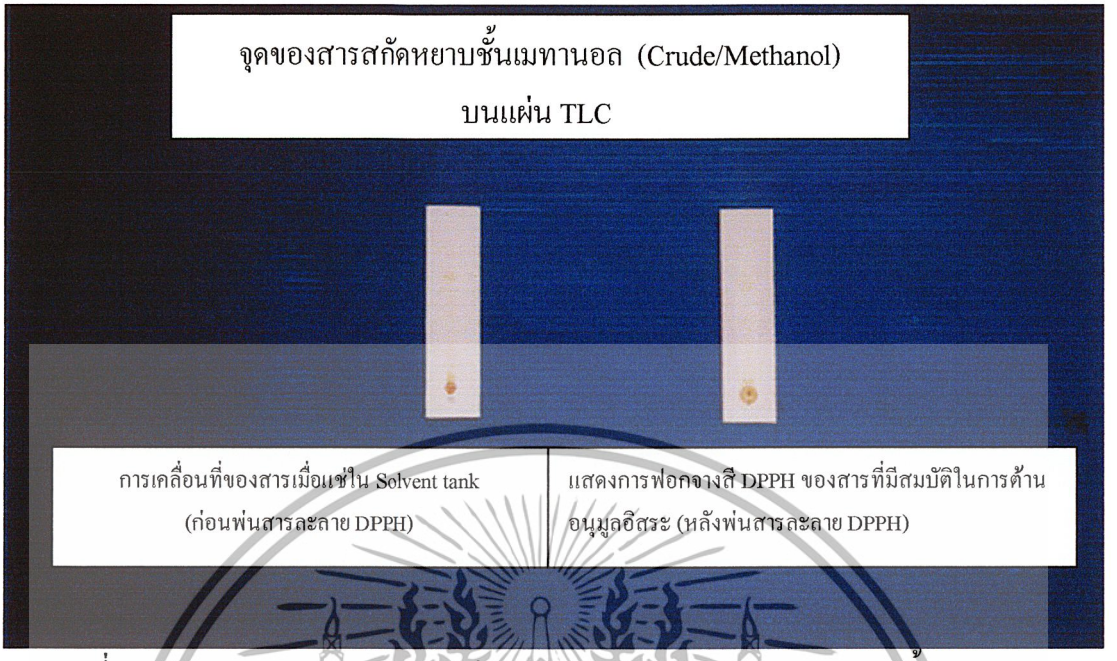
รูปที่ 4.2.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม



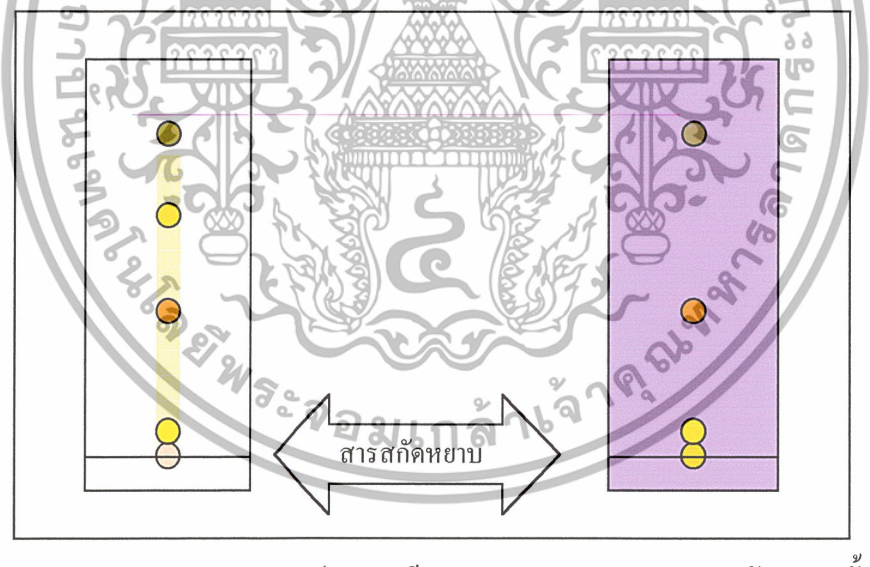
รูปที่ 4.2.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม

จากรูปที่ 4.2.ก และ 4.2.ข. การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 7 จุด จากจุดของสารสกัดหยาบซึ่งมีสีเหลือง ต่อมาก็คือสีชมพู สีเหลือง สีชมพู สีส้ม สีเหลือง และสีเขียว ตามลำดับ และเมื่อพ่นสารละลาย DPPH จะพบว่าจุดของสารทั้ง 7 จุด สามารถฟอกจางสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้ทั้งหมด โดยจะสังเกตเห็นเป็นสีเดิม แสดงว่ามีสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล



รูปที่ 4.3.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

จากรูปที่ 4.3.ก.และ4.3.ข.การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 4 จุด จากจุดของสารสกัดหยาบซึ่งมีสีเหลือง ต่อมาก็คือสีเหลือง สีส้ม สีเหลือง และสีเขียวตามลำดับ และเมื่อพ่นสารละลาย DPPH จะพบว่าจุดของสารสีเหลือง (จุดที่3) ไม่ฟอกจางสีสารละลาย DPPH ทำให้มองเห็นเป็นสีม่วงของสารละลาย DPPH ซึ่งเป็นลักษณะของสารที่ไม่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากทั้ง 3 ชั้นตัวทำละลาย มาทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ประสิทธิภาพของสารในการต้านอนุมูลอิสระ ED_{50} แสดงผลดังตารางที่ 4.2

ตาราง 4.2 แสดงค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	Antioxidant activity, ED_{50} (g/ml)
เฮกเซน	45.78
คลอโรฟอร์ม	113.07
เมทานอล	99.91

4.3 ผลการแยกสารสกัดหยาบจากชั้นคลอโรฟอร์มโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด

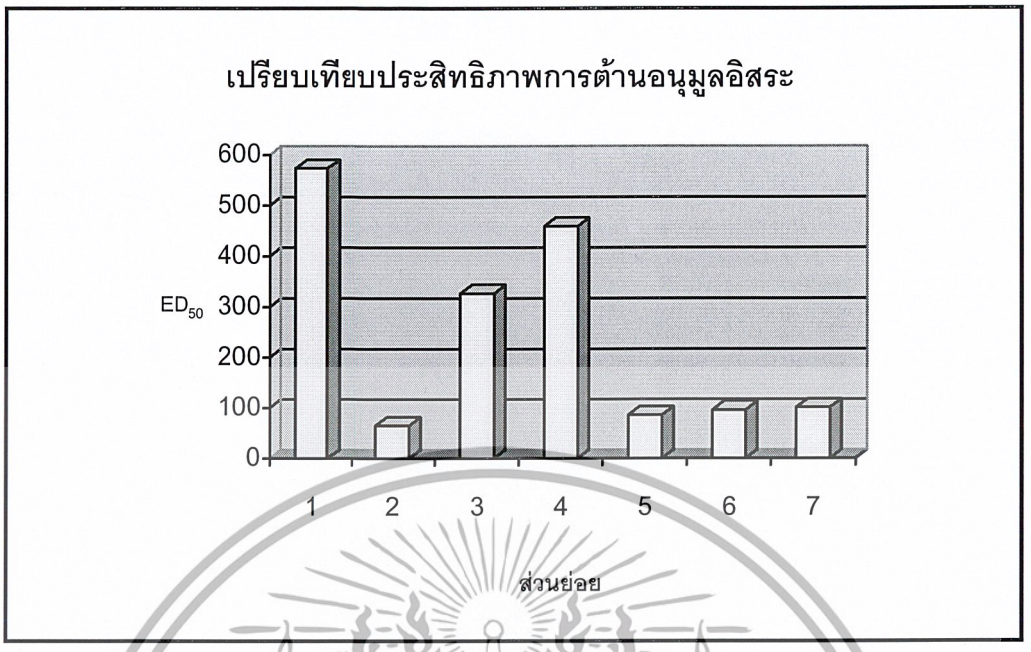
4.3.1 ผลการแยกสารสกัดจากสารสกัดหยาบชั้นคลอโรฟอร์ม (Crude Extract)

เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบการแยกด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน- เอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 60:40 สามารถแยกสารสกัดได้ทั้งหมด 7 ส่วนย่อย จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 7 ส่วนย่อย ไปทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ดังตารางที่ 4.3.1

ตาราง 4.3.1ผลการแยกสารสกัดหยาบจากชั้นคลอโรฟอร์มและค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนย่อย	น้ำหนัก(กรัม)	สีและลักษณะ	Antioxidant activity, ED_{50}(g/ml)
1	0.0742	เป็นผลึกสีเหลืองส้ม	572.97
2	3.0068	เป็นผลึกสีส้ม	64.96
3	1.0159	เป็นผลึกสีส้ม	327.02
4	4.5385	เป็นของเหลวหนืดสีเขียวปนน้ำตาล	459.44
5	5.0365	เป็นของเหลวหนืดสีเขียวปนดำ	86.14
6	2.0414	เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	96.37
7	1.3788	เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	101.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟ 4.3.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 7 ส่วนย่อย

จากผลการทดลองพบว่า ส่วนย่อย 2 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด แต่ผลจากการทดสอบการแยกสารด้วยเทคนิค TLC ให้ผลว่าสารที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์ดังนั้นจึงต้องนำสารสกัด ส่วนย่อย 2 มาทำการแยกต่อไป

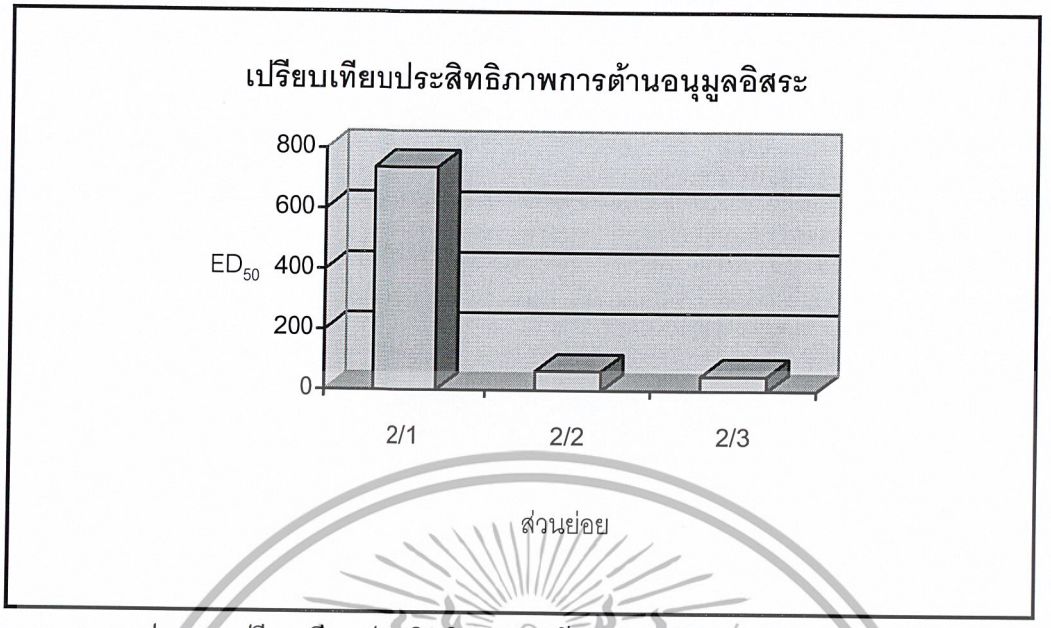
4.3.2 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2

เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบการแยกด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน- เอทิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 95 : 5 สามารถแยกสารสกัดได้ทั้งหมด 3 ส่วนย่อย จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 3 ส่วนย่อย ไปทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ดังตารางที่ 4.3.2

ตาราง 4.3.2 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2 และค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนย่อย	น้ำหนัก(กรัม)	สีและลักษณะ	Antioxidant activity ED_{50}(g/ml)
2/1*	1.4245	เป็นผลึกสีขาว	737.92
2/2**	1.3744	เป็นผลึกสีส้ม	63.87
2/3***	0.5402	เป็นผลึกสีส้ม	48.89
BHT	-	ของแข็งสีขาว	14.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟ 4.3.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 3 ส่วนย่อย

จากผลการทดลองพบว่า ส่วนย่อย 2/2 และ ส่วนย่อย 2/3 มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกันและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่า ส่วนย่อย 2/1 แต่พบว่าผลจากการทดสอบการแยกสารด้วยเทคนิคTLC ให้ผลว่าสารทั้ง 2 ส่วนย่อย ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์ดังนั้นจึงต้องนำสารสกัด ส่วนย่อย 2/2 และ ส่วนย่อย 2/3 มาทำการแยกต่อไป

* ส่วนย่อย 2/1 หมายถึง ส่วนย่อย 1 ที่ได้จากการแยกสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.2

** ส่วนย่อย 2/2 หมายถึง ส่วนย่อย 2 ที่ได้จากการแยกสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.2

*** ส่วนย่อย 2/3 หมายถึง ส่วนย่อย 3 ที่ได้จากการแยกสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/2

เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบการแยกด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน- ไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 30:70 สามารถแยกสารสกัดได้ทั้งหมด 3 ส่วนย่อย และพบว่าสารสกัดในส่วนย่อย 2/2/1 มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปตรวจสอบโครงสร้างได้ และนำมาทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยการนำมาฟอกจางสีสารละลาย DPPH จากรูปที่ 4.4.ก. และ รูปที่4.4.ข. จะพบว่าสารที่แยกได้สามารถฟอกจางสีสารละลาย DPPH ได้ซึ่งแสดงว่ามีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

ตาราง 4.3.3 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/2

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (กรัม)	สีและลักษณะ
2/2/1*	0.0508	ผลึกสีส้ม
2/2/2**	0.0689	ผลึกสีส้ม
2/2/3***	0.2843	ผลึกสีส้ม

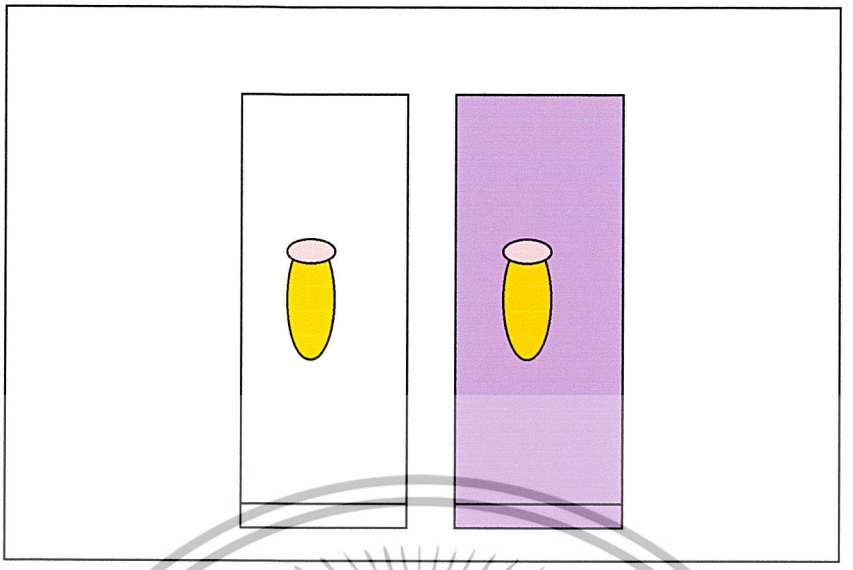
* ส่วนย่อย 2/2/1 หมายถึง ส่วนย่อย 1 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.3

** ส่วนย่อย 2/2/2 หมายถึง ส่วนย่อย 2 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.3

*** ส่วนย่อย 2/2/3 หมายถึง ส่วนย่อย 3 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 2 ในตารางที่ 4.3.3

รูปที่ 4.4.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/2/1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/2/1

จากรูปที่ 4.4.ก. และ 4.4.ข. การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 2 จุด จากเส้นที่ทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC มีจุดของสารสีเหลืองและสีชมพูตามลำดับ จะพบว่าสารสีเหลืองสามารถฟอกจางสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้ชัดเจนกว่าสีชมพู ซึ่งแสดงว่าสารสีเหลืองมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

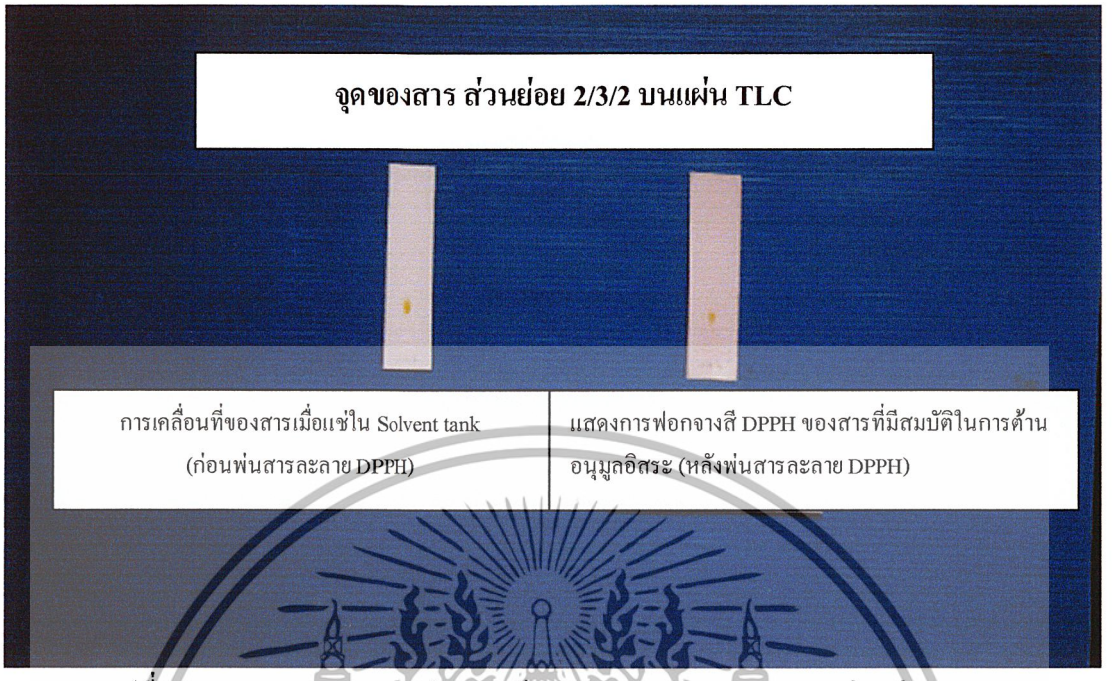
4.3.4 ผลการแยกสารสกัดจาก ส่วนย่อย 2/3

เมื่อทำการแยกสารสกัดด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และทดสอบการแยกด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน- ไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 20:80 สามารถแยกสารสกัดได้ทั้งหมด 3 ส่วนย่อย และพบว่าสารสกัดใน ส่วนย่อย 2/3/2 มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปตรวจสอบโครงสร้างได้ และนำมาทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยการนำมาฟอกจางสีสารละลาย DPPH จากรูปที่ 4.5.ก. และ รูปที่ 4.5.ข. จะพบว่าสารที่แยกได้สามารถฟอกจางสีสารละลาย DPPH ได้ซึ่งแสดงว่ามีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

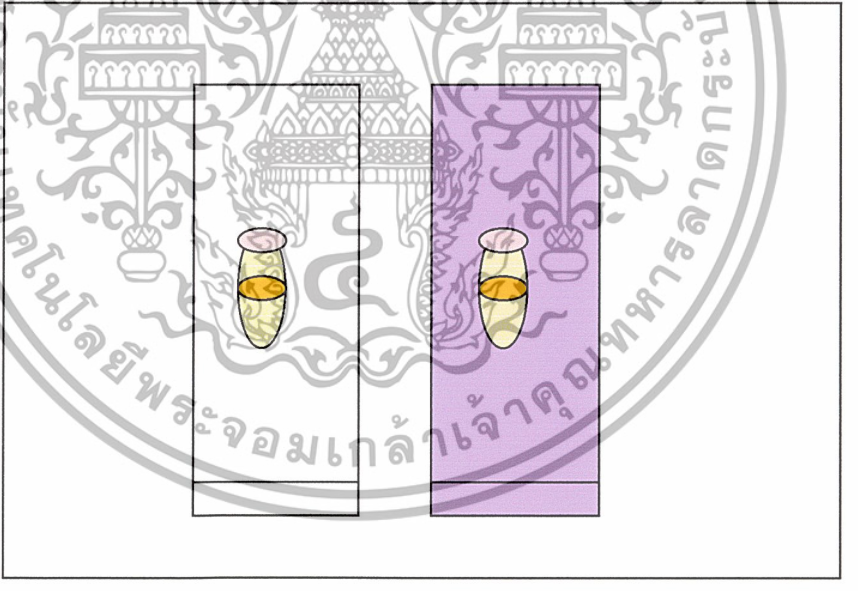
ตาราง 4.3.4 ผลการแยกสารสกัด จาก ส่วนย่อย 2/3

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (กรัม)	สีและลักษณะ
2/3/1*	0.0459	คราบสีส้ม
2/3/2**	0.0567	ผลึกสีส้ม
2/3/3***	0.0730	ผลึกสีเหลืองปนส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5.ก. แสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/3/2



รูปที่ 4.5.ข. ภาพวาดแสดงผลการการฟอกจางสีสารละลาย DPPH ของสาร ส่วนย่อย 2/3/2

* ส่วนย่อย 2/3/1 หมายถึง ส่วนย่อย 1 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 3 ในตารางที่ 4.3.4

** ส่วนย่อย 2/3/2 หมายถึง ส่วนย่อย 2 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 3 ในตารางที่ 4.3.4

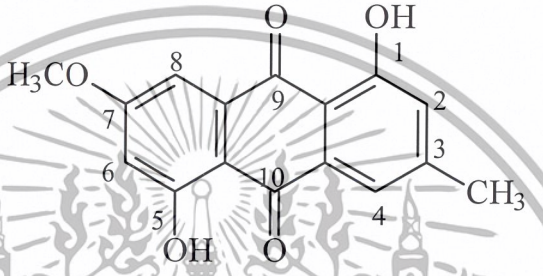
*** ส่วนย่อย 2/3/3 หมายถึง ส่วนย่อย 3 ที่แยกได้จากสารสกัด ส่วนย่อย 3 ในตารางที่ 4.3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5.ก. และ 4.5.ข. การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC พบว่ามีจุดของสารอยู่ 2 จุด จากเส้นที่ทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC มีจุดของสารสีส้มและสีชมพูตามลำดับ จะพบว่าสารทั้งสองสามารถฟอกจางสีม่วงของสารละลาย DPPH ได้บ้างเล็กน้อย โดยยังสามารถมองเห็นสีเดิมของสารได้บ้าง ซึ่งแสดงว่าสารที่แยกได้มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

4.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2

4.5.1 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1



รูปที่ 4.6.1 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/2/1

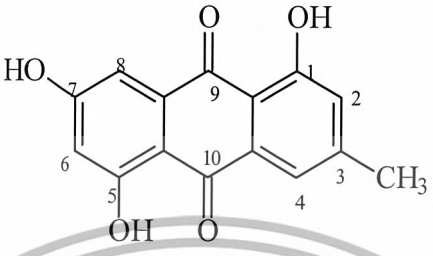
จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง FT-NMRจะพบว่าผลการวิเคราะห์คาดว่าโครงสร้างของสารที่สกัดได้จะมีโครงสร้างดังรูปที่ 4.6.1

ตารางที่ 4.4.1 แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 2/2/1 ด้วยเครื่อง FT-NMR

	ค่า chemical shift (ppm) ของสาร2/2/1
H-2	7.10
H-4	7.65
H-6	6.70
H-8	7.40
CH_3-3	2.50
OCH_3-3	3.95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/3/2



รูปที่ 4.6.2 โครงสร้างของสาร ส่วนย่อย 2/3/2

จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง FT-NMR จะพบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดที่แยกได้จากลำต้นของต้นชุมเห็ดเทศ [14] จึงคาดว่าโครงสร้างของสารที่สกัดได้จะมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4.6.2

ตารางที่ 4.4.2 แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง 2/3/2ด้วยเครื่อง FT-NMR

	ค่า chemical shift (ppm) ของสาร2/3/2	ค่า chemical shift (ppm) ของสารสารอ้างอิง[14]
H-2	7.17	7.07
H-4	8.30	7.60
H-6	6.59	6.63
H-8	7.45	7.30
CH_3-3	2.43	2.43

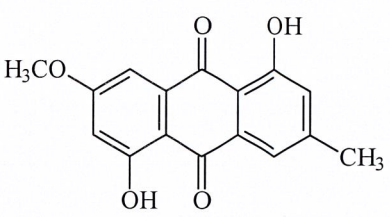
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

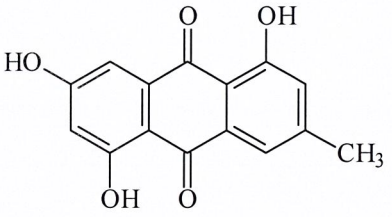
5.1 สรุปผลการวิจัย

1. สามารถสกัดสารจากเปลือกชุมเห็ดเทศด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) 20.00 21.45 และ 57.67 กรัม ตามลำดับ
2. สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเปลือกชุมเห็ดเทศ *(Cassia alata)* ในชั้นคลอโรฟอร์ม ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยสามารถแยกได้ 7 ส่วนย่อย
3. จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 7 ส่วนย่อย โดยวิธี DPPH radical scavenging assay และคำนวณหาค่า ED_{50} พบว่าสารสกัดใน ส่วนย่อย 2 มีค่า ED_{50} ต่ำที่สุด แสดงว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด จึงนำมาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์
4. ผลการแยกสารสกัดในส่วนย่อยที่ 2 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารสกัดได้ 3 ส่วนย่อย นำสารสกัดทั้ง 3 ส่วนย่อย มาทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสารสกัดใน ส่วนย่อย 2/2 และ ส่วนย่อย 2/3 มีค่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity ED_{50}) ใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระดีกว่า สารสกัดในส่วนย่อย 2/1 และพบว่าสารสกัดในส่วนย่อย 2/2 และ ส่วนย่อย 2/3 ยังไม่บริสุทธิ์ จึงนำไปทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
5. ผลการแยกสารสกัดใน ส่วนย่อย 2/2 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารสกัดได้อีก 3 ส่วนย่อย และพบว่าสารในส่วนย่อย 2/2/1 มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้าง และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีสารละลาย DPPH พบว่า ส่วนย่อย 2/2/1 สามารถฟอกจางสีได้
6. ผลการแยกสารสกัดใน ส่วนย่อย 2/3 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารสกัดได้อีก 3 ส่วนย่อย และพบว่าสารใน ส่วนย่อย 2/3/2 มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้าง และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการฟอกสีสารละลาย DPPH พบว่า ส่วนย่อย 2/3/2 สามารถฟอกจางสีได้
7. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยเครื่อง FT-NMR spectrometerใน ส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2จะได้สารที่คาดว่าจะมีโครงสร้างดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



สารที่ได้จาก ส่วนย่อย2/2/1



สารที่ได้จาก ส่วนย่อย 2/3/2

รูปที่ 5.1 โครงสร้างของสารที่ได้จากส่วนย่อย 2/2/1 และ ส่วนย่อย 2/3/2

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในขั้นตอนการทำ DPPH radical scavenging assay การเตรียมสารละลายแต่ละความเข้มข้น ควรจะใช้ตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดได้หมด เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ถูกต้อง
2. ในการสกัดสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชสมุนไพรควรจะใช้พืชสมุนไพรหลาย ๆ ชนิดเพื่อจะได้ทำการเปรียบเทียบผลการต้านอนุมูลอิสระเพื่อจะได้มีโอกาสในการเลือกพืชสมุนไพรที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลที่ดีที่สุด
3. เนื่องจากสารที่สกัดได้มีความเสถียรต่ำ อาจเกิดการสลายตัวได้ง่ายเมื่อได้รับแสง ดังนั้นในขั้นตอนการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีควรป้องกันไม่ให้คอลัมน์สัมผัสกับแสง และควรใช้เวลาในการแยกสารให้น้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. สันติ ทิพยางค์ และ วรวรรณ พันธุมนาวิน. **Bioactive Compounds Symposium and Biological Screening test Workshop.** กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. ภาคภูมิ พาณิชยูปการนันท์ และ ทรงศรี แก้วสุวรรณ. **แนวทางการพัฒนาสมุนไพรของประเทศไทย.** กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
3. Bandoniene, D. and Murkovic, M. 2002. On-Line HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Radical Scavenging Phenols Extracted from Apples (*Malus domestica* L). **J. Agric. Food Chem.** 50: 2482-2487.
4. วันดี กฤษณพันธ์. **การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
5. **Kaufman, P. B. Natural Product from Plants.** Boca Raton : CRC Press.
6. http://herbal.pharmacy.psu.ac.th/data/herbal/cassia.htm
7. Varshney, P. and Pal, R. 1977. Vhemical studies of the Flowers of *Cassia siamea* Lamk., *Peltophorum ferrugineum* Benth and *Caesalpinia pulcherrima* Sw. **The Indian Journal of Pharmacy.** Jan.-Feb.: 15-16.
8. Manjusree, P.; Roy, D. K. and Pal, P. R. 1977. Emodin from the leaves of *Cassia tora* Linn. **The Indian Journal of Pharmacy.** Sep.-Oct.: 15-16.
9. Choi, J. S.; Lee, H. J.; Park, K.; Ha, J. and Kang, S. S. 1996. *In vitro* Antimutagenic Effect of Antraquinone Aglycones and Naphthopyrone Glycosides from *Cassia tora*. **Planta Med.** 63: 11-14.
10. Sakharkar, P. R. and Pati, A. T. 1998. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.** Sep.-Oct.: 311-312.
11. Rao,K. V.; Damu, B.; Jayaprakasam, B. and Gunasekar, D. 1999. Flavonol Glycosides from *Cassia hirsute*. **J. Nat. Prod.** 62: 305-306.
12. Moriyama, H.; Iizuka, T. and Nagai, M. 2001. A Stabilized Flavonoid Glycoside in Heat-Treated *Cassia alata* Leaves and Its Structural Elucudation. **Yakugaku Zasshi.** 121: 817-820.
13. www.mahidol.ac.th/abstracts/annual2000/0185.htm
14. Hemlata และ Suraj B. Kalidhar. 1993. Alatinone, an antraquinone from *Cassia alata*. **Phytochemistry.** 32: 1616-1617.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

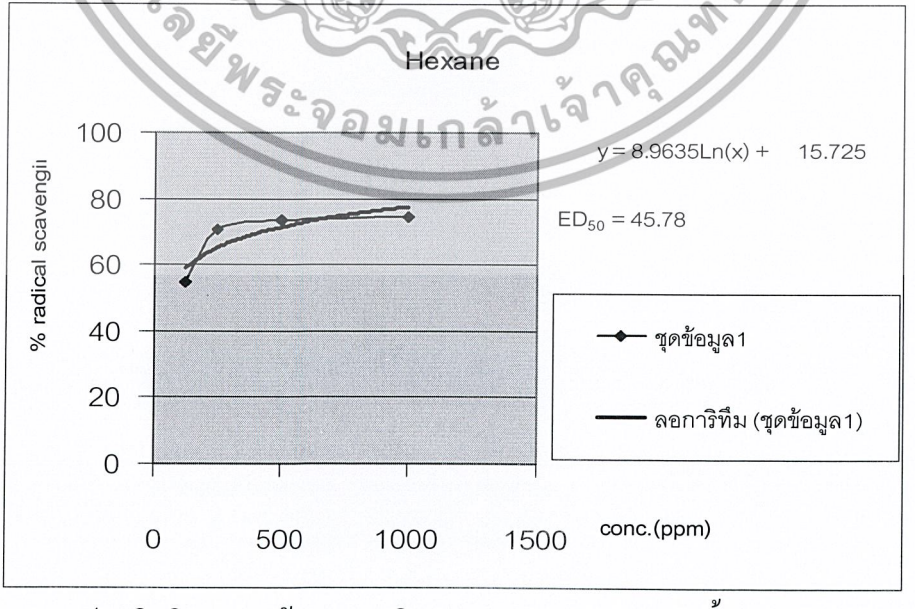
ภาคผนวกที่1

1.) วิธีการพล็อตกราฟเพื่อหาค่า ED_{50}

1. เปิดโปรแกรม excel
2. นำค่าของความเข้มข้น และเปอร์เซนต์การยับยั้ง เติมใน column
3. เมื่อเติมครบให้ลากเป็นกรอบดำกับตัวเลขทั้งหมด แล้วคลิกที่รูปกราฟแท่งทางด้านขวามือบน
4. จะปรากฏ Chart Wizard – Step 1 of 4 ให้คลิกที่ XY (Scatter) ดูกรอบทางขวาเลือกกราฟรูปที่ 2 คลิก next จะปรากฏ Chart Wizard Step 2 of 4 ให้คลิก next
5. จะเข้าสู่ Chart Wizard – Step 3 of 4 พิมพ์ chart title พิมพ์ค่าแกน [X], [Y] จากนั้นคลิก next
6. จะเข้าสู่ Chart Wizard – Step 4 of 4 พิมพ์ finish จะได้รูปกราฟ
7. คลิกที่จุดบนเส้นกราฟ จะปรากฏจุดสีเหลืองให้คลิกขวาที่จุดเหลือง แล้วคลิกที่ Add Trend line
8. คลิกที่ Logarithmic คลิกเครื่องหมายถูกที่ Display equation on chart คลิก OK
9. จะได้กราฟ พร้อมสมการ ซึ่งสามารถใช้ในการคำนวณหาค่า ED_{50}

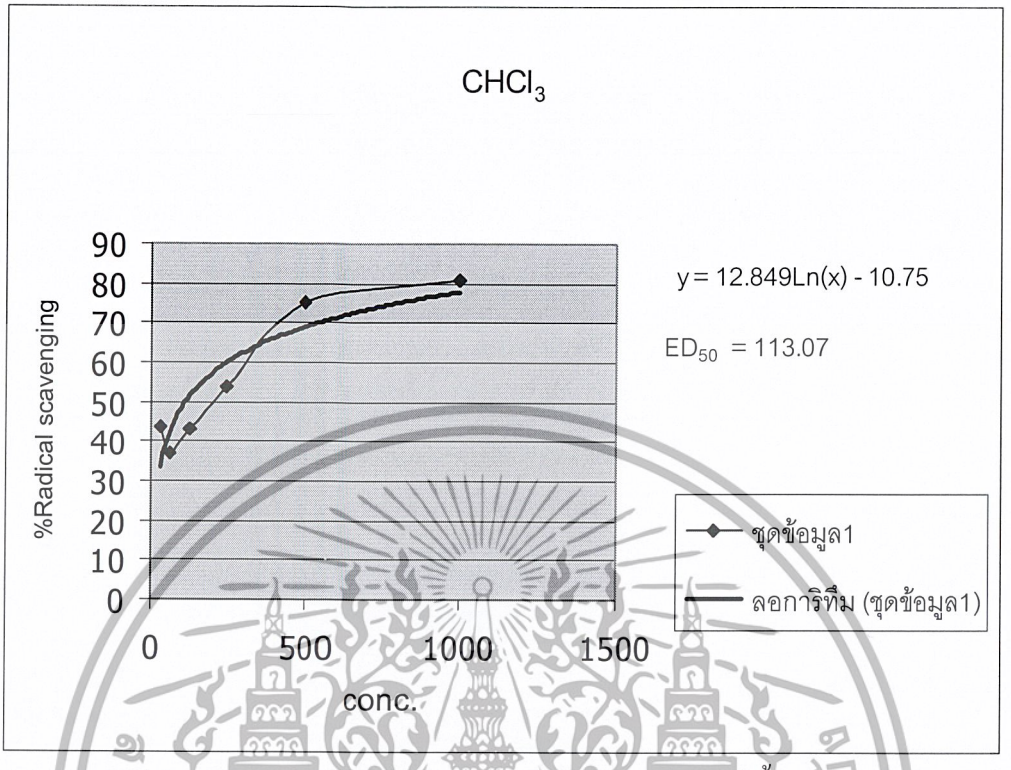
ภาคผนวกที่2

2.) กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายชั้นต่างๆ

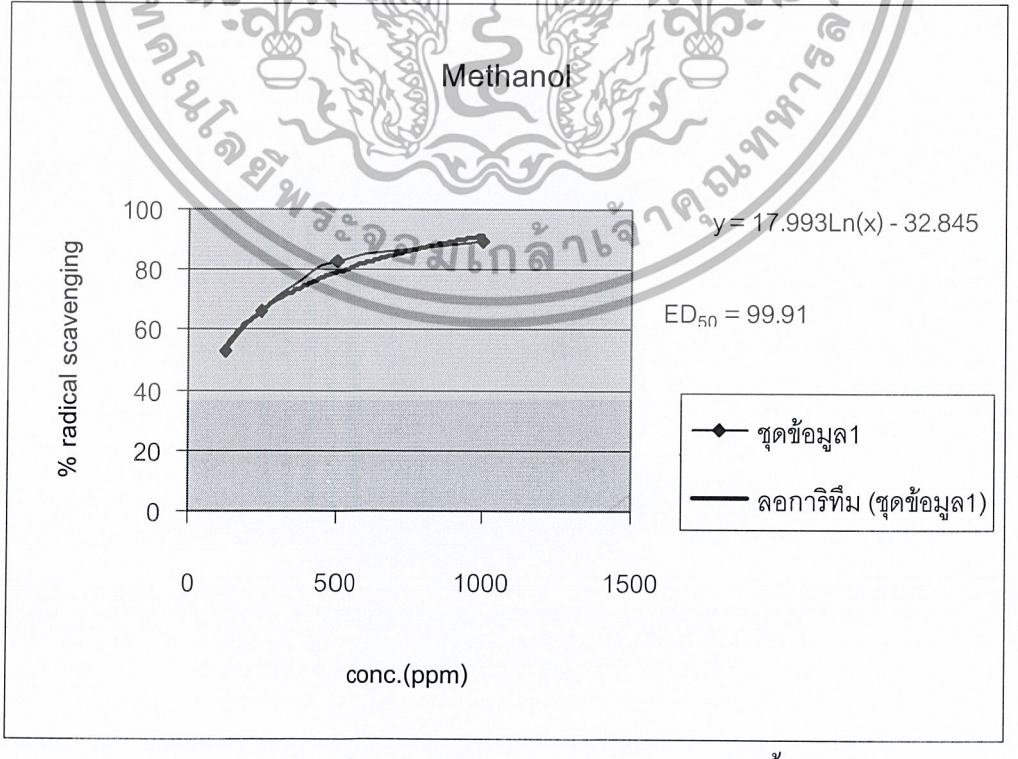


กราฟ 2-1 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟ 2-2 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม

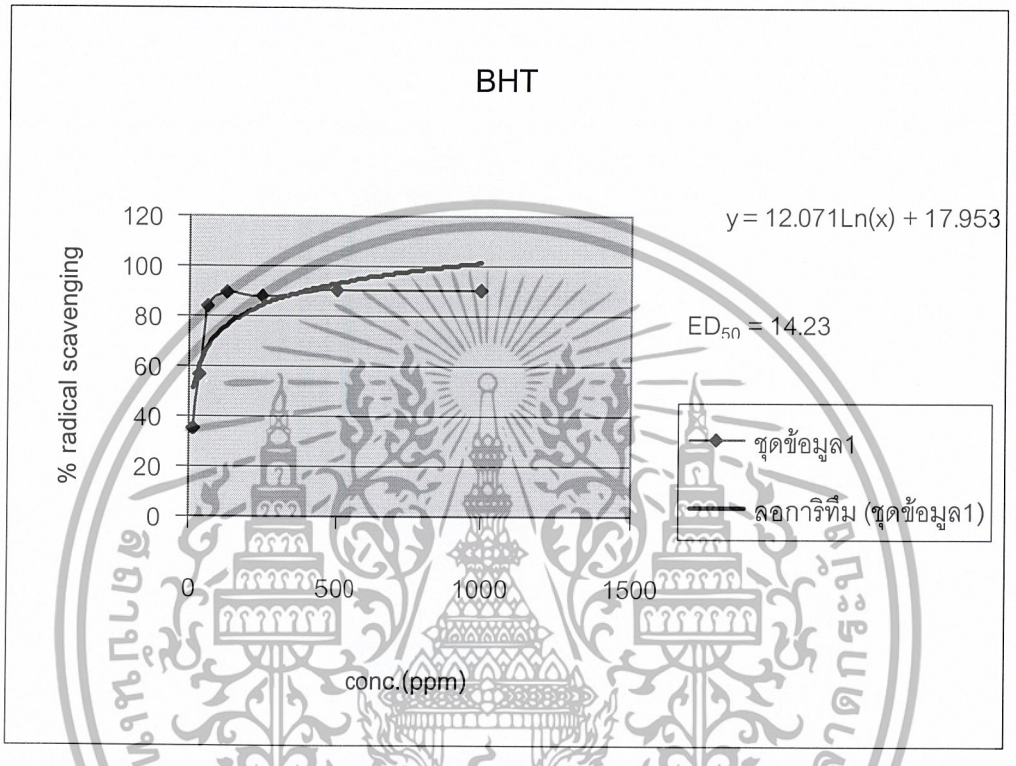


กราฟ 2-3 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 3

3.) กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของ BHT

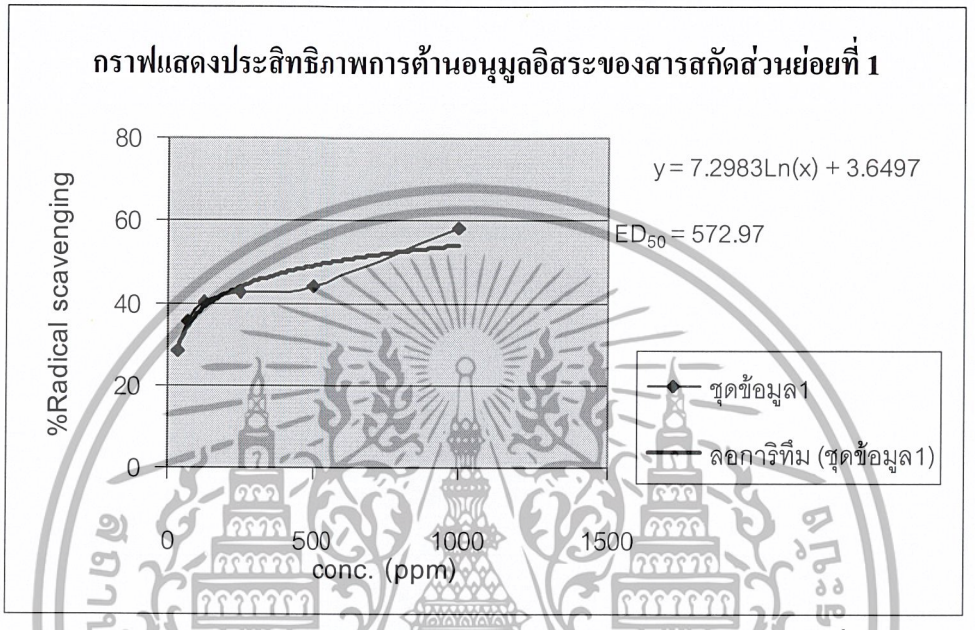


กราฟ 3 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของBHT

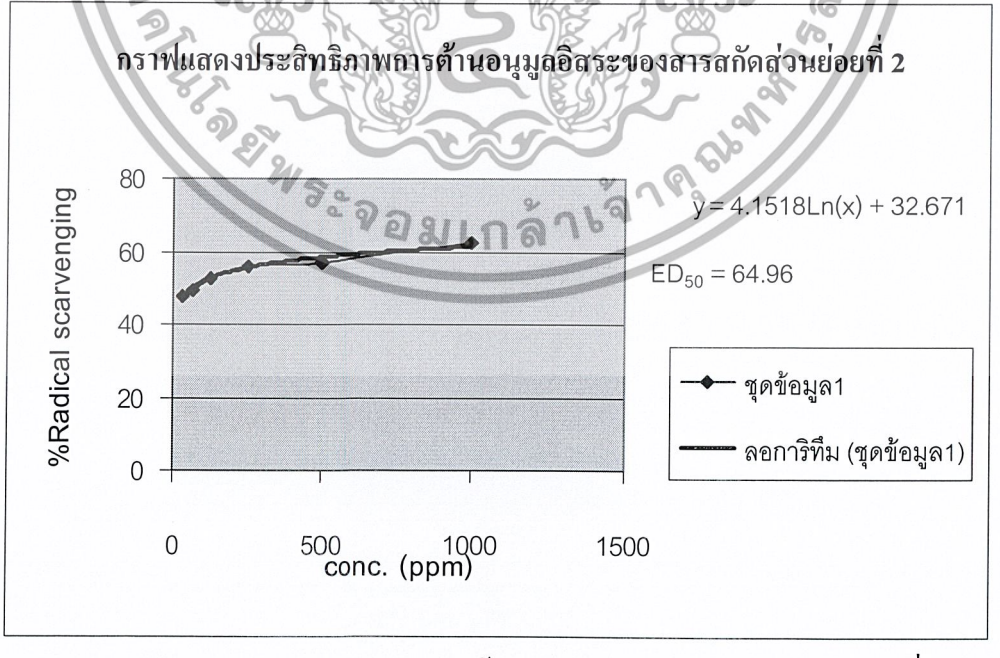
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 4

4.) กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 7 ส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม

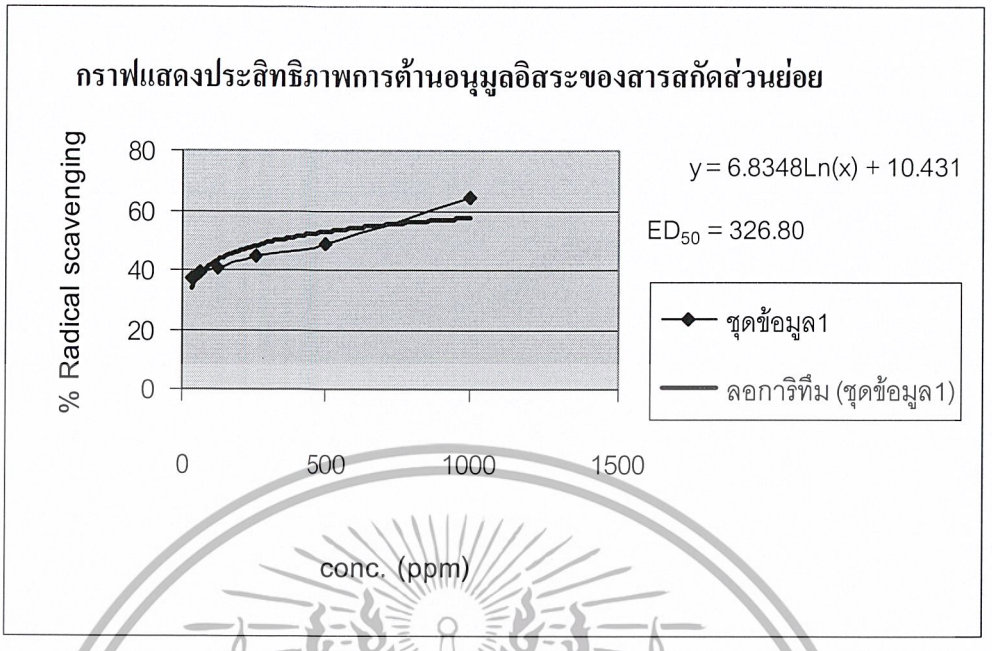


กราฟ 4-1 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่1

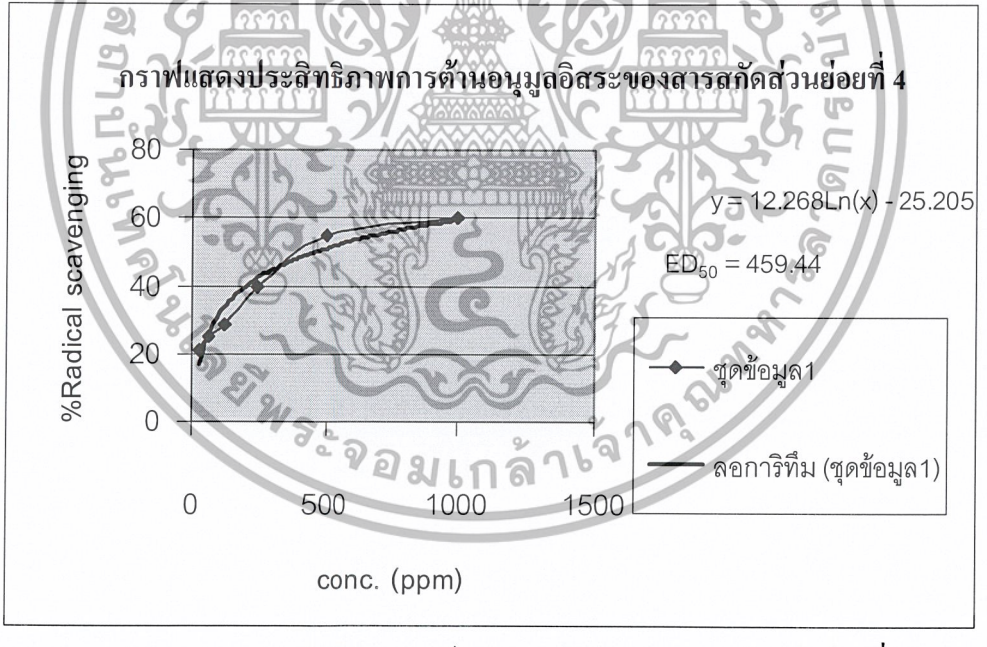


กราฟ 4-2 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

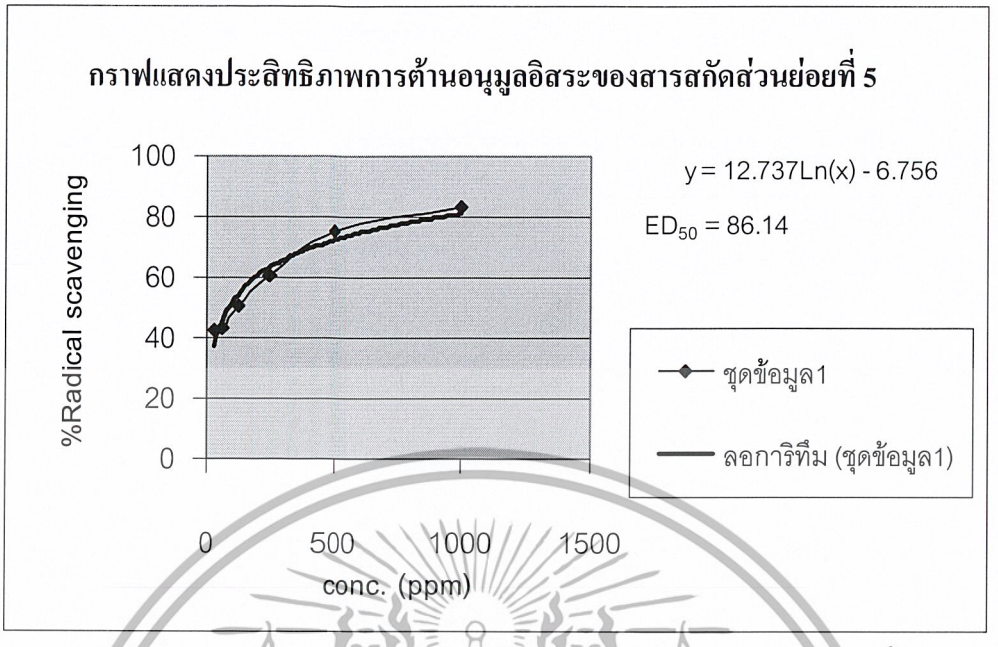


กราฟ 4-3 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 3

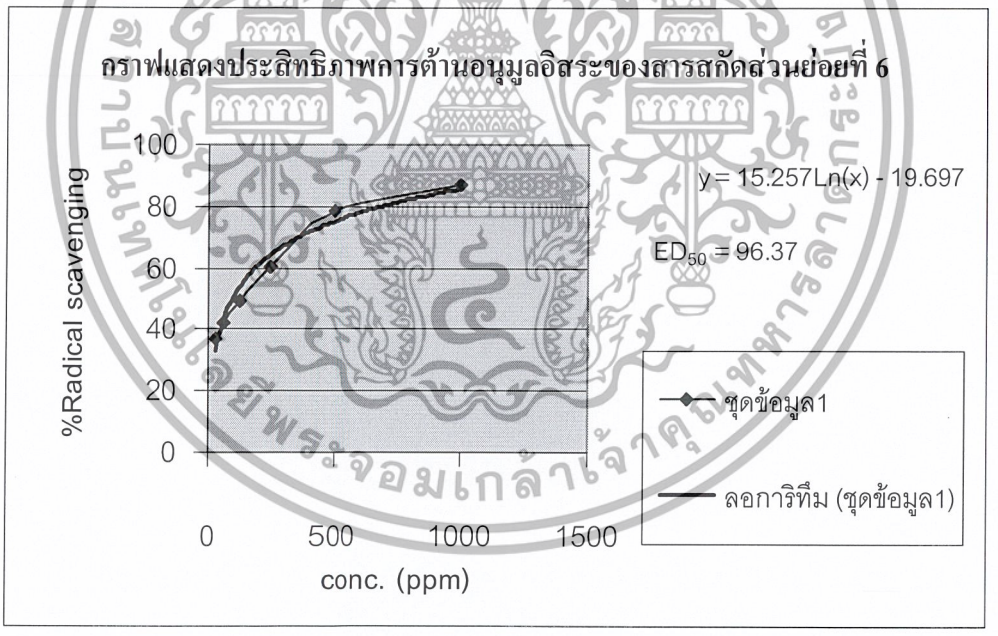


กราฟ 4-4 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

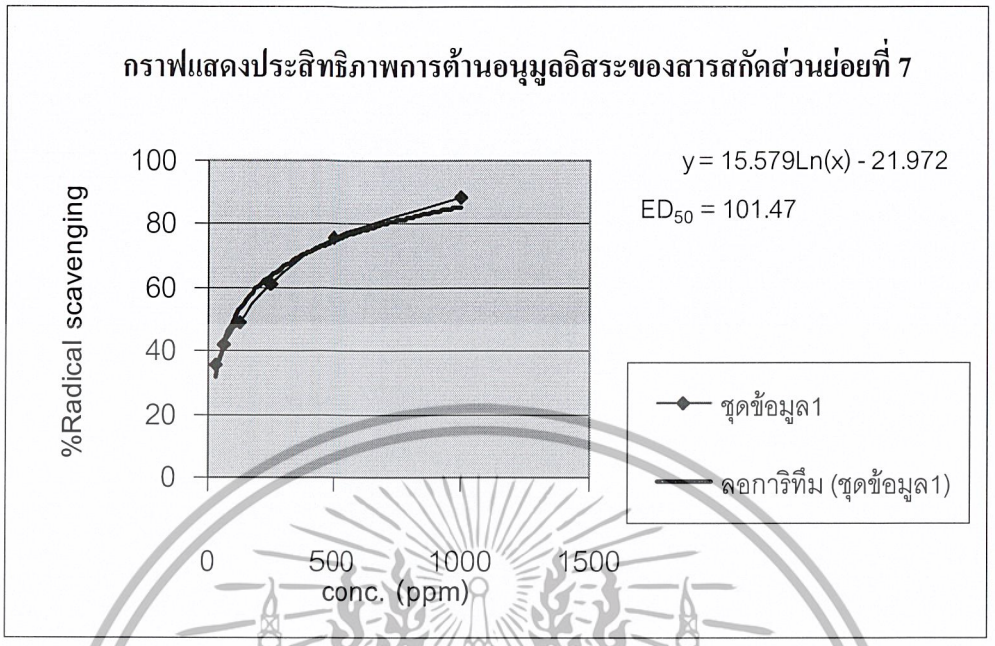


กราฟ 4-5 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 5



กราฟ 4-6 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

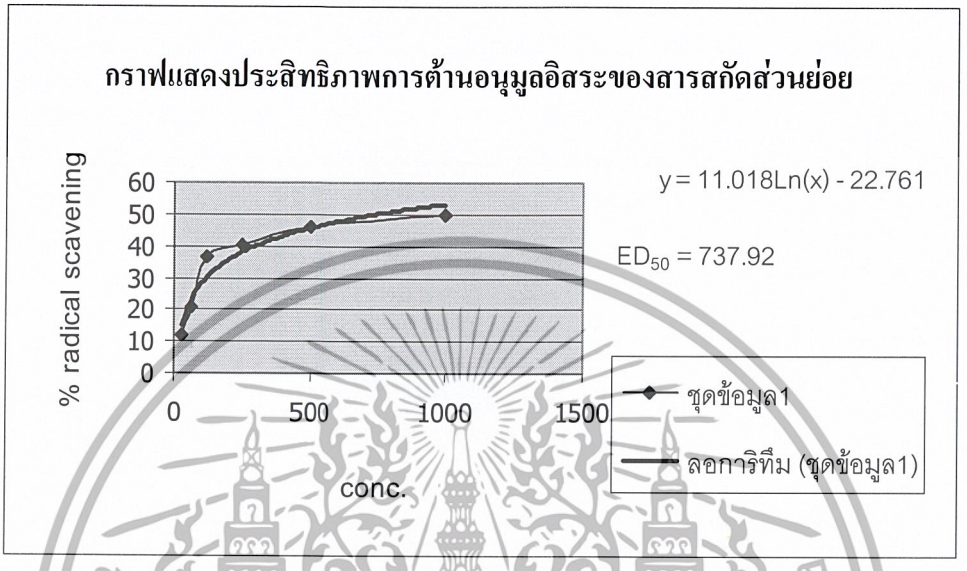


กราฟ 4-7 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 7

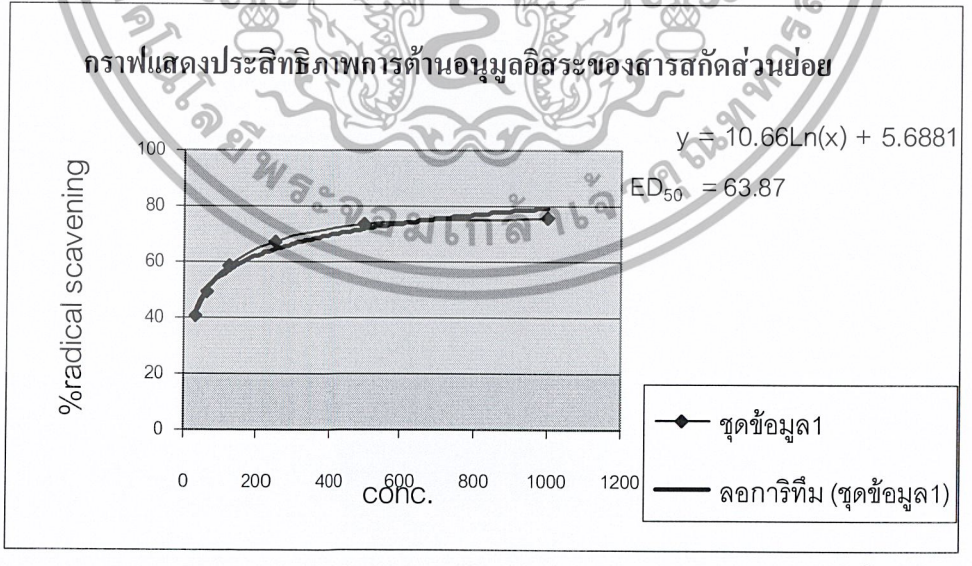
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 5

5.) กราฟแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนย่อยที่ 2

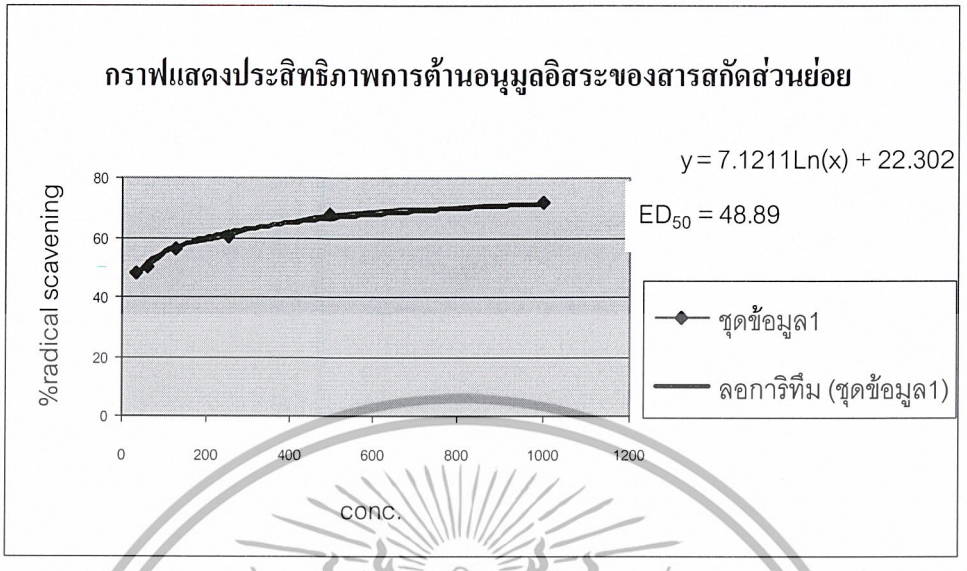


กราฟ 5-1 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/1



กราฟ 5-2 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟ 5-3 แสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 6 ข้อมูลการวิเคราะห์สารสกัดที่บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง NMR spectrometer

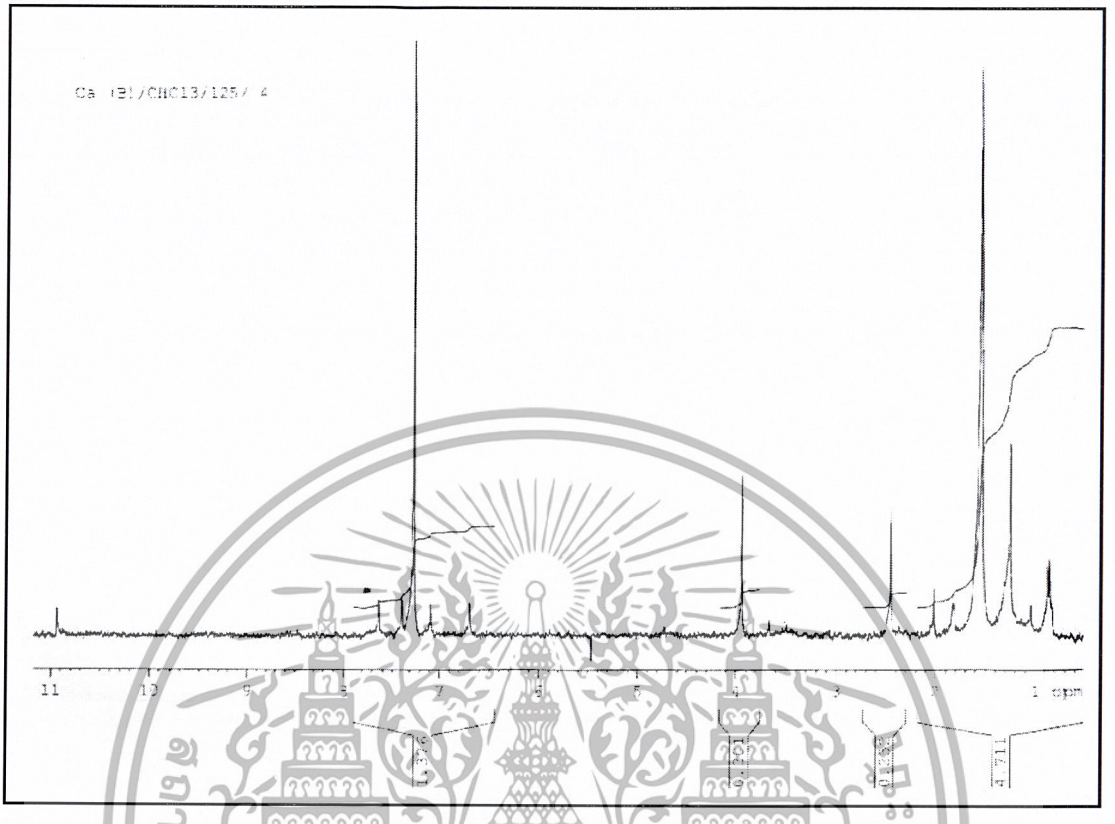
DU=v USER=service NAME=pao EXPNO=1 PROCNO=1

F1=11.454ppm F2=0.514ppm MI=0.00cm MAXI=10000.00cm PC=1.000

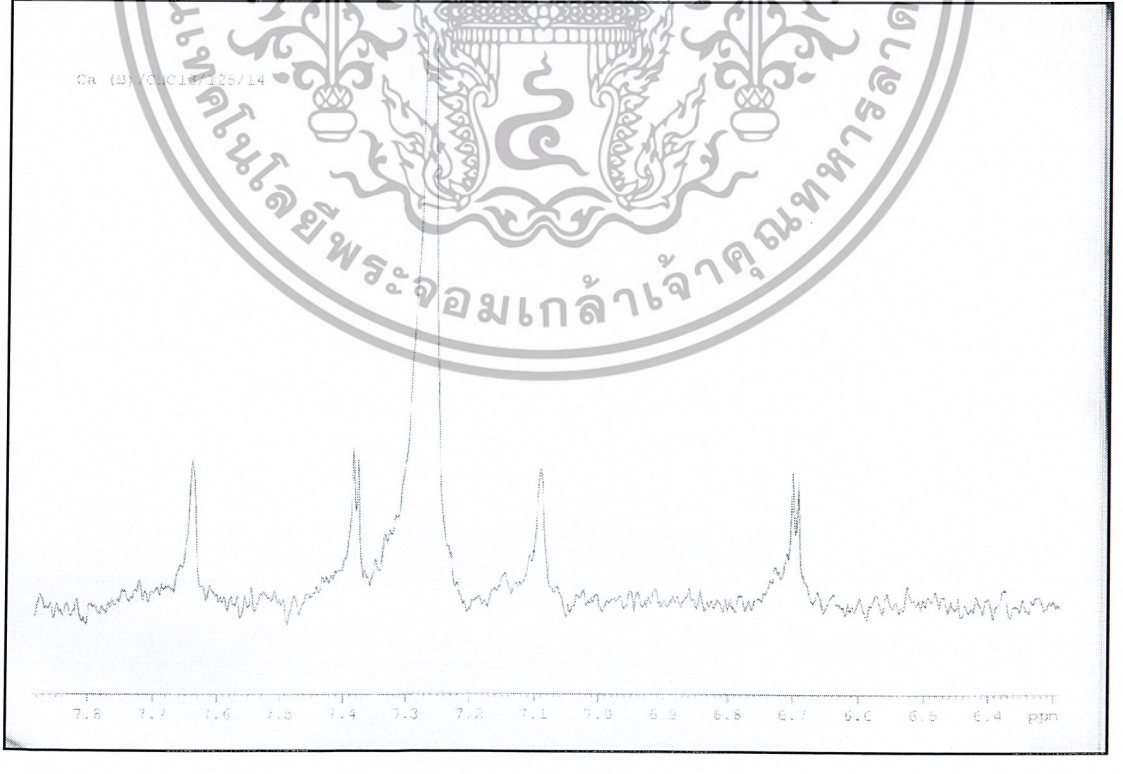
	ADDRESS	FREQUENCY [Hz}	FREQUENCY [PPM]	INTENSITY	HISTOGRAM
1	352.3	3283.242	10.9394	0.01	
2	2601.1	2293.246	7.6408	0.01	
3	2785.1	2216.533	7.3852	0.01	
4	2790.8	2214.009	7.3768	0.01	
5	2870.1	2179.224	7.2609	0.29	
6	2986.1	2128.377	7.0915	0.01	
7	3253.2	2011.282	6.7014	0.01	
8	3259	2008.722	6.6928	0.01	
9	5141.9	1183.108	3.942	0.07	
10	5329.7	1100.781	3.6677	0.01	
11	5449.8	1048.132	3.4923	0	
12	6158.9	737.195	2.4563	0.06	
13	6219	710.852	2.3685	0	
14	6456.9	606.531	2.0209	0.02	
15	6584.2	550.735	1.835	0.01	
16	6775.5	466.859	1.5555	0.24	
17	6981.8	376.368	1.254	0.08	
18	7119.5	316.026	1.053	0.01	
19	7240	263.162	0.8768	0.03	
20	7255.2	256.508	0.8547	0.03	
21	7706.6	58.574	0.1952	0.06	
22	7757.3	36.332	0.1211	0.05	
23	7840.2	-0.011	0	12.5	**********
24	7918.2	-34.191	-0.1139	0.02	
25	7927.9	-38.458	-0.1281	0.01	
26	7976.2	-59.628	-0.1987	0.07	

ตารางที่ 6-1 แสดงค่า ^{1}H-NMR Chemical shift ของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/2/1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6-2 แสดงพีก ^{1}H-NMR ของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/2/1



รูปที่ 6-3 แสดงการขยายพีก ^{1}H-NMR ของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/2/1

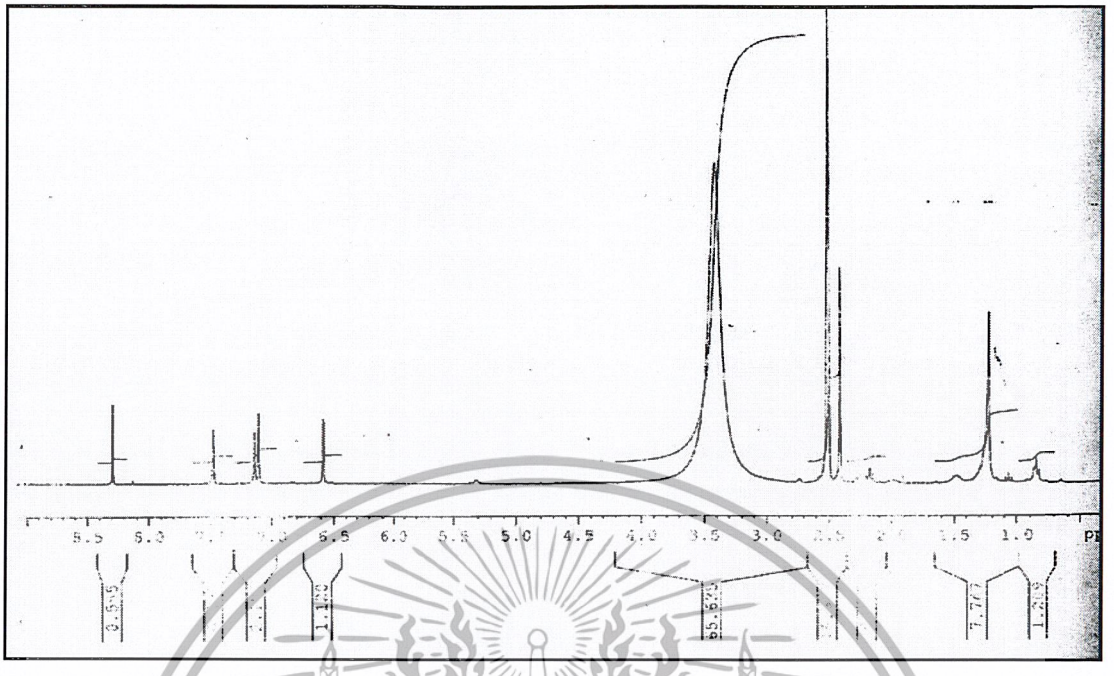
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

USER=service NAME=poa EXPNO=2 PROCNO=1
F1 = 1.000ppm F2 = -1.000ppm MI = 0.00cm MAXI=10000.00cm
PC=1.000

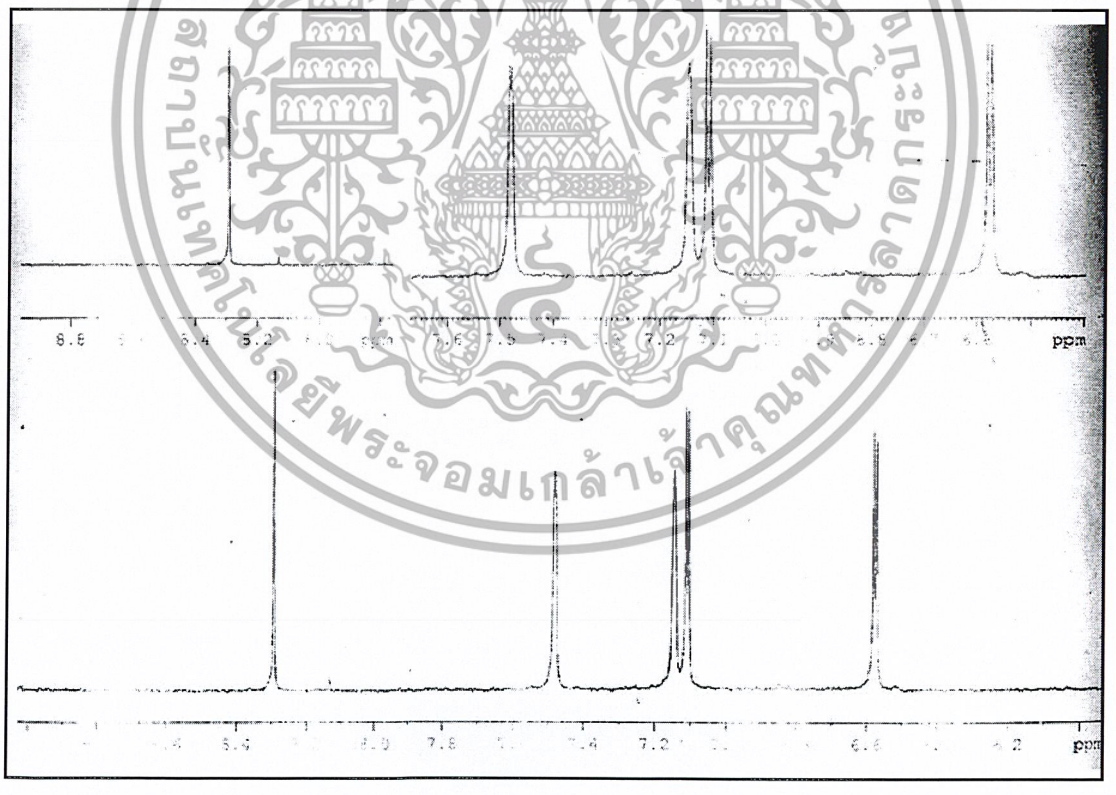
#	ADDRESS	FREQUENCY [Hz]	[ppm]	INTENSITY	HISTOGRAM
1	1980.9	2489.040	8.2932	1.93	**
2	2246.1	2440.516	8.1315	0.07	
3	3309.6	2245.936	7.4832	1.32	*
4	3316.0	2244.766	7.4793	1.32	*
5	3864.5	2144.416	7.1450	1.33	*
6	3916.4	2134.921	7.1133	1.73	**
7	3929.4	2132.535	7.1054	1.72	**
8	4348.9	2055.790	6.8497	0.00	
9	4790.3	1975.032	6.5806	1.57	**
10	4803.2	1972.675	6.5727	1.50	**
11	6845.7	1598.966	5.3276	0.08	
12	6873.6	1593.321	5.3088	0.09	
13	9976.9	1026.093	3.4188	7.89	*********
14	11093.8	821.753	2.7370	0.11	
15	11444.9	757.510	2.5239	5.36	*****
16	11454.2	755.801	2.5182	9.72	**********
17	11464.0	754.018	2.5123	12.50	**********
18	11473.8	752.226	2.5063	8.76	*********
19	11483.3	750.479	2.5005	3.95	****
20	11627.2	724.153	2.4128	5.30	*****
21	11841.9	684.866	2.2819	0.12	
22	11973.3	660.836	2.2018	0.20	
23	12013.2	653.533	2.1775	0.38	
24	12053.8	646.111	2.1528	0.20	
25	12328.0	595.931	1.9856	0.07	
26	12446.4	574.276	1.9134	0.02	
27	12888.7	493.348	1.6438	0.04	
28	13156.0	444.441	1.4808	0.18	
29	13569.7	368.760	1.2287	4.17	****
30	13800.3	326.566	1.0881	0.13	
31	13839.0	319.477	1.0645	0.23	
32	13877.0	312.524	1.0413	0.12	
33	14069.4	277.366	0.9241	0.08	
34	14183.0	256.548	0.8548	0.65	*
35	14220.7	249.647	0.8318	0.29	
36	14340.4	227.755	0.7589	0.04	
37	14523.2	194.299	0.6474	0.05	
38	15264.9	58.561	0.1953	0.05	
39	15475.2	20.123	0.0670	0.10	
40	15568.8	2.995	0.0100	0.94	*
41	15585.2	0.000	0.0000	15.07	***************
42	15603.2	-3.298	-0.0110	0.49	
43	15693.4	-19.799	-0.0660	0.10	
44	15910.8	-59.569	-0.1985	0.07	

ตารางที่ 6-4 แสดงค่า ^{1}H-NMR Chemical shift ของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/3/2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6-5 แสดงพีก ^{1}H-NMR ของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/3/2



รูปที่ 6-6 แสดงการขยายพีก ^{1}H-NMR ของสารสกัดส่วนย่อยที่ 2/3/2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้