



รายงานการวิจัย  
เรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีของใบช่อยตำ  
Chemical Constituents of the Leaves of  
*Clerodendrum disparifolium* Blume.

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการได้รับทุนจาก  
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี  
ปี พ.ศ. 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

## องค์ประกอบทางเคมีของใบช่อยดำ

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ พิษณุ แดงท่าข้าม และสมร มะเตือ

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากช่อยดำ ประกอบด้วย การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากส่วนต่างๆ ของช่อยดำ ทดสอบความเป็นพิษต่อ cell line 4 ชนิด ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส แยกและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในใบช่อยดำ

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากใบช่อยดำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้เร็วกว่าสารสกัดจากส่วนลำต้น ราก และ ดอก ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบช่อยดำ 4 ชนิด คือ CD-1 CD-2 CD-3 และ CD-4 กับ cell line 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์ปกติจากไตของลิง (Vero cell) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ แบคทีเรียแกรมบวก (*E. faecium*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa*) นอกจากนี้สารสกัด CD-3 และ CD-4 ยังนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่าสารสกัดทั้งหมดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ทุกชนิดที่ทำการทดสอบและไม่สามารถยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสได้ ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากสารสกัดละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลายที่ใช้สำหรับการทดสอบ

การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดใบช่อยดำ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด คือ CD-3-PLC-1, CD-1-2-1-1, และ CD-1-2-3-1 แต่ยังไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีได้ เนื่องจากสารทั้ง 3 ชนิดละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลายเกือบทุกชนิด ประกอบกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไม่ค่อยเสถียร ส่งผลให้การวิเคราะห์ข้อมูล 2D-NMR ทำได้ค่อนข้างยาก อย่างไรก็ตามสารทั้ง 3 ชนิดมีข้อมูล <sup>1</sup>H-NMR คล้ายกัน ดังนั้นโครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 3 ชนิดน่าจะคล้ายกันด้วย จากข้อมูล 1D-NMR คาดว่าสารทั้ง 3 ชนิด น่าจะมีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารในกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์หรือสเตียรอยด์

## Chemical Constituents of the Leaves of *Clerodendrum disparifolium*

Sarinrut Chattiranan, Pisanu dangthakham, and Samon Madia

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate of the pharmacological activities from the extracts of *Clerodendrum disparifolium* including the antioxidant activity from the different parts of this plant, the cytotoxicity activity against various cell lines, and the inhibition of bacterial and alpha-glucosidase of the leave extracts.

The leaves extract showed the fastest bleaching the color of DPPH radical, followed by stems, roots, and flowers, respectively. The cytotoxicity activities of the four leaves extracts that are CD-1, CD-2, CD-3, and CD-4 against African green monkey kidney (vero), human breast adenocarcinoma (MCF-7), human small cell lung carcinoma (NCI-H187), human hepatocarcinoma (HepG2), the antibacterial test against *Enterococcus faecium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. In addition the CD-3 and CD-4 were also tested alpha-glucosidase inhibition. All the extracts showed inactive against all of the activities tests. These results, partly because the extracts were not completed solubility in organic solvent that used as solvent.

The 3 purified compounds that are the main chemical constituents in the leave extract of *Clerodendrum disparifolium* were isolated. These are CD-3-PLC-1, CD-1-2-1-1, and CD-1-2-3-1 but still did not identify their chemical structures. Because they did not completely soluble in almost organic solvents and they are not stable resulting in the record of the 2D-NMR spectra was so difficulty. However, they had similar <sup>1</sup>H-NMR spectrum so their chemical structures are resemblance. From the 1D-NMR data and the

appearance when treated with anisaldehyde reagent they could be terpenoids or steroids.

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องแก้วในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือเรื่องเครื่องมือและเครื่องแก้วสำหรับทำวิจัย

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์

2560

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3

2.1	ชื่อยคำ	3
2.2	งานวิจัยของชื่อยคำ	4
2.3	สารพฤษเคมีที่แยกจากพืชสกุล Clerodendrum	5
2.4	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	13
2.5	การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	13
2.5.1	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	14
2.5.2	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	15
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b>		16
3.1	วัสดุและสารเคมี	16
3.2	เครื่องมือและอุปกรณ์	16
3.3	พืชตัวอย่าง	17
3.4	การเตรียมสารสกัดชื่อยคำ	17
3.5	การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชื่อยคำ	17
3.6	การทำ partition สารสกัดใบชื่อยคำ	18
3.7	การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบชื่อยคำ	19
3.7.1	การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น	19
3.7.2	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	19
3.7.3	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	19
3.8	การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบชื่อยคำ	20
<b>สารบัญ (ต่อ)</b>		
		<b>หน้า</b>
3.8.1	การแยกสารสกัด CD-2	20
3.8.2	การแยกสารสกัด CD-2-2	20
3.8.3	การแยกสารสกัด CD-2-4	20
3.8.4	การแยกสารสกัด CD-3 ด้วย PLC	20
3.8.5	การแยกสารสกัด CD-3 ด้วย CC	20
3.8.6	การแยกสารสกัด CD-1	20
3.8.7	การแยกสารสกัด CD-1-2	21
3.8.8	การแยกสารสกัด CD-1-2-1	21

3.8.9	การแยกสารสกัด CD-1-2-3	21
3.8.10	การทำ acetylation ของ CD-1-2-1	21
<b>บทที่ 4 ผลการทดลอง</b>		23
4.1	ผลการเตรียมสารสกัดจากส่วนต่างๆของข่อยดำ	23
4.2	ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดข่อยดำ	23
4.3	ผลการทำ partition สารสกัดใบข่อยดำ	24
4.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดข่อยดำ	25
4.3.1	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น	25
4.3.2	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	25
4.3.3	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	26
4.5	ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบข่อยดำ	27
4.5.1	ผลการแยกสารสกัด CD-2	27
4.5.2	ผลการแยกสารสกัด CD-2-2	28
4.5.3	ผลการแยกสารสกัด CD-2-4	28
4.5.4	ผลการแยกสารสกัด CD-3 ด้วย PLC	29
4.5.5	ผลการแยกสารสกัด CD-3 ด้วย CC	31
4.5.6	ผลการแยกสารสกัด CD-1 ด้วย CC	32
4.5.7	ผลการแยกสารสกัด CD-1-2	33
4.5.8	ผลการแยกสารสกัด CD-1-2-1	34
4.5.9	ผลการแยกสารสกัด CD-1-2-3	34
4.5.10	การทำ acetylation ของ CD-1-2-1	37
<b>บทที่ 5 สรุป อภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ</b>		38
<b>บรรณานุกรม</b>		
<b>ประวัติผู้วิจัย</b>		42

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของข่อยดำ	3
2.2	โครงสร้างทางเคมีของพินอลิกจากพืชสกุล <i>Clerodendrum</i>	5
2.3	โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์จากพืชสกุล <i>Clerodendrum</i>	7



2.4	โครงสร้างทางเคมีของเทอร์พีนอยด์จากพืชสกุล <i>Clerodendrum</i>	9
2.5	โครงสร้างทางเคมีและตัวอย่างของไกลโคไซด์	12
2.6	ปฏิกิริยา acid hydrolysis ของ O-ไกลโคไซด์	13
2.7	กลไกการต้านอนุมูล DPPH ของสารต้านออกซิเดชัน	13
2.8	การรีดิวซ์ resazurin เป็น resorufin โดยเซลล์สิ่งมีชีวิต	14
2.9	การไฮโดรไลซ์ PNPG เป็น <i>p-nitrophenol</i> ด้วยเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	15
3.1	การสกัดส่วนต่างๆ ของข่อยดำด้วย 70% เมทานอล/น้ำ	17
3.2	ขั้นตอนการทำ partition ของสารสกัดใบข่อยดำ	18
3.3	ขั้นตอนการสกัดผลิตภัณฑ์อะซีเตตของปฏิกิริยา acetylation	21
4.1	องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของข่อยดำ	23
4.2	องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไคคลอโรมีเทน บิวทานอลและน้ำ	24
4.3	การฟอกจางสีของ DPPH	25
4.4	องค์ประกอบทางเคมีจากการแยกสารสกัด CD-2	28
4.5	การแยก CD-2-2 ด้วย PLC	28
4.6	องค์ประกอบทางเคมีของ CD-2-2-1	28
4.7	ของแข็งสีขาวและองค์ประกอบทางเคมีของ CD-2-4	29
4.8	องค์ประกอบทางเคมีของ CD-3-PLC-1	29
4.9	โปรตอน NMR ของ CD-3-PLC-1 ครั้งที่ 1	30
4.10	โปรตอน NMR ของ CD-3-PLC-1 ครั้งที่ 2	30
4.11	องค์ประกอบทางเคมีแยกได้จาก CD-3 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี	31
4.12	องค์ประกอบทางเคมีแยกได้จาก CD-1 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี	32
4.13	องค์ประกอบทางเคมีแยกได้จาก CD-1-2 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี	33
4.14	การแยก CD-1-2-1 ด้วย PLC	34
4.15	องค์ประกอบทางเคมีของ CD-1-2-1-1	34
4.16	องค์ประกอบทางเคมีของ CD-1-2-3-1	34
4.17	โปรตอน NMR ของ CD-1-2-1-1	35
4.18	<sup>13</sup> C NMR ของ CD-1-2-1-1	36
4.19	โปรตอน NMR ของ CD-1-2-3-1	36
4.20	เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของ CD-1-2-1-1 และ CD-1-2-1 หลังทำ	37

**สารบัญญภาพ (ต่อ)**

acetylation

- |      |  |    |
|------|--|----|
| 4.21 | วิเคราะห์โปรตอน NMR ของ CD-1-2-1-1   | 39 |
| 4.22 | วิเคราะห์ $^{13}\text{C}$ ของ CD-1-2-1-1                                   | 39 |
| 4.23 | องค์ประกอบทางเคมีของ CD-1-2-1-1 และ CD-1-2-3-1 เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน | 40 |

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
4.1	น้ำหนักและ ลักษณะของสารสกัดจากส่วนต่างๆของข่อยดำ	23
4.2	น้ำหนักและ ลักษณะของสารสกัด CD-2 – CD-4	24
4.3	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	25
4.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ซูเครส	26
4.5	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มอลเทส	26
4.6	ลักษณะและน้ำหนักของสารแยกได้จาก CD-2 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี	27
4.7	ลักษณะและน้ำหนักของสารแยกได้จาก CD-3 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี	31
4.8	ลักษณะและน้ำหนักของสารแยกได้จาก CD-1 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี	32
4.9	ลักษณะและน้ำหนักของสารแยกได้จาก CD-1-2	33

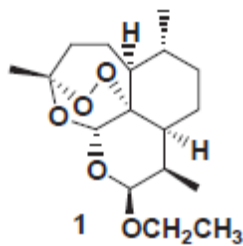
# บทที่ 1

## บทนำ

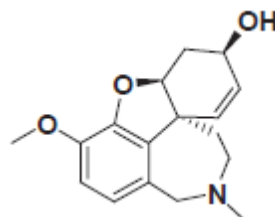
### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การใช้ประโยชน์จากสารธรรมชาติมารักษาโรคเป็นหนึ่งในอารยธรรมของมนุษย์ที่มีการสืบทอดกันมาตั้งแต่อดีตกาล จนกระทั่งถึงยุคปฏิวัติอุตสาหกรรมที่มีการพัฒนาทางด้านเคมีอินทรีย์เป็นอย่างมาก ก่อให้เกิดการสังเคราะห์ยาและมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของยาเพื่อให้ยานั้นออกฤทธิ์ดีขึ้น หรือเพื่อความปลอดภัยต่อผู้ใช้งานขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยาที่สังเคราะห์ขึ้นใช้ในปัจจุบันร้อยละ 25 มีที่มาจากพืชสมุนไพร

ตัวอย่างของยาที่สกัดได้จากธรรมชาติ อาทิ เช่น Artether เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene แยกได้จากต้น *Artemisia anua* (Asteraceae) ใช้เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการต้านเชื้อมาลาเรีย และ Galantamine แยกได้จากต้น *Galanthus woronowii* Losinsu ในประเทศรัสเซีย ใช้เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Heinrich and Teoh, 2004)



Arteether



Galantamine

### ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของยารักษาโรคบางชนิดที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร

เป็นที่ทราบกันดีว่าประเทศไทยมีสมุนไพรและมีภูมิปัญญาท้องถิ่นของการใช้สมุนไพรเป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันประเทศต่างๆ ได้ให้ความสนใจศึกษาการใช้สมุนไพรของตนเองให้เกิดประโยชน์มากที่สุดเพื่อเพิ่มทั้งคุณค่าและมูลค่าทั้งในด้านการใช้เป็นสมุนไพร เวชภัณฑ์ เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อเพิ่มมูลค่าจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

ข้อดีความเป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจเพราะสามารถรักษาโรคได้อย่างหลากหลาย ได้แก่ แก้กระษัย แก้พิษสัตว์กัดต่อย แก้หน้าเหลืองเสีย แก้ปวดเมื่อย แก้เบาหวาน เป็นต้น แต่พืชชนิดนี้ไม่ค่อยเป็นที่รู้จัก และมีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์น้อยมาก จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดนี้ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการใช้และพัฒนาสารสกัดจากใบข้อต่อต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดข่อยดำ
2. เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นสารหลักในใบข่อยดำ
3. พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบสำคัญที่แยกได้

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างใบข่อยดำในเขต อำเภอหนองหญ้าปล้อง และอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
2. เตรียมสารสกัดหยาบใบข่อยดำโดยใช้ตัวทำละลาย 70% เมทานอล/น้ำ ด้วยวิธีรีฟลักซ์

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสารสกัดข่อยดำ
2. ทราบชนิดและโครงสร้างของสารที่เป็นสารสำคัญในใบข่อยดำ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในบทที่ 2 จะกล่าวถึงข้อมูลทั่วไปและงานวิจัยของชื่อยคำ สารพฤกษเคมีที่แยกได้จากพืชสกุล *Clerodendrum* และการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนี้

#### 2.1 ชื่อยคำ

ชื่อยคำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clerodendrum disparfolium* Blume จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae ชื่ออื่นๆ ได้แก่ ดังหวาย แม้อยายถมลูกเขย และเครือสังฆาต ส่วนใหญ่พบบริเวณริมแม่น้ำลำธาร เขิงเขา สภาพดินเป็นดินทรายถึงดินเหนียว ในประเทศไทยพบได้ทางภาคกลางและภาคตะวันตกของประเทศ ในจังหวัดเพชรบุรีพบในเขต อำเภอท่ายาง บ้านแหลม หนองหญ้าปล้อง และชะอำ

ชื่อยคำเป็นไม้พุ่มอาจสูงได้ถึง 6 เมตร ใบคล้ายใบชื่อยแต่ไม่สาก ใบออกตรงข้าม สีเขียวสด ใบสดมีรสขม ออกดอกเป็นช่อสี ขาวแกมเหลือง โคนกลีบเป็นหลอด มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ออกดอกช่วงหน้าหนาว (พ.ย.-ม.ค.) ลักษณะเด่นของพืชชนิดนี้คือ ใบ 2 ซีกตามแนวเส้นกลางใบไม่เท่ากัน ปลายใบจะโค้งไปทางด้านหนึ่ง ทำให้มีพื้นที่ใบ 2 ซีก ไม่เท่ากัน ผลเป็นผลแห้ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ภายในมีเมล็ด 1 เมล็ด พบกระจายทั่วไปในเขตร้อน (ชูศรี ตลับมุข และจตุพร เผ่าพงษ์ไทย, 2553)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของชื่อยคำ

สรรพคุณของข่อยดำ ใบแก้มะเร็ง แก้วบาหวาน แก้วโรคไต แก้วน้ำเหลืองเสีย แก้วพิษสัตว์ กัดต่อย เช่น ผึ้ง ต่อ แตน งูเห่า งูเขียวหางไหม้ รากนำมาต้มดื่มแก้ปวดเมื่อย (วงศ์สฤติ ฉั่วกุล, 2553) วิธีใช้ใบข่อยดำเพื่อรักษาอาการดังที่กล่าวมา คือเคี้ยวใบสด 2-5 ใบ แล้วต้มน้ำตาม หรือใช้ใบสดบดผสมเหล้าขาวใส่แผล (จำลอง นาคนคร, 2557)

พืชสกุล *Clerodendrum* มีมากกว่า 500 ชนิด แพร่กระจายอยู่ในทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย แอฟริกา และอเมริกา ในประเทศไทยพบประมาณ 28 ชนิด (Leeratiwong et al., 2011)

## 2.2 งานวิจัยของข่อยดำ

งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของข่อยดำมีค่อนข้างน้อย มีเพียงการสำรวจพบว่าเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์แก้ปวดเมื่อย การศึกษาฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดหนูเบาหวาน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ดังนี้

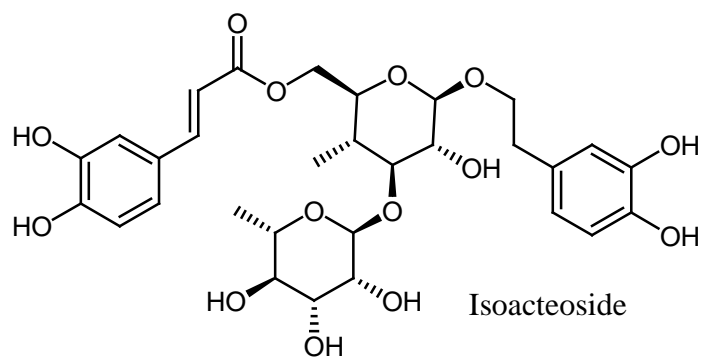
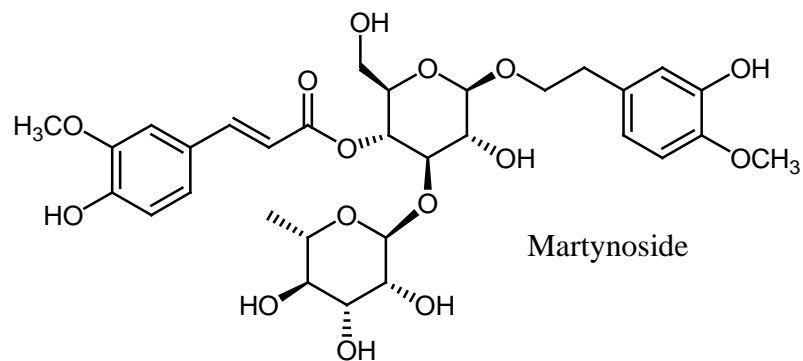
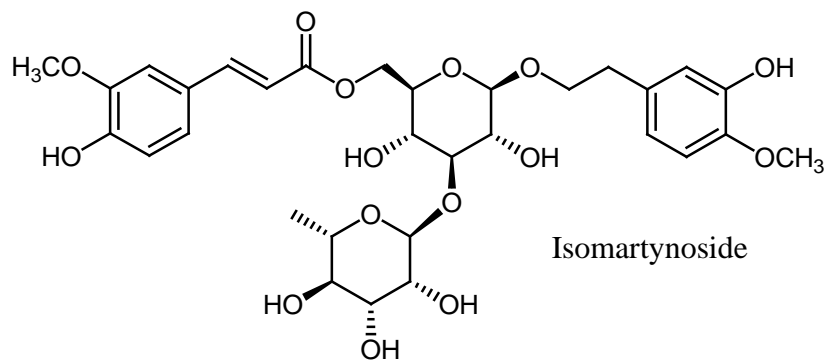
วงศ์สฤติ ฉั่วกุล (2553) ได้สำรวจสมุนไพรพื้นบ้านและตำรับยาพื้นบ้านของไทยที่มีฤทธิ์แก้ปวดเมื่อย โดยศึกษาใน 8 จังหวัด คือ ชัยภูมิ น่าน สุโขทัย เพชรบูรณ์ สุรินทร์ กระบี่ ยโสธร และอุบลราชธานี พบว่าส่วนรากของข่อยดำ (ดงหวาย) เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ใช้เป็นยาเดี่ยวโดยต้มดื่มเพื่อแก้ปวดเมื่อยได้

ชูศรี ตลับ मुख และจตุพร เผ่าพงษ์ไทย (2553) ศึกษาการลดระดับน้ำตาลในเลือดและค่าทางโลหิตวิทยาในหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใบข่อยดำ ทำการทดลองโดยเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานด้วยการฉีดสารสเตโรนโดโซโตซินขนาด 65 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าช่องท้อง นำหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหารมากกว่า 126 มิลลิเมตร/เดซิลิตร ไปใช้ในหนูเบาหวานป้อนสารสกัดขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แก่หนูเบาหวานทุกวันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ วัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูทุกสัปดาห์ ส่วนค่าทางโลหิตวิทยาทำการวัดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบข่อยดำสามารถฟื้นฟูภาวะเบาหวานในหนูทดลองได้ โดยสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดและทำให้ค่าทางโลหิตวิทยา (ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ความเข้มข้นฮีโมโกลบิน จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงและจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว) ของหนูเบาหวานใกล้เคียงกับหนูปกติ

ศรินทร์น์ ฉัตรธีระนันท์ วรางคณา สบายใจ และสิริมาศ นิยมไทย (2556) การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบข่อยดำแห้งที่สกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ และเอทานอล 95% พบสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฟลาโวนอยด์ และแอลคาลอยด์ การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี DPPH assay และ Folin-Ciocalteu ตามลำดับ พบว่าสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ และเอทานอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยรายงานค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $4.46 \pm 0.04$  และ  $4.03 \pm 0.14$  มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารเอทิลแอลกอฮอล์มีค่าเท่ากับ  $258.84 \pm 3.84$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด ในขณะที่สารสกัดเอทานอลมีค่าเท่ากับ  $289.49 \pm 1.32$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัมสารสกัด และพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.8191

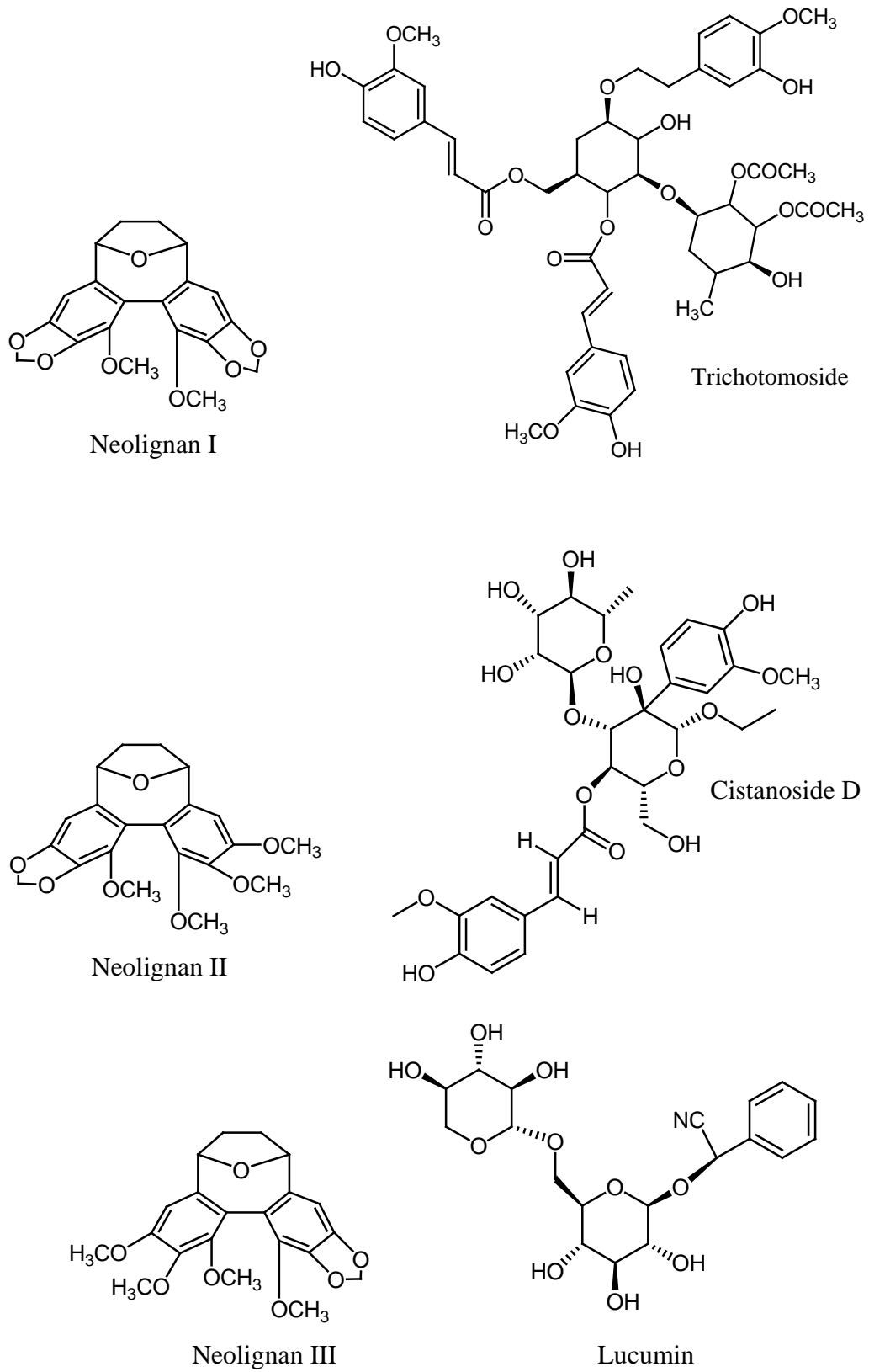
### 2.3 สารพฤษเคมีที่แยกจากพืชสกุล *Clerodendrum*

Shrivastava and Patel (2007) ได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับสารพฤษเคมีของพืชสกุล *Clerodendrum* พบว่าประกอบด้วยสารหลักในกลุ่ม สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) สเตียรอยด์ (steroids) แอลคาลอยด์ (alkaloids) และน้ำมัน ตัวอย่างสารพฤษเคมีในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และเทอร์ปีนอยด์แยกได้จากพืชในสกุล *Clerodendrum* แสดงในภาพที่ 2.2-2.4 ตามลำดับ

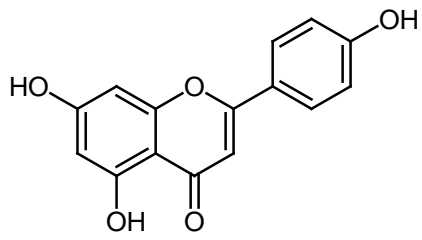


ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกจากพืชสกุล *Clerodendrum*

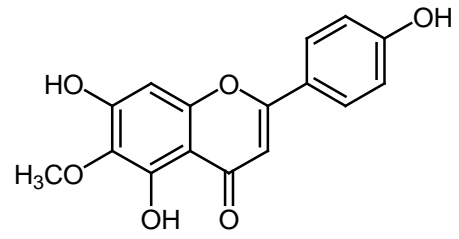




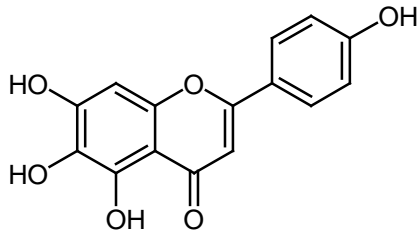
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดจากพืชสกุล *Clerodendrum* (ต่อ)



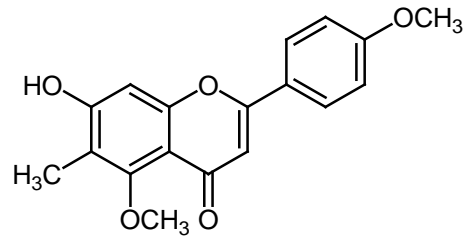
Apigenin



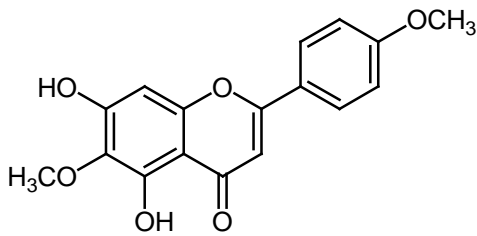
Hispidulin



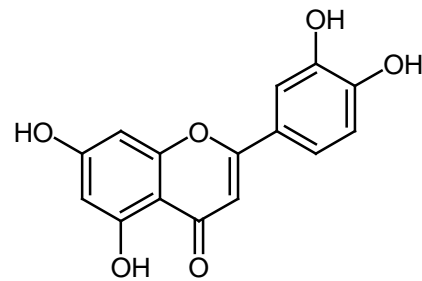
Scutellarein



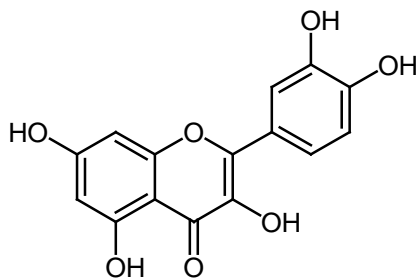
Cleroflavone



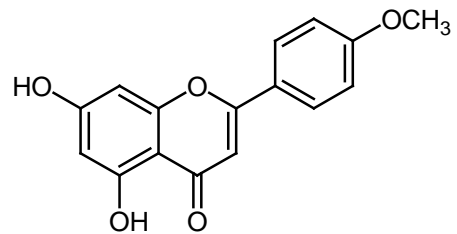
Pectolinarigenin



Luteolin

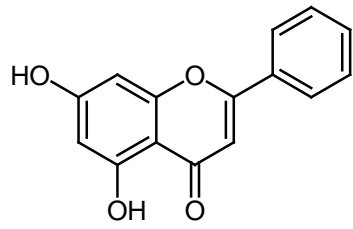


Kaempferol

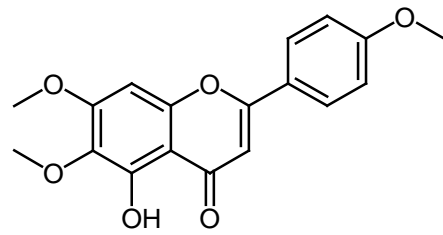


Acacetin

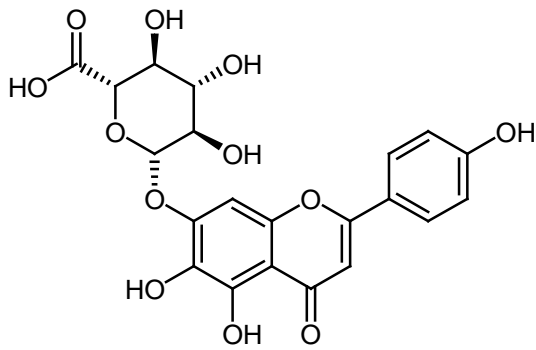
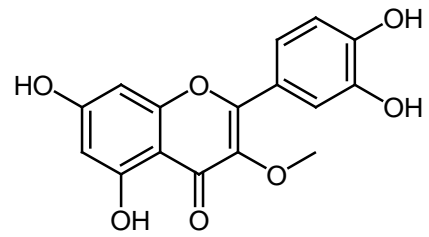
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์จากพืชสกุล *Clerodendrum*



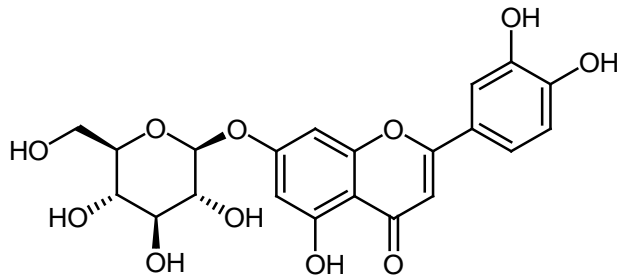
Baicalein



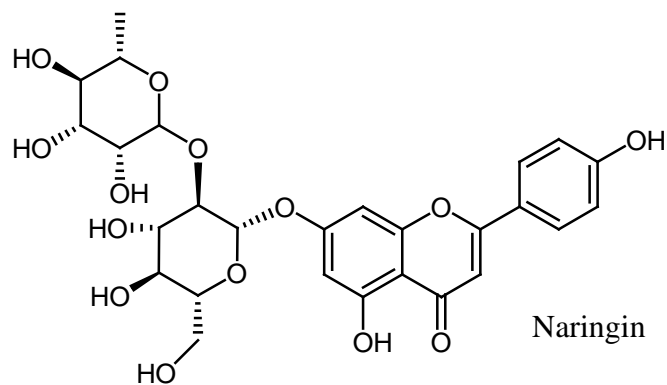
Salvigenin

Scutellarein-7-O- $\beta$ -D-glucuronide

Quercetin-3-methyl ether

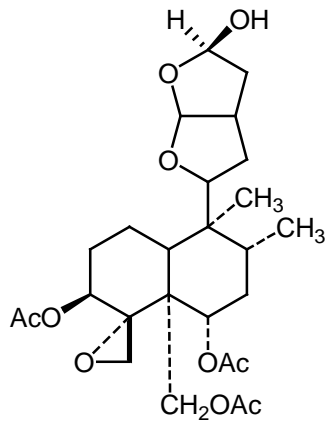


Cynaroside

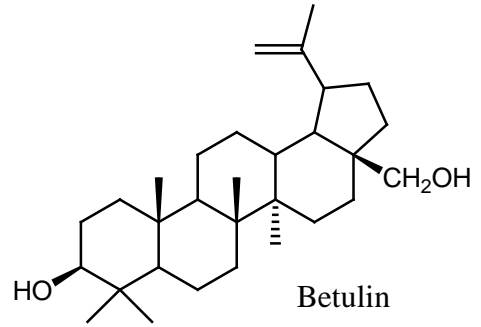


Naringin

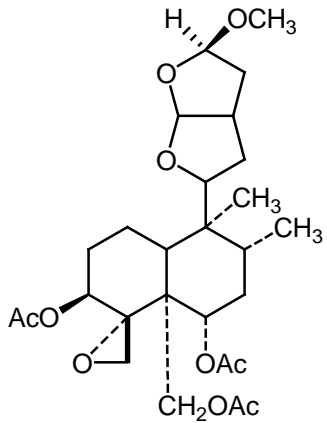
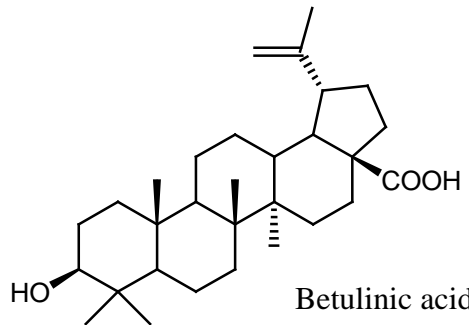
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์จากพืชสกุล *Clerodendrum* (ต่อ)



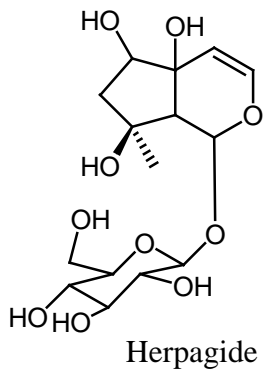
14,15-Dihydro-15-hydroxy-3-epicaryoptin



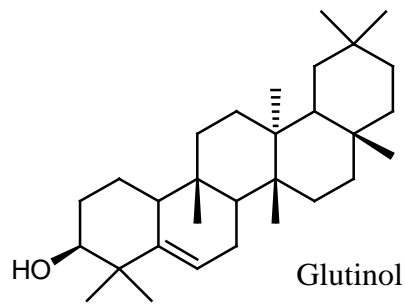
Betulin

14,15-Dihydro-15 $\beta$ -hydroxy-3-epicaryoptin

Betulinic acid

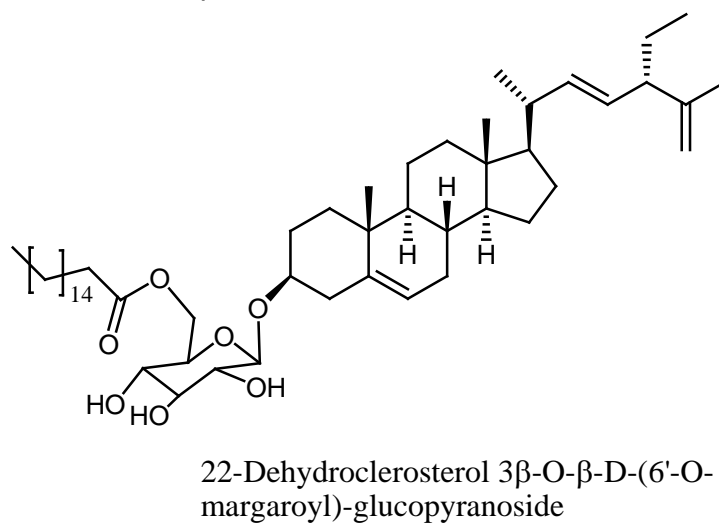
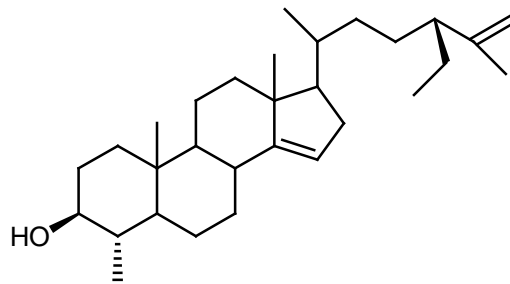
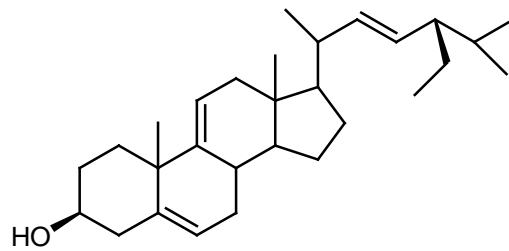
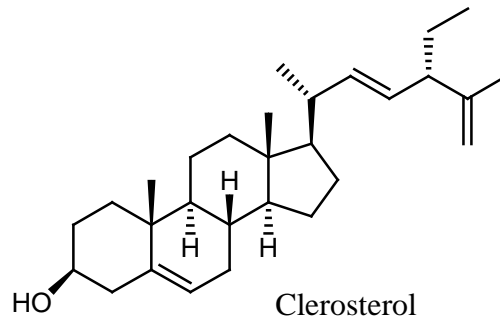


Herpagide

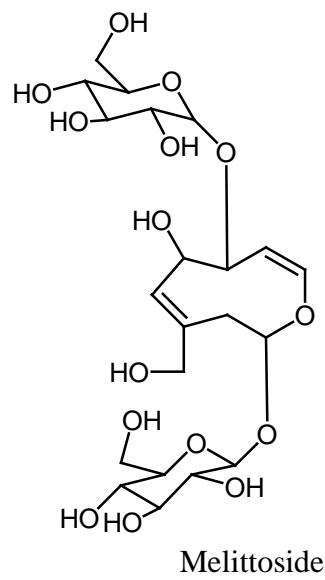
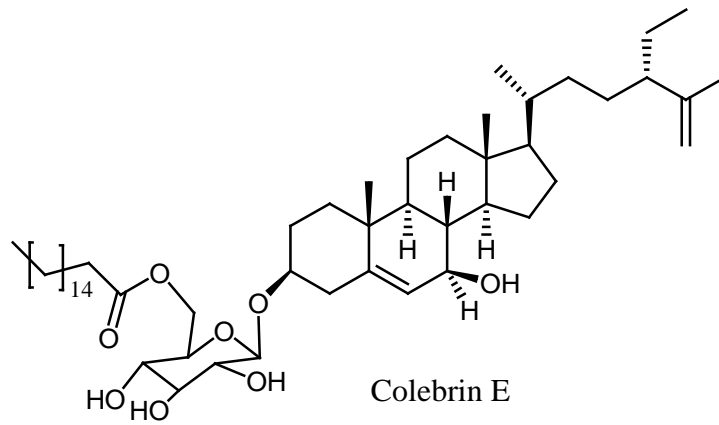
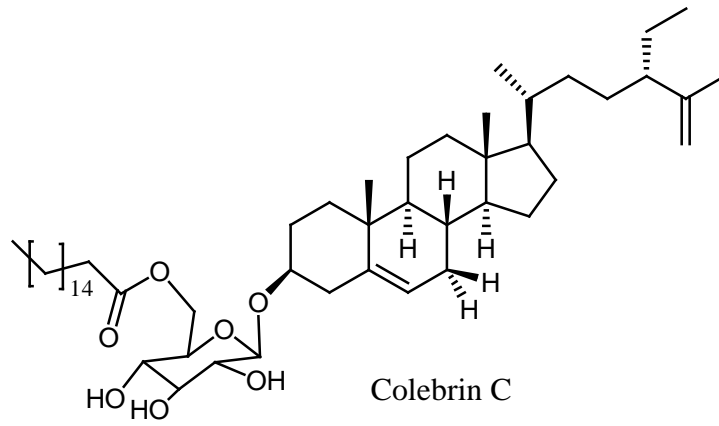


Glutinol

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเทอร์ปีนอยด์จากพืชสกุล *Clerodendrum*

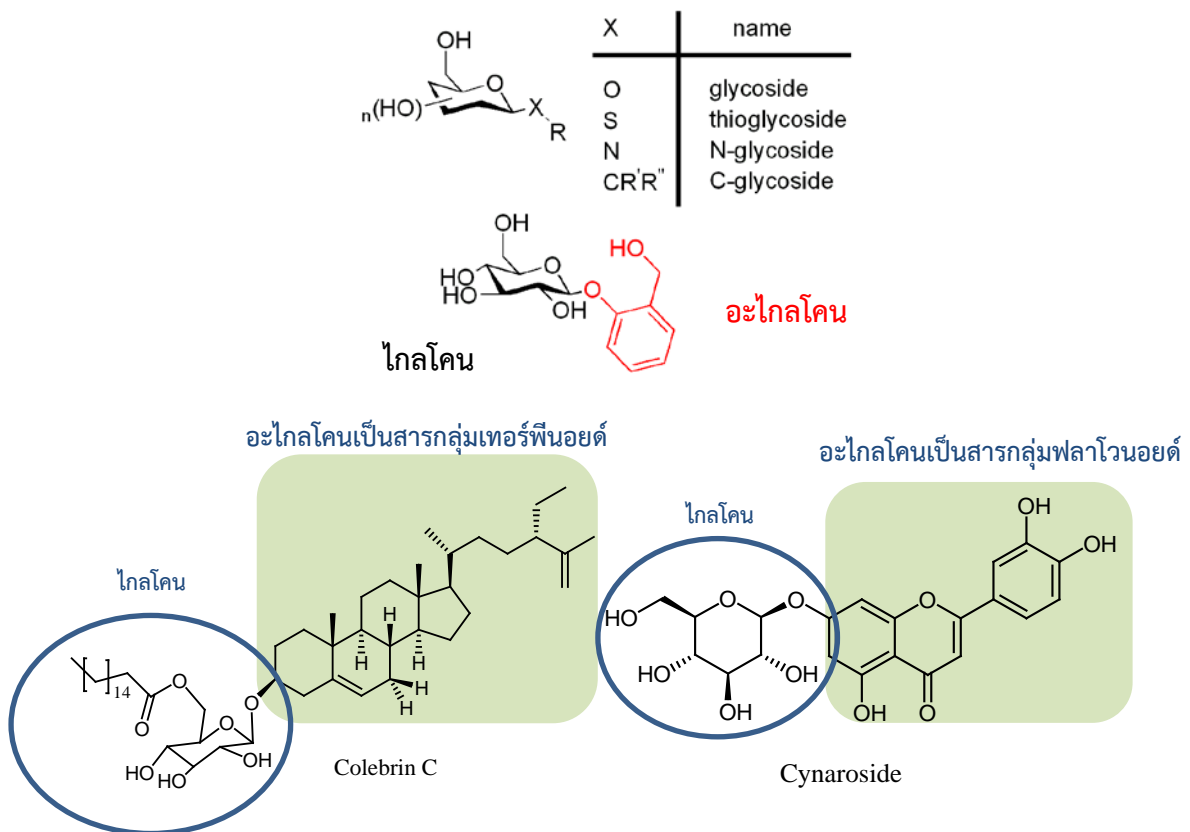


ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเทอร์ปีนอยด์จากพืชสกุล *Clerodendrum* (ต่อ)



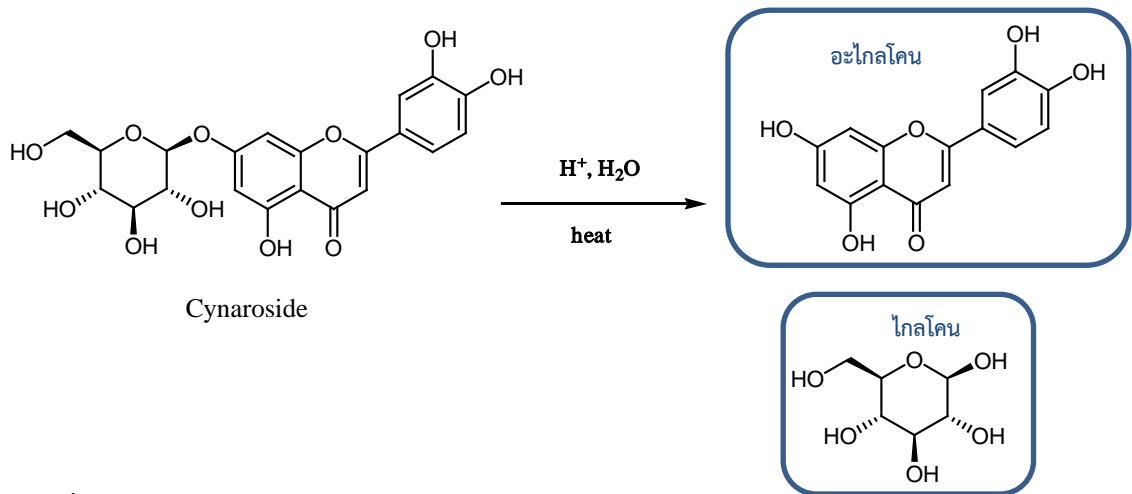
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเทอร์ปีนอยด์จากพืชสกุล *Clerodendrum* (ต่อ)

อย่างไรก็ตามจากโครงสร้างทางเคมีที่พบในภาพที่ 2.2-2.4 สารประกอบบางชนิดอาจถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า ไกลโคไซด์ (glycoside) สารกลุ่มนี้โครงสร้างทางเคมีแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาลเรียกว่า ไกลโคน (glycone) กับส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลเรียกว่า อะไกลโคน (aglycone) ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลมีโครงสร้างแตกต่างกันไปหลายประเภท เช่น เทอร์พีนอยด์ (พบใน Colebrin C) หรือ ฟลาโวนอยด์ (พบใน Cynaroside) เป็นต้น นอกจากนี้ไกลโคไซด์ยังแบ่งเป็นหลายประเภทขึ้นอยู่กับอะตอมที่เชื่อมต่อระหว่างส่วนอะไกลโคนและไกลโคน โดยส่วนใหญ่อะตอมที่เชื่อมต่อจะเป็นออกซิเจน (oxygen, O) จะเรียกว่าไกลโคไซด์หรือ O-ไกลโคไซด์ แต่ถ้าหากอะตอมที่เชื่อมต่อเป็น ซัลเฟอร์ (sulphur, S) ไนโตรเจน (nitrogen, N) คาร์บอน (carbon, C) จะเรียกว่า ไธโอไกลโคไซด์ (thioglycoside) N-ไกลโคไซด์ (N-glycoside) และ C-ไกลโคไซด์ (C-glycoside) ตามลำดับ (ภาพที่ 2.5) ดังนั้นฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบในกลุ่มนี้จึงมีได้กว้างขวางแตกต่างกันออกไป ส่วนที่เป็นน้ำตาลไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา แต่เป็นส่วนช่วยทำให้การละลายและการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายดีขึ้น ไกลโคไซด์กลุ่ม O-ไกลโคไซด์สามารถตัดน้ำตาลออกจากโมเลกุลได้ด้วยปฏิกิริยาการย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีและตัวอย่างไกลโคไซด์

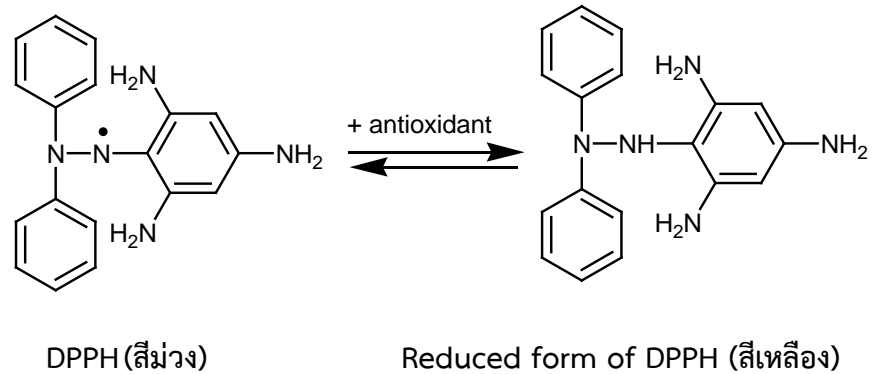
สารในกลุ่ม O-ไกลโคไซด์สามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรด (acid hydrolysis) แยกส่วนไกลโคน และอะไกลโคนออกจากกันได้ เช่น การไฮโดรไลซ์ Cynaroside ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรดของ O-ไกลโคไซด์

## 2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

อนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical, DPPH) มีคุณสมบัติที่โดดเด่นคือเป็นอนุมูลอิสระชนิด organic nitrogen radical ที่มีความคงตัวและสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง UV-Vis ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH เกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือได้รับอิเล็กตรอนจะมีการเปลี่ยนสีคือสีม่วงเข้มของ DPPH<sup>•</sup> จะจางลงเป็นสีเหลือง ซึ่งความเร็วในการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นนี้สามารถได้นำมาใช้เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดได้ ปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูล DPPH<sup>•</sup> แสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กลไกการต้านอนุมูล DPPH ของสารต้านออกซิเดชัน

## 2.5 การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเป็นวิธีการประเมินฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสารสกัดจากพืชในหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อดูผลบวก (positive test) หรือผลลบ (negative test) ซึ่งจะขอกกล่าวถึงเฉพาะการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ต่อเซลล์ และการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ดังนี้

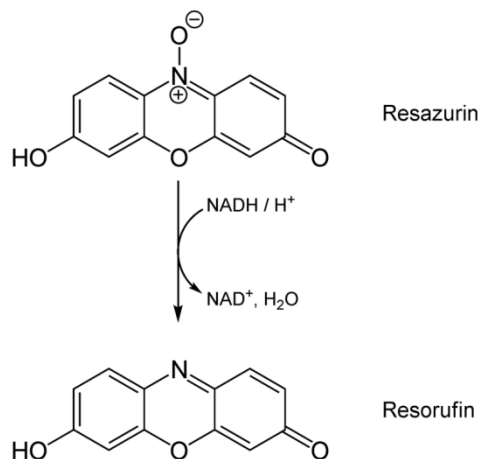


### 2.5.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นการประเมินความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของ cell line ในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence method) ของสีย้อมเซลล์ที่เรียกว่า Resazurin Microplate Assay (REMA) หรือการวัดโปรตีนเรืองแสงสีเขียว Green Fluorescent Protein (GFP) อย่างใดอย่างหนึ่ง ความเข้มของการเรืองแสงจะสัมพันธ์กับปริมาณของเซลล์ที่เหลือรอดอยู่ ซึ่งปัจจุบันศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติมีการให้บริการดังนี้

#### 2.5.1.1 Resazurin Microplate Assay (REMA)

Resazurin มีชื่อว่า 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide เป็นสีย้อมที่มีสีน้ำเงินอมเทาสามารถถูกรีดิวซ์ได้ด้วย NADPH dehydrogenase or NADH dehydrogenase ซึ่งพบในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต เปลี่ยน resazurin ให้กลายเป็น resorufin ซึ่งมีสีชมพูและวาวแสง (fluorescence) ได้ ดังภาพที่ 2.8 ปริมาณการวาวแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่



ภาพที่ 2.8 การรีดิวซ์ resazurin ให้เป็น resorufin โดยเซลล์ที่มีชีวิต

เทคนิค REMA จะทดสอบกับ cell line ดังต่อไปนี้

- เซลล์มะเร็งช่องปาก KB (human oral cavity carcinoma)
- เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (human breast carcinoma)
- เซลล์มะเร็งปอด NCI-187 (human small cell lung carcinoma)
- เซลล์มะเร็งตับของหนู HepG2 (human hepatocyte carcinoma)
- เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนู Caco-2 (human colon carcinoma)
- เซลล์มะเร็งผิวหนังของหนู B16-F10 (mouse melanoma)
- เซลล์ปกติจากเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังของหนู L929 (mouse subcutaneous connective tissue)
- เซลล์จากไตของหนู BHK21 (baby hamster kidney fibroblast)

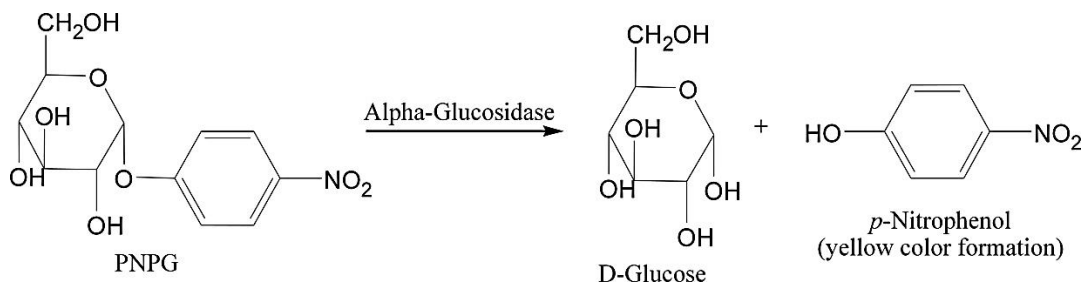
### 2.5.1.2 Green Fluorescence Protein (GFP)

GFP เป็นโปรตีนที่สามารถวางแสงสีเขียว เมื่อโปรตีนถูกทำลายด้วยสารสกัดการวางแสงจะลดลง ปริมาณการวางแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ เทคนิคนี้จะทดสอบกับ cell line เพียง 1 ชนิด คือ

เซลล์ปกติจากไตของลิง Vero (African green monkey kidney)

### 2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ( $\alpha$ -glucosidase) เป็นเอนไซม์ที่พบมากที่ผนังเซลล์ของลำไส้เล็ก มีหน้าที่ย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะช่วยลดการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด และช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดลงได้ เอนไซม์ชนิดนี้จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งของการศึกษาวิจัยเพื่อหาทางป้องกันรักษาโรค เช่น โรคอ้วนลงพุง หรือโรคเบาหวาน เป็นต้น เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมี 3 ชนิด คือ อะไมเลส (amylase) มอลเทส (maltase) และซูเครส (sucrose) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะใช้สารตั้งต้น (substrate) เป็น *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -glucopyranoside (PNPG) เมื่อมีเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นกลายเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองและน้ำตาลกลูโคส (ภาพที่ 2.9) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ถ้าการทดลองให้ค่าการดูดกลืนแสงมาก แสดงว่าเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ถ้าการทดลองให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อย แสดงว่าเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสไม่สามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติ นั่นคือเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารสกัดที่ทดสอบ (Zhang et al., 2015)



ภาพที่ 2.9 การไฮโดรไลซ์ PNPG เป็น *p*-nitrophenol ด้วยเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

เนื่องจากข้อดีเป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้เพื่อระงับอาการเจ็บป่วยต่างๆ อย่างหลากหลาย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำงานวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากข่อยดำ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และแยกองค์ประกอบทางเคมีที่จากสารสกัดใบข่อยดำ

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุและสารเคมี

สารเคมี	เกรดหรือความบริสุทธิ์	บริษัทผู้ผลิต
Hexane	Analytical	Merck
Ethyl acetate	Analytical	Merck
Ethanol	Analytical	Merck
Butanol	Analytical	Merck
Cesium sulphate	Analytical	Merck
conc. Sulfuric acid	Analytical	Merck
Silica gel 60		Merck
PLC F <sub>254</sub>		Merck
Lichroprep RP-18		Merck

#### 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Rotary evaporator ประกอบด้วย <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rotavapor รุ่น R-124</li> <li>- Vacuum รุ่น B-169</li> <li>- Cooling รุ่น RTE-11</li> <li>- Heater รุ่น B-480</li> </ul>	Buchi Buchi Buchi Buchi
NMR : 400 MHz	Bruker Avance
เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ รุ่น AG204	Mettler-Toledo GmbH
คอลัมน์โครมาโทกราฟี	
ตู้อบลมร้อน	
ตู้ดูดควัน	
แผ่นร้อน (hot plate)	
โครมาโทกราฟีแผ่นบาง	
เครื่องแก้ว	

### 3.3 พืชตัวอย่าง

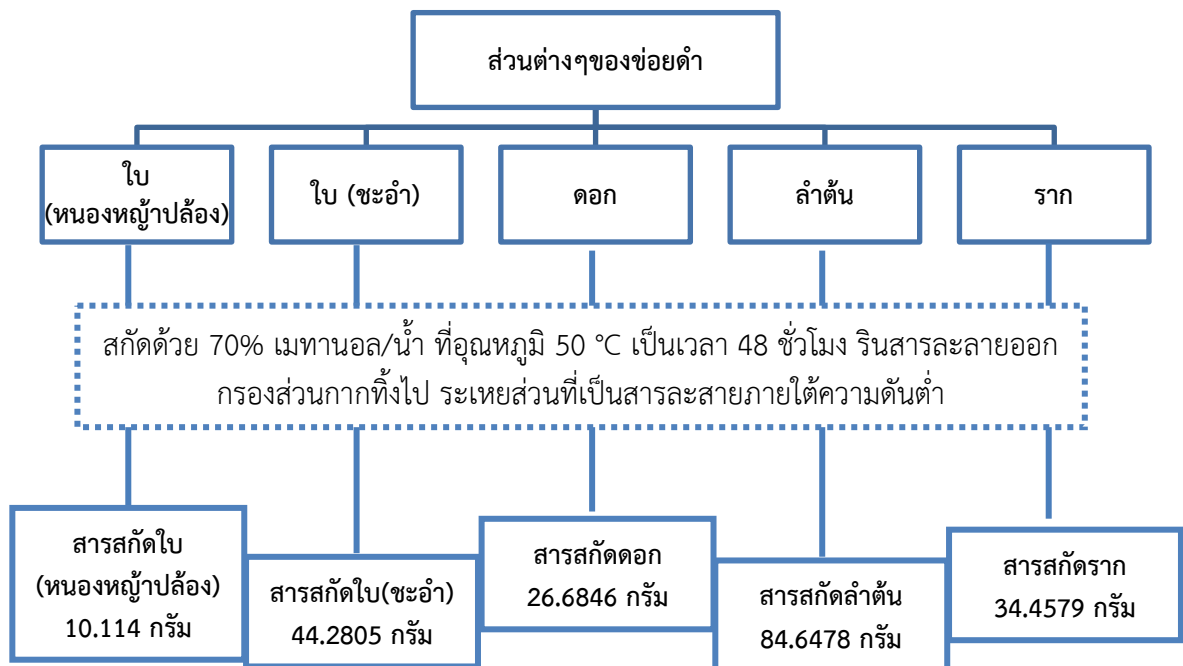
ใบช่อดำที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจาก 2 พันธุ์คือ

1. อำเภอหนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี
2. อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

เนื่องจากที่อำเภอชะอำพบต้นช่อดำค่อนข้างมาก จึงได้นำส่วนดอก ลำต้น และราก มาทำการทดลองด้วย เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของส่วนต่างๆ จากช่อดำ

### 3.4 การเตรียมสารสกัดช่อดำ

นำส่วนต่างๆ ของช่อดำแห้งที่บดละเอียดแล้ว ดังนี้ ใบ(หนองหญ้าปล้อง) 190 กรัม ใบ(ชะอำ) 535 กรัม ดอก 120 กรัม ลำต้น 1655 กรัม และราก 470 กรัม มาสกัดด้วย 70% เมทานอล/น้ำ (70% MeOH/H<sub>2</sub>O) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รินสารละลายออกแล้วกรองส่วนกากทิ้งไป ระเหยส่วนที่เป็นสารละลายภายใต้ความดันต่ำ ได้สารสกัดหยาบส่วน ใบ ดอก ลำต้น และราก ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 การสกัดส่วนต่างๆของช่อดำด้วย 70% เมทานอล/น้ำ

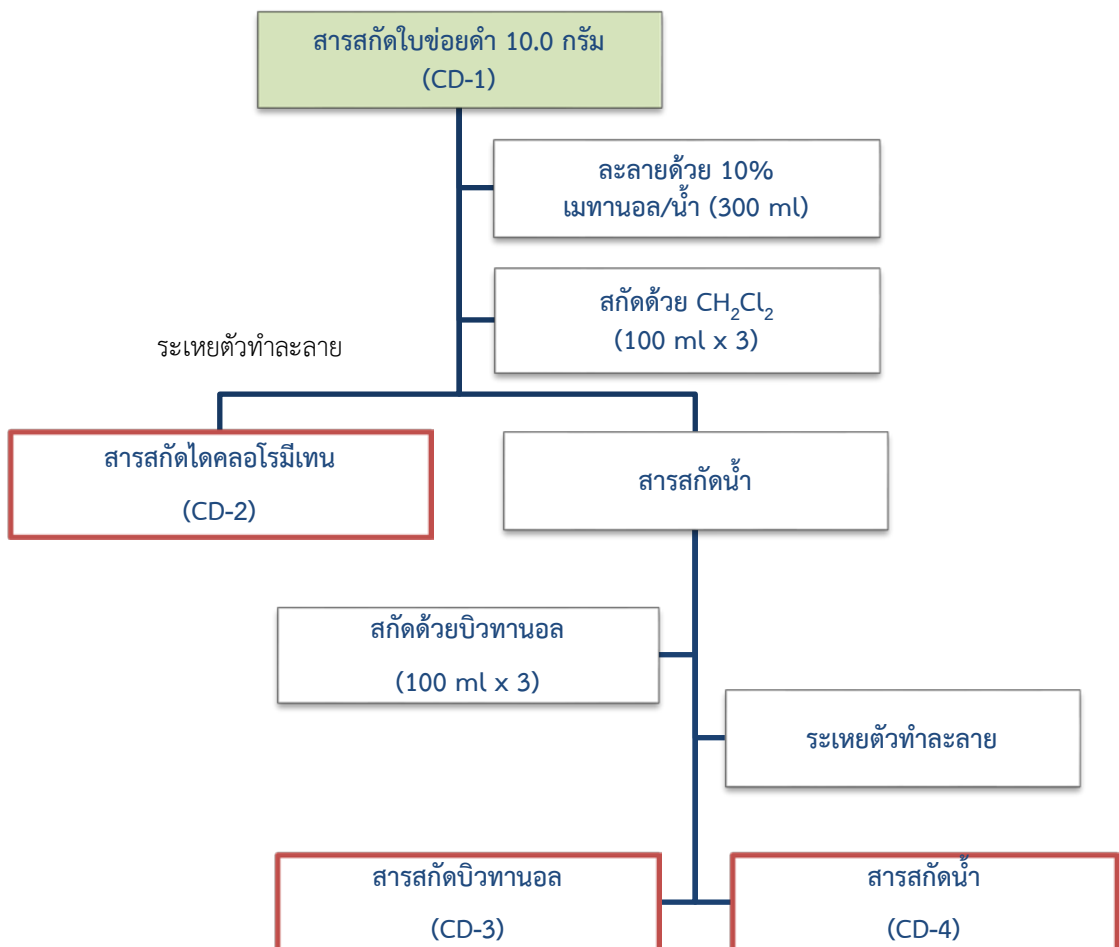
### 3.5 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดช่อดำ

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจาก ใบ(หนองหญ้าปล้อง) ใบ(ชะอำ) ดอก ลำต้น และราก ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (thin layer chromatography, TLC) โดยใช้ระบบ

ตัวทำละลายชนิดต่างๆ แล้วตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, uv) ที่ความยาวคลื่น 254 nm และย้อมสีด้วย anisaldehyde reagent ที่อุณหภูมิ 100°

### 3.6 การทำ partition สารสกัดใบช่อยคำ

การทำ partition เป็นการแยกสารสกัดใบช่อยคำออกเป็นส่วนๆตามความมีขั้วของตัวทำละลาย โดยนำสารสกัดใบช่อยคำ (CD-1) ประมาณ 10.0 กรัม ละลายด้วย 10% เมทานอล/น้ำ 300 mL แล้วสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันจากขั้วสูงไปต่ำ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) และบิวทานอล (butanol, BuOH) ตามลำดับ เมื่อระเหยตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ สารสกัดไดคลอโรมีเทน เรียกว่า CD-2 สารสกัดบิวทานอล เรียกว่า CD-3 และสารสกัดน้ำ เรียกว่า CD-4 ระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ บันทึกลักษณะและน้ำหนักของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดที่ได้ ดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการทำ partition สารสกัดใบช่อยคำ

### 3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบช่อดำ

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาประกอบด้วย การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ และการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ( $\alpha$ -glucosidase) มีรายละเอียดดังนี้

#### 3.7.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น ใช้สารตัวอย่างเป็นสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของช่อดำ ได้แก่ สารสกัดใบ ดอก ลำต้น และราก การทดสอบนี้ใช้ 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดริล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) เนื่องจาก DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรชนิดหนึ่งซึ่งใช้รีเอเจนต์ที่ใช้ทดสอบสารต้านออกซิเดชันจากสิ่งสกัดและสารที่แยกได้จากพืช ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และง่ายต่อการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียม DPPH และการทดสอบ DPPH ดังนี้

##### 3.7.1.1 การเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์

ชั่ง DPPH ประมาณ 0.0019 กรัม ละลายในเมทานอล แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

##### 3.7.1.2 วิธีทดลอง

นำแผ่น TLC มาจุดตัวอย่างลงไปแล้วเป่าด้วยไดร์เป่าผมให้แห้งแล้วจุดซ้ำกันประมาณ 3 ครั้ง จากนั้นนำแผ่น TLC ใส่ลงในภาชนะที่อิมมัวด้วยไอของเมทานอลทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปตามแผ่น TLC ประมาณ 5-10 นาที แล้วนำแผ่น TLC ไปสเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ให้ทั่ว สังเกตปฏิกิริยาการฟอกจางสีม่วงของ DPPH บนแผ่น TLC ซึ่งจะปรากฏเป็นวงสีขาวขึ้นบริเวณที่มีการฟอกจางสี

#### 3.7.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

นำสารสกัดใบช่อดำ (CD-1) และสารสกัดใบช่อดำที่ได้จากการทำ partition แล้ว (CD-2 CD-3 และ CD-4) ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ประกอบด้วย การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (human breast adenocarcinoma) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 (human small cell lung carcinoma) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับของคน HepG2 (human hepatocarcinoma) ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Enterococcus faecium*) และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (*Pseudomonas aeruginosa* (PAO1))

#### 3.7.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

ในการทดสอบนี้ได้ส่งสาร CD-3 และ CD-4 ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยทดสอบกับเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟาไกลูโคซิเดส 2 ชนิด คือ ซูเครส และมอลเทส ที่ภาควิชาเคมีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้สารมาตรฐานเป็น Acarbose ซึ่งเป็นยารักษาเบาหวาน ชนิดที่ 2 ในปัจจุบัน

### 3.8 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบช่อดำ

#### 3.8.1 การแยกสารสกัด CD-2

นำสารสกัดไดคลอโรมีเทน (CD-2) น้ำหนักประมาณ 1.30 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography, CC) ใช้ silica gel 60 (0.063-0.200 มิลลิเมตร) 80 กรัม บรรจุลงในคอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 cm ซะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเบนซีน (benzene), เบนซีน/ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate, EtOAc), และเมทานอล (methanol, MeOH) ตามลำดับ

#### 3.8.2 การแยกสาร CD-2-2

นำสารสกัด CD-2-CC-2 น้ำหนัก 0.0443 กรัม มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative layer chromatography (PLC) ใช้ silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck, layer thickness, 0.25 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลายเป็นไดคลอโรมีเทน/เอทิลอะซิเตต 10/1

#### 3.8.3 การแยกสาร CD-2-4

นำสารสกัด CD-2-CC-4 น้ำหนัก 0.1422 กรัม มาตกผลึกโดยละลายในเมทานอลร้อน แล้วค่อยๆ หยดน้ำจนสารละลายขุ่น นำไปให้ความร้อนจนสารละลายใส ปล่อยให้ตกผลึก กรองผลึก แล้วตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วย TLC

#### 3.8.4 การแยกสารสกัด CD-3 ด้วย PLC

นำสารสกัด CD-3 ประมาณ 30 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative layer chromatography (PLC) จำนวน 2 แผ่นใช้ silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck, layer thickness, 0.25 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลายเป็นบิวทานอล/กรดแกลเซียลอะซิติก/น้ำ (BuOH/glacial acetic acid/H<sub>2</sub>O 7:2.5:2.5 v/v/v) 1 ชนิด คือ CD-3-PLC-1 ส่งวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

#### 3.8.5 การแยกสารสกัด CD-3 ด้วย CC

นำสารสกัด CD-3 ประมาณ 0.9 กรัม มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel 60 (0.063-0.200 มิลลิเมตร) 90 ml บรรจุในคอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร ซะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตต/เมทานอล และเมทานอล ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งใช้ตัวทำละลายชะครั้งละ 50 มิลลิลิตร นำไประเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC แล้วรวม fraction ที่มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันเข้าด้วยกัน

#### 3.8.6 การแยกสารสกัด CD-1

นำสารสกัด CD-1 40.0 กรัม มาแยกด้วย flash column chromatography ใช้ silica gel 60 (0.063-0.200 มิลลิเมตร) บรรจุลงในคอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร สูง 5

เซนติเมตร ชะคอสมันต์ด้วย เฮกเซน, เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน/เอทิลอะซีเตต, เอทิลอะซีเตต, เอทิลอะซีเตต/เมทานอล และ เมทานอล ตามลำดับ เก็บสารละลาย fraction ละ 100 ml นำไปประเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำ ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของแต่ละ fraction ด้วย TLC จากนั้นรวม fraction ที่มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกันเข้าด้วยกัน

### 3.8.7 การแยกสารสกัด CD-1-2

นำสารสกัด CD-1-2 1.0 กรัมมาแยกต่อด้วยคอสมันต์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel 60 (0.063-0.200 มิลลิเมตร) 100 กรัม บรรจุใน column เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ชะคอสมันต์ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตต/เมทานอล/น้ำในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 70/20/10, 60/20/10, 50/20/10 ใช้ตัวทำละลายชะครั้งละ 50 มิลลิลิตร นำไปประเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำ และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC

### 3.8.8 การแยกสารสกัด CD-1-2-1

นำสารสกัด CD-1-2-1 ประมาณ 100 มิลลิกรัม มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative layer chromatography (PLC) ใช้ silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck ,layer thickness, 0.25 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน/เมทานอล/กรดอะซีติก (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH) ในอัตราส่วน 5/1/0.5 ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ CD-1-2-1-1 ส่งวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

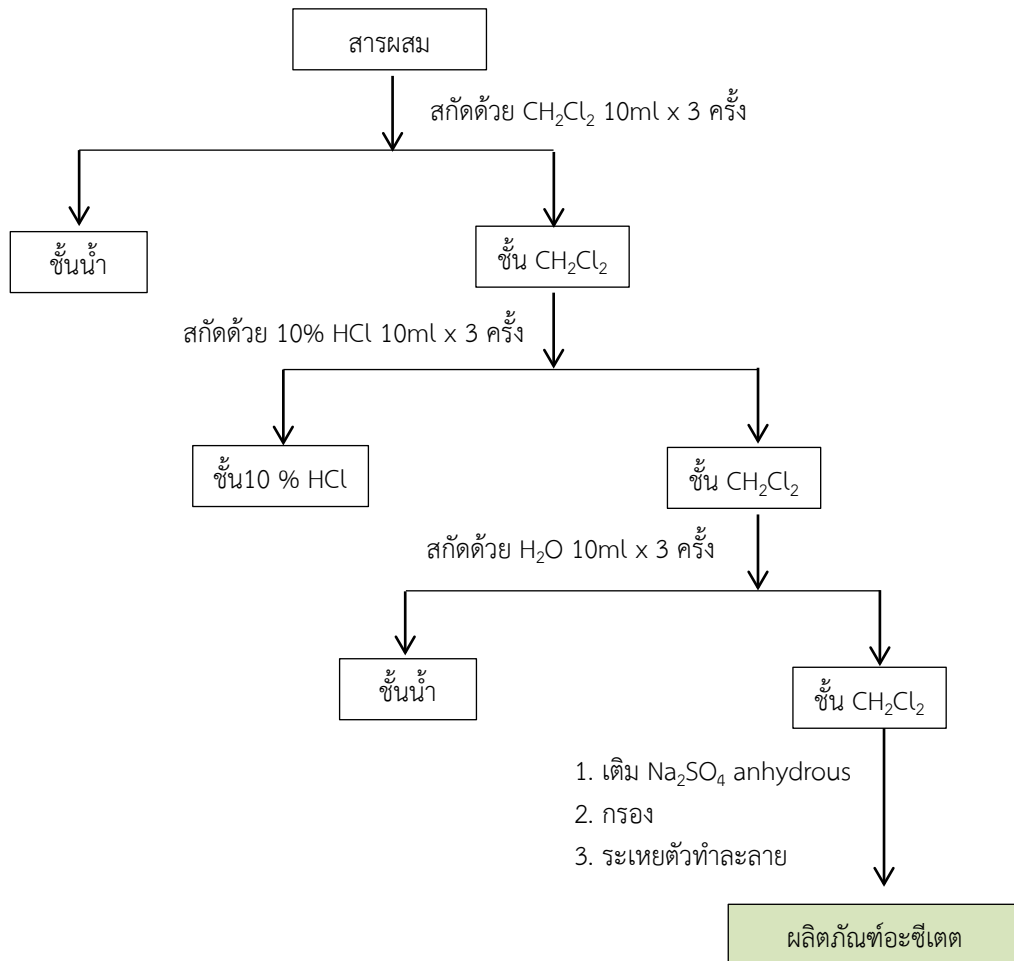
### 3.8.9 การแยกสารสกัด CD-1-2-3

นำสารสกัด CD-1-2-3 ประมาณ 100 มิลลิกรัม มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative layer chromatography (PLC) ใช้ silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Merck ,layer thickness, 0.25 มิลลิเมตร) ใช้ระบบตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน/กรดอะซีติก/น้ำ (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOH/H<sub>2</sub>O) ในอัตราส่วน 4/1/5 (ใช้สารละลายไล่ชั้นบน) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ CD-1-2-3-1 ส่งวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

### 3.8.10 การทำ acetylation ของ CD-1-2-1

นำสาร CD-1-2-1 20 มิลลิกรัม มาทำ acetylation มีจุดประสงค์เพื่อเปลี่ยนหมู่ hydroxyl (-OH) ที่คาดว่าอยู่ในโครงสร้างทางเคมีให้เป็นหมู่ acetate (-OCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) จะได้ผลิตภัณฑ์อะซีเตต (acetate compound) ซึ่งจะส่งผลให้การแยกองค์ประกอบทางเคมีดังกล่าวทำได้ง่ายขึ้นเพราะสารจะมีขั้วต่ำลง ทำได้โดยการเติม pyridine 0.5 มิลลิลิตร และเติม acetic anhydride 0.5 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 °C จากนั้นหยุดปฏิกิริยา แล้วสกัดสารผลิตภัณฑ์อะซีเตตที่เกิดขึ้นด้วย CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> และกำจัดน้ำออกจากผลิตภัณฑ์อะซีเตตด้วย Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydrous ตามภาพที่ 3.3





ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการสกัดผลิตภัณฑ์อะซีเตตของปฏิกิริยา acetylation

### 3.9 พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด (ประมาณ 10 มิลลิกรัม) ส่งวิเคราะห์ข้อมูล  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ด้วยเครื่อง NMR Bruker 400 MHz ที่ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดข่อยดำ มีผลการทดลองเป็นดังนี้

#### 4.1 ผลการเตรียมสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของข่อยดำ

จากการนำส่วนต่างๆ ของข่อยดำ ได้แก่ ใบจากอำเภอหนองหญ้าปล้องและชะอำ ดอก ลำต้น และ ราก ของข่อยดำมาทำให้แห้งโดยการผึ่งลม บดให้ละเอียด แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย 70% เมทานอล/น้ำ (MeOH/H<sub>2</sub>O) ได้สารสกัดดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักและลักษณะของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของข่อยดำ

ส่วนของพืช	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะของสาร
ใบ (ชะอำ)	44.2805	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
ใบ (หนองหญ้าปล้อง)	11.5504	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
ดอก	26.6846	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
ราก	34.4579	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
ลำต้น	84.6478	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

#### 4.2 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดข่อยดำ

การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของข่อยดำ ด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography (TLC) ด้วยระบบตัวทำละลาย CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O: 6/2/2 พบว่าใบจากทั้งอำเภอหนองหญ้าปล้อง (บ1) และใบจากชะอำ (บ2) มีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน คือมีจุดสารปรากฏขึ้นในตำแหน่งและสีเดียวกัน ซึ่งเป็นการพิสูจน์ได้ว่าใบข่อยดำจากทั้งสองอำเภอเป็นพืชชนิดเดียวกัน ในส่วนของสารสกัดจากดอก ราก และลำต้น จะมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกัน แต่ปริมาณอาจแตกต่างกัน ทั้งนี้ใบจะมีองค์ประกอบทางเคมีมากกว่าส่วนอื่นๆ ดังภาพที่ 4.1



- บ1 หมายถึง สารสกัดใบ(หนองหญ้าปล้อง)
- ด หมายถึง สารสกัดดอก
- บ2 หมายถึงสารสกัดใบ(ชะอำ)
- ล หมายถึงสารสกัดลำต้น
- ร หมายถึงสารสกัดราก

บ1 ด บ2 ล ร

ภาพที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากส่วนต่างๆของข่อยดำ

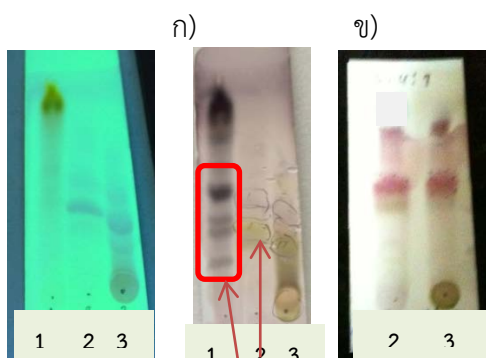
### 4.3 ผลการทำ partition สารสกัดใบช่อยดำ

ผลการทำ partition สารสกัดใบช่อยดำ (CD-1) น้ำหนักประมาณ 10.0 กรัม ได้สารสกัด 3 ส่วน คือ สารสกัดไดคลอโรมีเทน (CD-2) สารสกัดบิวทานอล (CD-3) และสารสกัดน้ำ (CD-4) พบว่าสารสกัดน้ำมีน้ำหนักมากที่สุด คือ 22.89 กรัม รองลงมาคือสารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดบิวทานอล คิดเป็นร้อยละ 17.61 13.08 และ 57.22 ตามลำดับ

#### ตารางที่ 4.2 น้ำหนักและลักษณะของสารสกัด CD-2 – CD-4

สารสกัด	สัญลักษณ์	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก	ลักษณะสาร
ไดคลอโรมีเทน	CD-2	7.045	17.61	ของเหลวหนืดสีเขียวดำ
บิวทานอล	CD-3	5.234	13.08	ของแข็งสีน้ำตาล
น้ำ	CD-4	22.890	57.22	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบสารแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ มีขั้วต่ำ พบในสารสกัดไดคลอโรมีเทน (หมายเลข 1 ภาพ 4.2 ข) เป็นสารที่ย้อมติดสีชมพู-ม่วง คาดว่าเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ หรือกรดไขมันที่พบในพืช กลุ่มที่ 2 เป็นสารกลุ่มขั้วสูงปานกลางซึ่งสามารถดูดกลืนรังสียูวีความยาวคลื่น 254 nm ได้เล็กน้อย (หมายเลข 2 ภาพ 4.2 ก) และย้อมติดสีเหลืองและสีเขียว (หมายเลข 2 ภาพ 4.2 ข) คาดว่าสารกลุ่มนี้จะมีโมเลกุลของน้ำตาลในโครงสร้าง คาดว่าเป็นกลุ่มไกลโคไซด์ และกลุ่มสุดท้ายเป็นสารขั้วสูงมากพบในสารสกัดน้ำ สารกลุ่มนี้ย้อมติดสีเขียวซีม้ (หมายเลข 3 ภาพ 4.2 ข) คาดว่าสารกลุ่มนี้เป็นน้ำตาลและสารกลุ่มไกลโคไซด์ขั้วสูง จากองค์ประกอบทางเคมีที่ปรากฏบนแผ่น TLC กลุ่มสารที่น่าจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาน่าจะอยู่ในสารสกัดไดคลอโรมีเทน(1) และบิวทานอล(2) ผู้วิจัยจึงทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดทั้งสองต่อไป



ย้อมติดสีชมพู-ม่วงแล้ว เปลี่ยนเป็นสีเทา-ดำ

- 1 หมายถึง สารสกัดไดคลอโรมีเทน
- 2 หมายถึง สารสกัดบิวทานอล
- 3 หมายถึง สารสกัดน้ำ

#### ภาพที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไดคลอโรมีเทน บิวทานอล และน้ำ

ก) ฉายด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm ข) ย้อมด้วย anisaldehyde reagent

#### 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดข่อยดำ

##### 4.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเบื้องต้น โดยอาศัยคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาฟอกจางสีของอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดจากใบจากทั้งจากอำเภอนองหญ้าปล้อง (บ1) และชะอำ (บ2) ฟอกจางสีอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ ลำต้น ราก และดอก ตามลำดับ โดยพิจารณาจากเวลาที่ใช้ในการฟอกจางสีม่วงของ DPPH จนปรากฏเป็นสีขาวบนแผ่น TLC ดังภาพที่ 4.3



บ1 ด บ2 ล ร

- บ1 หมายถึง สารสกัดใบ(นองหญ้าปล้อง)
- ด หมายถึง สารสกัดดอก
- บ2 หมายถึงสารสกัดใบ(ชะอำ)
- ล หมายถึงสารสกัดลำต้น
- ร หมายถึงสารสกัดราก

ภาพที่ 4.3 การฟอกจางสีของ DPPH

##### 4.4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ผลจากการนำสารสกัด CD-1 CD-2 CD-3 และ CD-4 ส่งตรวจฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติจากไตของลิง (Vero cell) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับของคน (HepG2) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*E. faecium*) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa*) ได้ผลดังตารางที่ 4.3 ปรากฏว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ทุกชนิดที่ทำการทดสอบ

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

สาร	Vero cell	HepG2	NCI-H187	MCF-7	<i>E.faecium</i>	<i>P.aeruginosa</i>
CD-1	-	-	-	-	-	-
CD-2	-	-	-	-	-	-
CD-3	-	-	-	-	-	-
CD-4	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + = cytotoxic หรือ active  
- = Non-cytotoxic หรือ Inactive

#### 4.4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะทำการทดสอบกับเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ซูเครส และมอลเทส ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือกลูโคส และในการทดสอบใช้สารสกัดเพียง 2 ชนิด คือ สารสกัดบิวทานอล ( CD-3) และสารสกัดน้ำ (CD-4)

##### 4.4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ซูเครส

จากการทดสอบได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ 0.3125 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ซูเครส ของสาร CD-3 และ CD-4 มีค่าเท่ากับ 12.32 และ 8.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อสารสกัดไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ซูเครสได้เกิน 50% จึงไม่สามารถทำการทดลองหาค่า  $IC_{50}$  ได้

#### ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ซูเครส

ความเข้มข้น (mg/ml)	% การยับยั้งซูเครส	
	CD-3	CD-4
0.0025	1.53	1.55
0.0125	1.37	1.42
0.0625	3.17	2.03
0.3125	12.32	8.40

##### 4.4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มอลเทส

จากการทดสอบได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ 0.3125 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์มอลเทสของสาร DC-3 และ CD-4 มีค่าเท่ากับ 39.08 และ 24.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส สารสกัดไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์มอลเทสได้เกิน 50% จึงไม่สามารถทำการทดลองหาค่า  $IC_{50}$  ได้

#### ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มอลเทส

ความเข้มข้น (mg/ml)	% การยับยั้งมอลเทส	
	CD-3	CD-4
0.0025	5.00	-1.11
0.0125	3.21	-3.23
0.0625	10.97	1.00
0.3125	39.08	24.08

## 4.5 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบช่อดำ

### 4.5.1 ผลการแยกสารสกัด CD-2

จากการนำสารสกัดไดคลอโรมีเทน (CD-2) 1.30 กรัม มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เบนซีน, เบนซีน/ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต และ เมทานอล ในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งใช้ตัวทำละลายชะครั้งละ 50 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 20 fraction ย่อย ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วย TLC ดังภาพ 4.4 รวม fraction ที่มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกันได้ดังตารางที่ 4.6

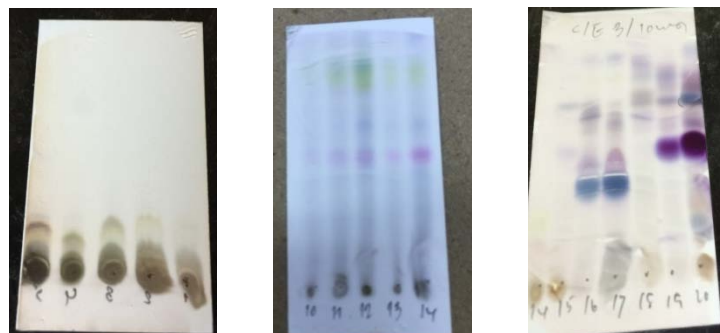
ตารางที่ 4.6 ลักษณะและน้ำหนักของสารที่แยกจาก CD-2 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

Fractions NO.	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะ
CD-2-1	1-2	0.0159	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน
CD-2-2	6-8	0.0443	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน
CD-2-3	12-14	0.0378	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน
CD-2-4	16-17	0.1422	ของแข็งสีขาวปนน้ำตาลอ่อน
CD-2-5	19-20	0.0399	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ

ก



ข

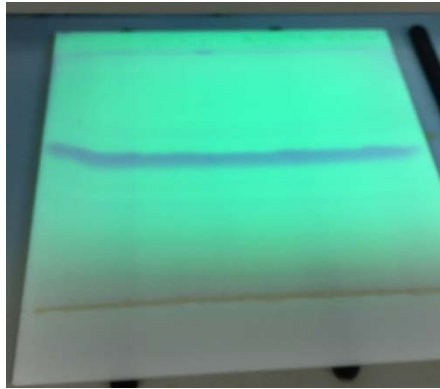


ภาพที่ 4.4 องค์ประกอบทางเคมีจากการแยกสารสกัด CD-2

ก) ฉายแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm ข) ย้อมด้วย anisaldehyde reagent

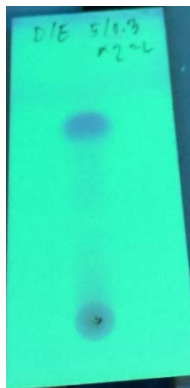
#### 4.5.2 ผลการแยกสารสกัด CD-2-2

จากการตรวจสอบ TLC ดังปรากฏในภาพที่ 4.4 พบว่า สารสกัด CD-2-2 มีองค์ประกอบที่น่าสนใจคือ องค์ประกอบที่สามารถดูดกลืนรังสี UV ได้ และสามารถย้อมติดสีชมพู ผู้วิจัยจึงได้แยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วย PLC (ภาพ 4.5) ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ CD-2-2-1 มีลักษณะเป็น wax สีเหลืองอ่อน 15.1 มิลลิกรัม และตรวจสอบองค์ประกอบด้วย TLC พบว่ามีองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว (ภาพ 4.6) คาดว่าน่าจะเป็นสารบริสุทธิ์ แต่เมื่อมาตรวจสอบ TLC ซ้ำอีกครั้งหนึ่งหลังจากตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 เดือนปรากฏว่าสารบริสุทธิ์ดังกล่าวไม่ปรากฏบน TLC และเมื่อชั่งน้ำหนักปรากฏว่า ไม่มีน้ำหนัก ผู้วิจัยคาดว่าสารดังกล่าวน่าจะสลายตัวไป

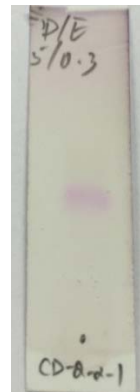


ภาพ 4.5 การแยก CD-2-2 ด้วย PLC

ก



ข



ภาพ 4.6 องค์ประกอบทางเคมีของ CD-2-2-1

#### 4.5.3 ผลการแยกสารสกัด CD-2-4

จากการแยกสารสกัด CD-2-4 0.1422 กรัม มาตกผลึกโดยละลายใน MeOH ร้อน พบว่าได้ของแข็งสีขาว กรองของแข็ง แล้วตรวจสอบ TLC ปรากฏว่าไม่พบองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจ จึงไม่ได้ส่งวิเคราะห์ข้อมูล NMR



ภาพ 4.7 ของแข็งสีขาวและองค์ประกอบทางเคมีของ CD-2-4

#### 4.5.4 ผลการแยกสารสกัด CD-3 ด้วย PLC

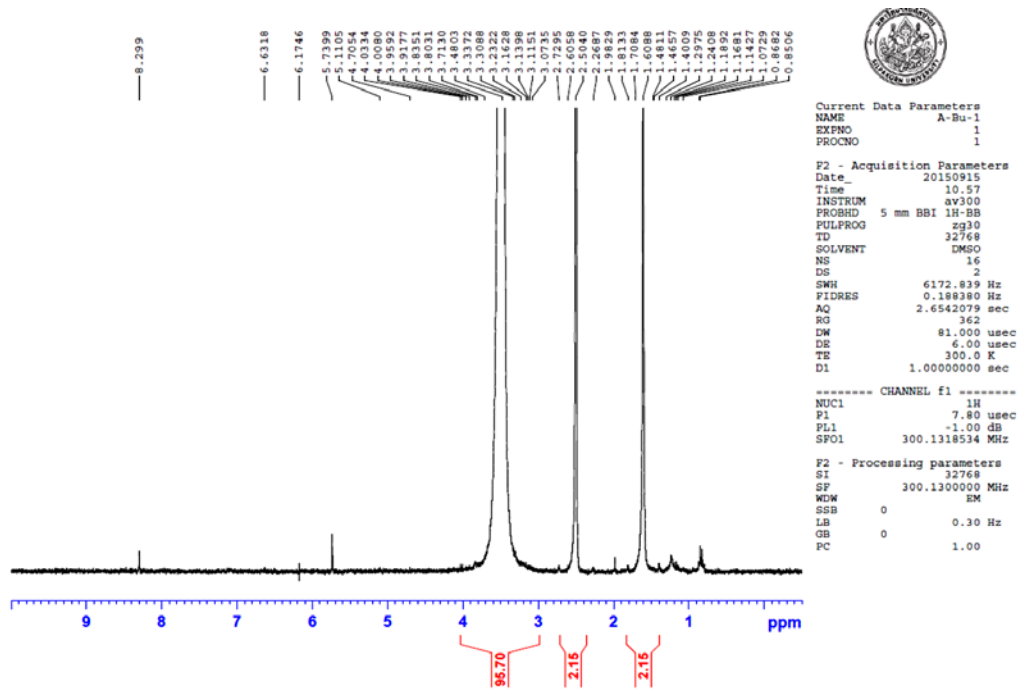
ผลจากการนำสารสกัด CD-3 30 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PLC ได้สารสกัด CD-3-PLC-1 12.1 มิลลิกรัม เป็น wax สีเหลืองเข้ม ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วย TLC พบว่าสารดังกล่าวไม่ดูดกลืนรังสี UV ย้อมติดสีเหลืองดังภาพ 4.8



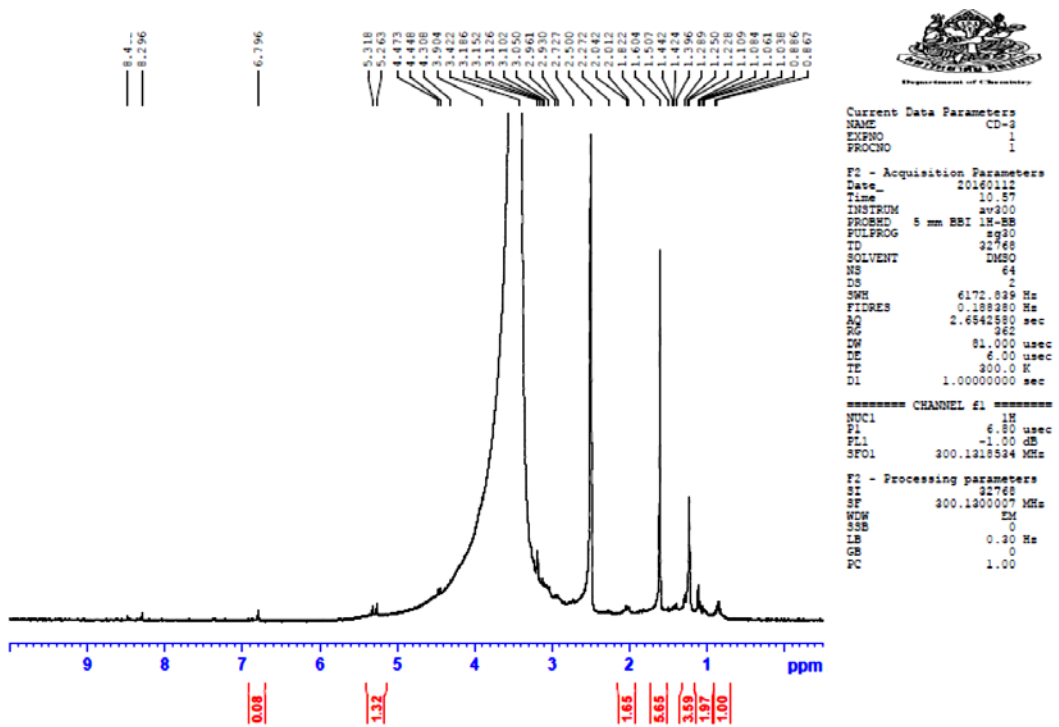
ภาพที่ 4.8 องค์ประกอบทางเคมีของ CD-3-PLC-1

ผู้วิจัยส่งสารดังกล่าว 8.25 มิลลิกรัม เพื่อวิเคราะห์โปรตอน NMR สเปกตรัมโปรตอน NMR ของสาร CD-3-PLC-1 ปรากฏดังภาพ 4.9 ซึ่งไม่ปรากฏพีก (peak) ที่สามารถระบุได้ว่าสารดังกล่าวเป็นสารกลุ่มใด ทั้งนี้ใช้ตัวทำละลายในการวิเคราะห์เป็น DMSO





ภาพที่ 4.9 โปรตอน NMR ของ CD-3-PLC-1 ครั้งที่ 1



ภาพที่ 4.10 โปรตอน NMR ของ CD-3-PLC-1 ครั้งที่ 2

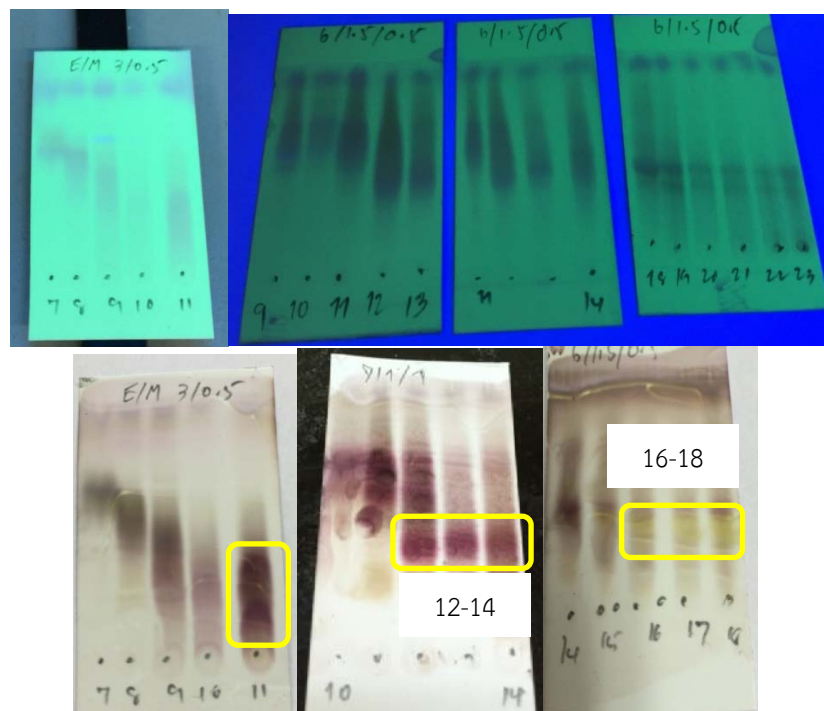
ผู้วิจัยจึงได้ทำการแยกสาร CD-3 ด้วย PLC ซ้ำ โดยนำสารสกัด CD-3 60 มิลลิกรัมมาแยกด้วย PLC 2 แผ่น แล้วส่งสาร CD-3-PLC-1 ที่แยกได้ 19.1 มิลลิกรัม ไปวิเคราะห์ใหม่อีกครั้งหนึ่งพบว่า สเปกตรัมโปรตอน NMR ปรากฏสัญญาณชัดเจนกว่าครั้งแรกเล็กน้อย ดังปรากฏในภาพ 4.10 อย่างไรก็ตาม ข้อมูลโปรตอน NMR ของสาร CD-3-PLC-1 ยังคงคล้ายๆ เดิม กล่าวคือปรากฏพีคอยู่ในช่วงของค่า chemical shift ต่ำว่า 1 ถึง 4.5 ซึ่งคาดว่าสัญญาณดังกล่าวเป็นของ methyl (-CH<sub>3</sub>) และอาจมี methylene (-CH<sub>2</sub>) และ methine (-CH) proton แต่สัญญาณไม่ชัดเจนนัก

#### 4.5.5 ผลการแยกสารสกัด CD-3 ด้วย CC

ผลการแยกสารสกัด CD-3 0.9 กรัม ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารทั้งหมด 23 fraction ย่อย รวม fraction ย่อยที่มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกัน ได้ผลดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ลักษณะและน้ำหนักของสารแยกได้จาก CD-3 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

Fractions NO.	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะ
CD-3-CC-1	11	0.0884	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน
CD-3-CC-2	12-14	0.204	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน
CD-3-CC-3	16-18	0.113	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน



ภาพที่ 4.11 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกจาก CD-3 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารทั้งหมด 23 fraction ย่อย พบว่ามีองค์ประกอบที่น่าสนใจคือ สารที่ย้อมติดสีชมพู-ม่วง และสารที่ย้อมติดสีเหลือง (ภาพที่ 4.11) แต่เนื่องจากน้ำหนักของสารสกัดที่แยกได้น้อยมาก การจะแยกต่อไปให้บริสุทธิ์จึงทำได้ยาก ผู้วิจัยจึงได้นำสารสกัด CD-1 ที่เหลืออยู่มาแยกใหม่ โดยไม่ทำ partition เพื่อป้องกันสารอาจสลายตัวได้

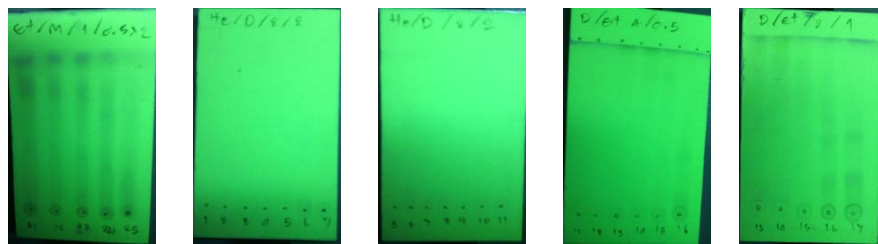
#### 4.5.6 การแยกสารสกัด CD-1 ด้วย CC

ผลการแยกสารสกัด CD-1 น้ำหนัก 40.0 กรัมด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารสกัดทั้งหมด 31 fraction ย่อย รวมสารสกัดใน fraction ที่คล้ายกัน ได้ผลดังตารางที่ 4.8

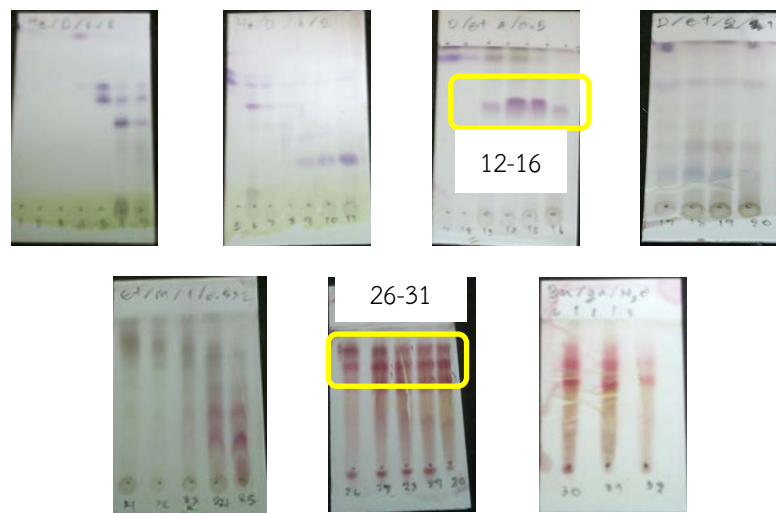
ตารางที่ 4.8 ลักษณะและน้ำหนักของสารแยกได้จาก CD-1 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

Fractions NO.	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะ
CD-1-1	12-16	2.119	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน
CD-1-2	26-31	12.012	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน

ก



ข



ภาพที่ 4.12 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จาก CD-1 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

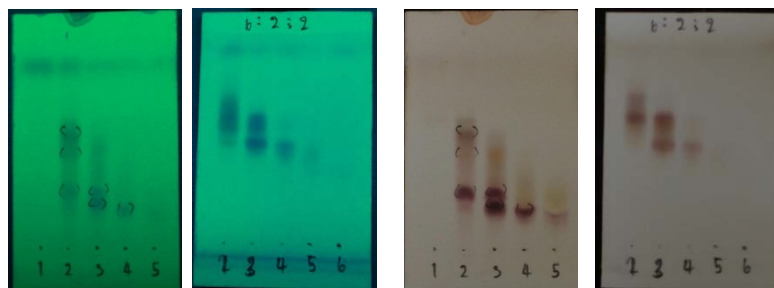
จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของทั้ง 31 fraction ที่แยกได้ พบว่า องค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ไม่ดูดกลืนรังสียูวี หรือดูดกลืนได้เล็กน้อย (สังเกตจากจุดดำที่ปรากฏบนแผ่น TLC ภาพ 4.12 ก) ทำให้คาดเดาได้ว่าโครงสร้างขององค์ประกอบดังกล่าวน่าจะไม่มีพันธะคู่ หรืออาจกล่าวได้ว่าโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบในใบช่อดำประกอบไปด้วยโครงสร้างที่มีความอิ่มตัวเป็นส่วนใหญ่ และในภาพ 4.12 ข ซึ่งเกิดจากการนำแผ่น TLC ในภาพ 4.12 ก ไปย้อมด้วย anisaldehyde reagent ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดปรากฏเป็นสีบนแผ่น TLC พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่ติดสีม่วง-ชมพู ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ หรือสเตียรอยด์ และองค์ประกอบบางชนิดใน fraction 26-31 จะมีขั้วค่อนข้างสูง จึงคาดได้ว่าเป็นโครงสร้างที่อาจต่ออยู่กับน้ำตาลที่เรียกว่าไกลโคไซด์ และคาดว่าองค์ประกอบที่ย้อมติดสีชมพู-ม่วงใน fraction 26-31 เป็นองค์ประกอบทางเคมีหลักในสารสกัดใบช่อดำ

#### 4.5.7 ผลการแยกสารสกัด CD-1-2

นำสารสกัด CD-1-2 ประมาณ 1 กรัม มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย EtOAc, EtOAc/MeOH ในอัตราส่วนต่างๆ ใช้ตัวทำละลายชะครั้งละ 50 มิลลิลิตร ได้สารทั้งหมด 28 fraction ย่อย รวม fraction ที่มีองค์ประกอบทางเคมีเข้าด้วยกัน ได้สารสกัด 3 fraction ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ลักษณะและน้ำหนักของสารแยกได้จาก CD-1-2

Fractions NO.	จาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะ
CD-1-2-1	2	158.6	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
CD-1-2-2	3	132.0	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
CD-1-2-3	4	157.6	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน

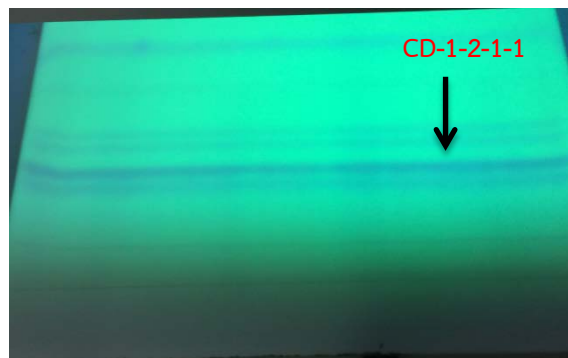


ภาพที่ 4.13 องค์ประกอบทางเคมีแยกได้จาก CD-1-2 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

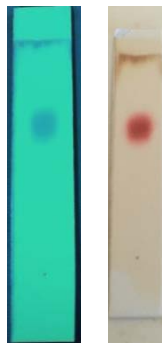
การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วย TLC พบว่าสารที่ย้อมติดสีชมพูที่เป็นองค์ประกอบหลักปรากฏอยู่ใน fraction ย่อย หมายเลข 2 3 และ 4 (ภาพ 4.13) ผู้วิจัยจึงได้ทำการแยก CD-1-2-1 และ CD-1-2-3 ต่อ เพื่อเอาสารที่ย้อมติดสีชมพูทั้งสองชนิด

#### 4.5.8 ผลการแยกสารสกัด CD-1-2-1

จากการนำ CD-1-2-1 ประมาณ 100 มิลลิกรัม มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative layer chromatography (PLC) ใช้ระบบตัวทำละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$  ในอัตราส่วน 4/1/5 ใช้สารละลายใส่ชั้นบนเป็นเฟสเคลื่อนที่ (ภาพที่ 4.14) ได้สารบริสุทธิ์ CD-1-2-1-1 น้ำหนัก 18.7 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็น wax สีเหลืองอ่อน และตรวจองค์ประกอบทางเคมีด้วยแผ่น TLC จากจุดสารที่ปรากฏบนแผ่น TLC ดังภาพ 4.15 คาดว่าน่าจะเป็นสารบริสุทธิ์



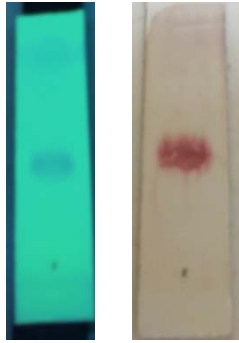
ภาพที่ 4.14 การแยก CD-1-2-1 ด้วย PLC



ภาพที่ 4.15 องค์ประกอบทางเคมีของ CD-1-2-1-1

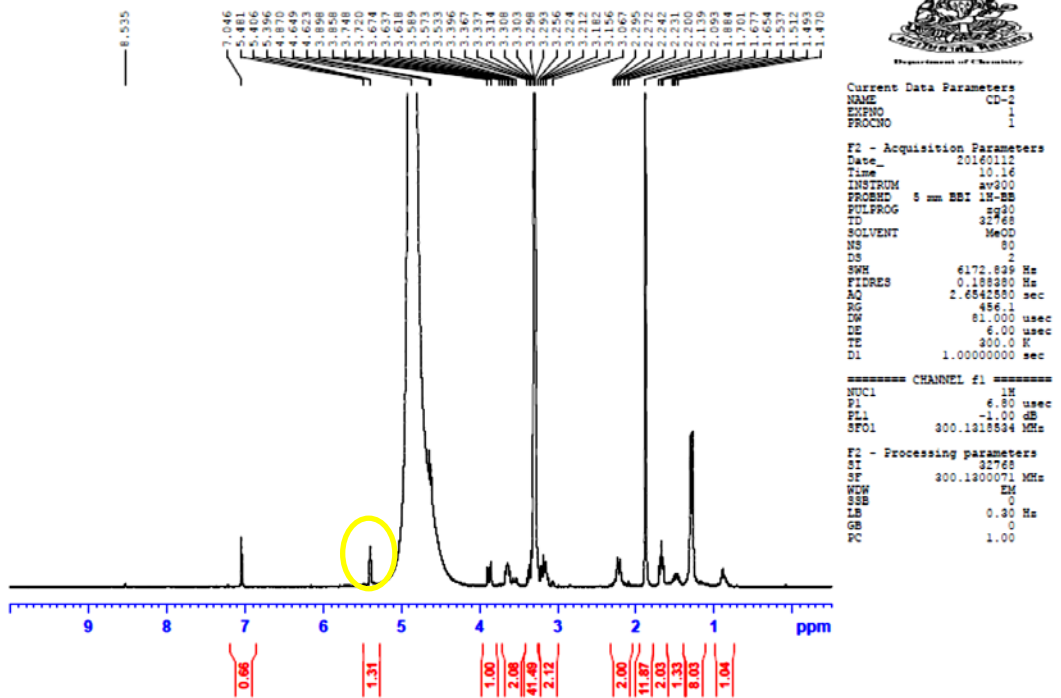
#### 4.5.9 ผลการแยกสารสกัด CD-1-2-3

จากการนำ CD-1-2-3 ประมาณ 100 มิลลิกรัม มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค preparative layer chromatography (PLC) ใช้ระบบตัวทำละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$  ในอัตราส่วน 4/1/5 ใช้สารละลายใส่ชั้นบนเป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้สารบริสุทธิ์ CD-1-2-3-1 น้ำหนัก 16.1 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็น wax สีเหลืองอ่อน และตรวจองค์ประกอบทางเคมีด้วยแผ่น TLC ปรากฏดังภาพ 4.16 คาดว่าสารที่แยกได้น่าจะเป็นสารบริสุทธิ์



ภาพที่ 4.16 องค์ประกอบทางเคมีของ CD-1-2-3-1

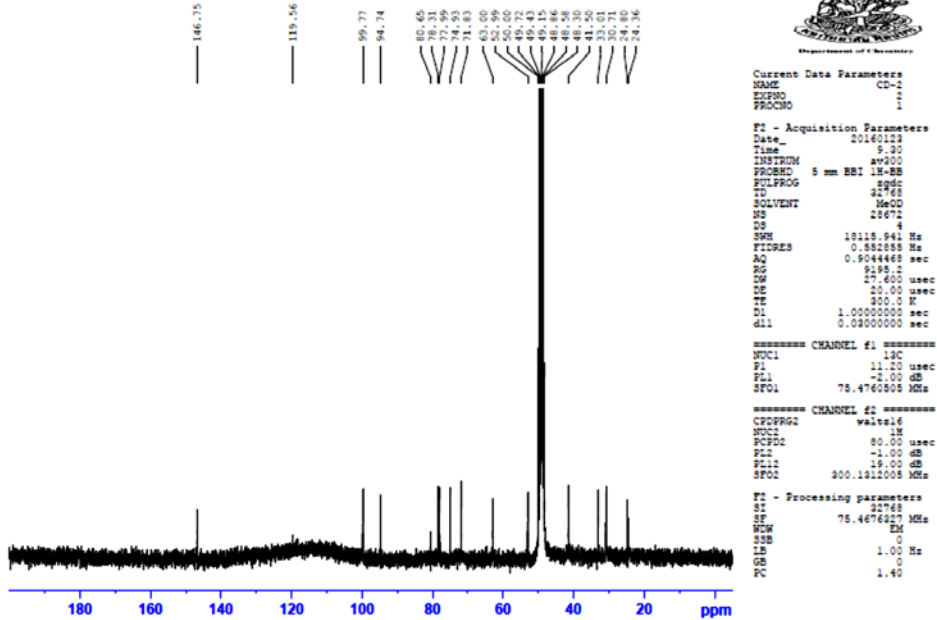
ผู้วิจัยจึงให้ส่งสารที่แยกได้ทั้งสองชนิด คือ CD-1-2-1-1 และ CD-1-2-3-1 ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ข้อมูล NMR ของสาร CD-1-2-1-1 ได้ผลดังภาพที่ 4.17 และ 4.18



ภาพที่ 4.17 โปรตอน NMR ของ CD-1-2-1-1

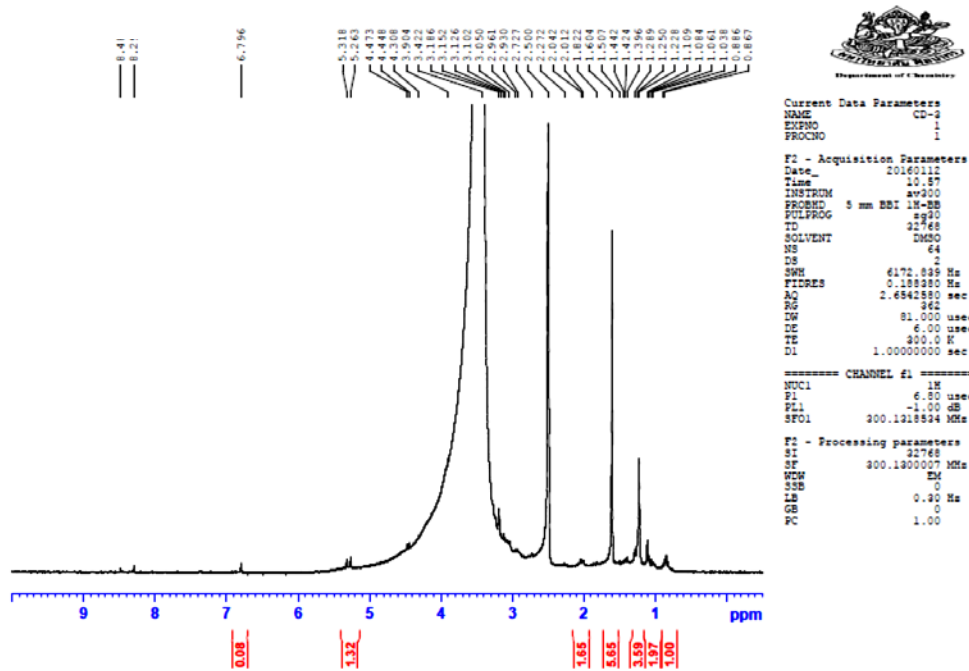
สัญญาณโปรตอนที่ปรากฏของสาร CD-1-2-1-1 ยังคงคล้ายกับสารที่ย้อมติดสีเหลืองที่แยกได้จาก CD-3-PLC-1 กล่าวคือ มีสัญญาณโปรตอนปรากฏที่ค่า chemical shift ตั้งแต่ประมาณ 0.8 จนถึง 5.4 ที่แตกต่างกันคือ มีสัญญาณที่ค่า chemical shift ประมาณ 5.5 ชัดเจนกว่า ซึ่งคาดว่าจะเป็นของ vinyl proton ( $H=C-C-$ ) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้วิเคราะห์ข้อมูลของคาร์บอน

ในโครงสร้างของสารดังกล่าว ข้อมูล  $^{13}\text{C}$  ปรากฏดังภาพ 4.18 ซึ่งปรากฏสัญญาณคาร์บอนประมาณ 16 คาร์บอน



ภาพที่ 4.18  $^{13}\text{C}$  NMR ของ CD-1-2-1-1

นอกจากนี้สัญญาณโปรตอน NMR ของ CD-1-2-1-1 ยังคล้ายกับ CD-1-2-3-1 ดังภาพที่ 4.19

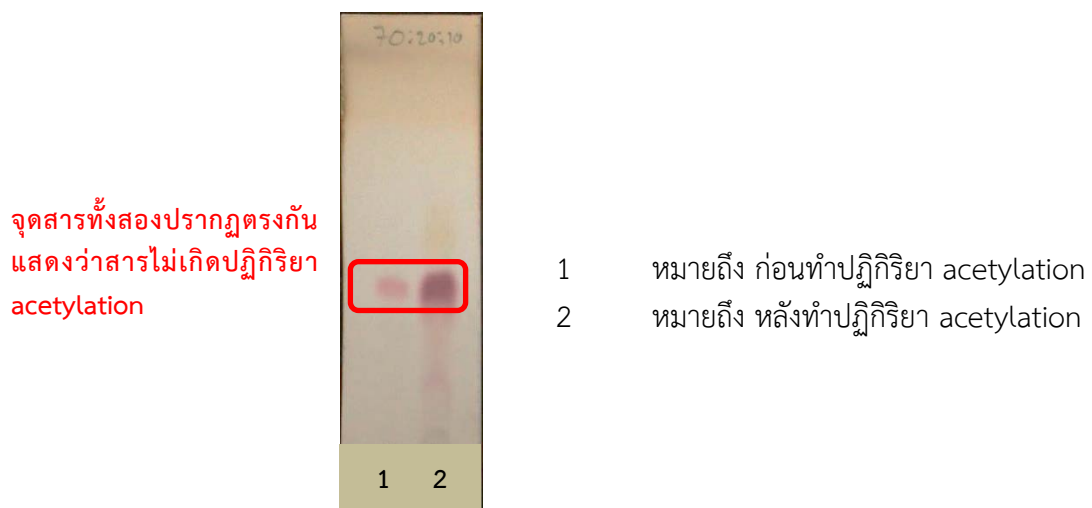


ภาพที่ 4.19 โปรตอน NMR ของ CD-1-2-3-1

จากการนำสารย้อมติดสีเหลือง คือ CD-3-PLC-1 สารย้อมติดสีชมพู 2 ชนิด คือ CD-1-2-1-1 และ CD-1-2-3-1 ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR ปรากฏว่าสารตัวอย่างทั้งสองชนิดละลายได้ไม่เต็มที่ในตัวทำละลายเกือบทุกชนิด แม้แต่ DMSO (dimethyl sulfoxide) จึงทำให้ข้อมูล NMR ที่ปรากฏในภาพที่ 4.9 และ 4.17-4.19 ไม่สามารถระบุโครงสร้างทางเคมีของสารทั้งหมดได้ ผู้วิจัยคาดว่าสารทั้งสามชนิดน่าจะมีขั้วสูงมาก เนื่องจากเป็นสารในกลุ่มไกลโคไซด์ที่มีน้ำตาลเชื่อมต่อกับโครงสร้างส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล ดังนั้นจึงต้องทำให้ความมีขั้วของสารต่ำลงด้วยการทำปฏิกิริยา acetylation เพื่อเปลี่ยนหมู่หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl, -OH) ที่ในโมเลกุลให้เป็นหมู่อะซีเตต ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ )

#### 4.5.10 ผลการทำ acetylation ของ CD-1-2-1

นำสารสกัด CD-1-2-1 น้ำหนัก 0.221 กรัม มาทำ acetylation โดยการเติมอะซีติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) และไพริดีน (pyridine) เมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง ติดตามการเกิดปฏิกิริยา โดยนำสารหลังทำปฏิกิริยามาจุดลงบนแผ่น TLC เทียบกับสารที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา ปรากฏว่าจุดสารทั้งสองปรากฏบนแผ่น TLC ตำแหน่งตรงกัน แสดงว่าสารตั้งต้นไม่เกิดปฏิกิริยา acetylation จึงได้เพิ่มเวลาเป็น 12 ชั่วโมง แล้วทดสอบด้วยแผ่น TLC ซ้ำอีกครั้ง ปรากฏว่าจุดสารทั้งสองปรากฏบนแผ่น TLC ตำแหน่งตรงกัน (ภาพ 4.13) แสดงว่าสารตั้งต้นไม่เกิดปฏิกิริยา acetylation



ภาพที่ 4.20 เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของ CD-1-2-1-1 กับ CD-1-2-1 หลังทำ acetylation



## บทที่ 5

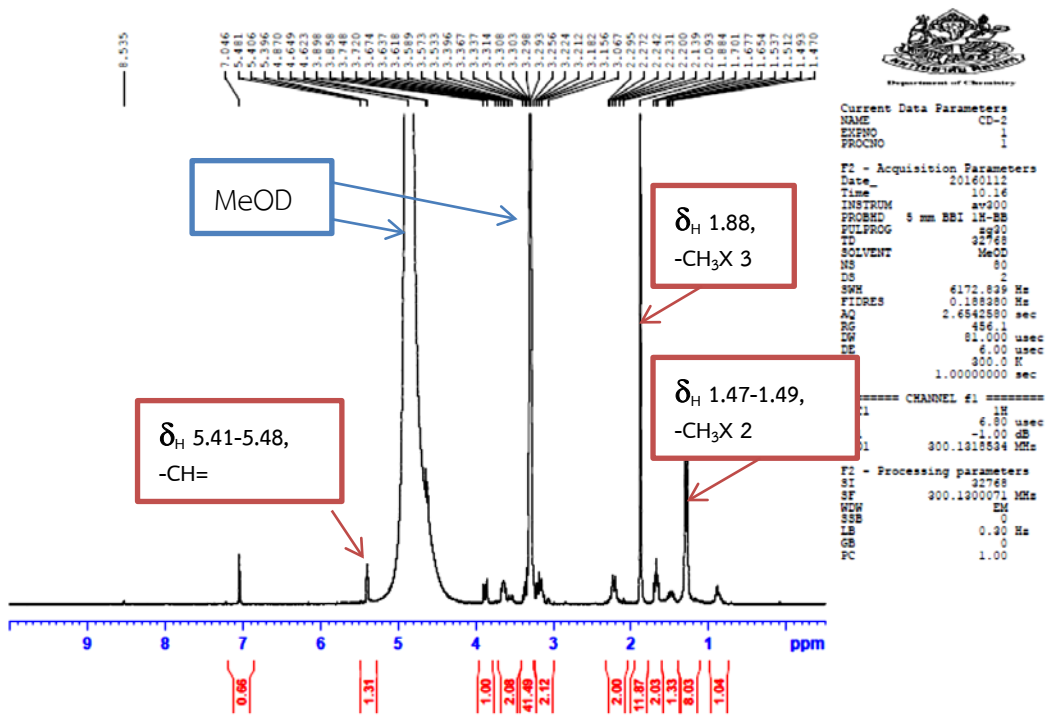
### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิค TLC ของสารสกัดจาก ใบ(หนอง กล้วยปล้อง) ใบ(ชะอำ) ลำต้น ดอก และ ราก ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากใบมีองค์ประกอบทางเคมี มากกว่าส่วนอื่นๆ อีกทั้งพืชชนิดเดียวกันแม้เก็บจากพื้นที่ต่างกันก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน ดังนั้นการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC อาจช่วยระบุชนิดของพืชได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สารสกัดจากใบสามารถต้านอนุมูล DPPH ได้เร็วที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัด จากส่วนอื่นๆ สอดคล้องกับจำนวนชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่ตรวจพบในใบมากกว่าส่วนอื่นๆ และการใช้ประโยชน์ของภูมิปัญญาท้องถิ่นจะนำส่วนใบมาต้มเพื่อนำน้ำมาดื่มแก้อาการเจ็บป่วยต่างๆ เช่น แก้พิษสัตว์กัดต่อย แก้พิษงู ล้างพิษ และมะเร็ง เป็นต้น

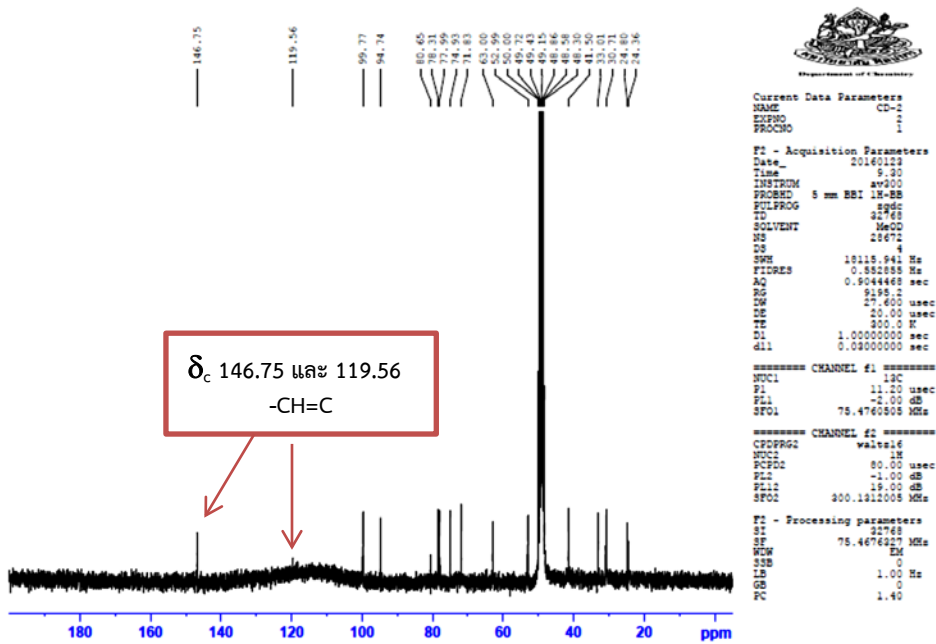
สำหรับการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ โดยทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ เซลล์ปกติจากไตของลิง (Vero cell) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับของคน (HepG2) ความเป็นพิษ ต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก (*E. faecium*) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*P. aeruginosa*) และการทดสอบฤทธิ์ ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส ปรากฏว่าสารสกัดจากใบช่อดำไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ทุกชนิด ที่ทดสอบ และไม่สามารถหาค่า IC<sub>50</sub> สำหรับการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ เนื่องจากผู้ วิเคราะห์แจ้งว่าสารตัวอย่างละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลาย DMSO ดังนั้นจึงควรส่งสารบริสุทธิ์ไป ทดสอบแทนสารสกัด

ในงานวิจัยนี้สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดใบ ช่อดำได้ 3 ชนิด คือ สารที่สามารถดูดกลืนรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm ได้เล็กน้อย ย้อมด้วย anisaldehyde reagent ติดสีเหลือง 1 ชนิด คือ CD-3-PLC-1 และย้อมติดสีชมพู 2 ชนิด คือ CD-1-2-1-1 และ CD-1-2-3-1 สัญญาณโปรตอน NMR ของสารทั้งสามชนิดใกล้เคียงกันมาก

จากการวิเคราะห์โปรตอน NMR ของ CD-1-2-1-1 ดังภาพ 4.21 พบหมู่ฟังก์ชันที่ สามารถระบุได้ คือ ที่  $\delta_H$  ประมาณ 1.47-1.49 และ 1.88 เป็นสัญญาณของ methyl proton 2 หมู่ และ 3 หมู่ ตามลำดับ และปรากฏสัญญาณของ vinyl proton (CH=C-) ที่  $\delta_H$  5.41-5.48 ซึ่ง สอดคล้องกับสัญญาณ  $^{13}C$  ที่ปรากฏสัญญาณที่  $\delta_C$  146.75 และ 119.56 (ภาพ 4.22) นอกจากนั้น ปรากฏสัญญาณของตัวทำละลายคือ MeOD ที่  $\delta_H$  3.31-3.34 และ  $\delta_C$  48.30-49.72 ซึ่งค่อนข้าง ชัดเจนกว่าสัญญาณโปรตอนและคาร์บอนของสาร ทำให้บ่งชี้สัญญาณโปรตอนและคาร์บอนอื่นๆ ของสารที่อาจปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift ช่วงนี้ สำหรับสัญญาณโปรตอนอื่นๆ ที่ปรากฏ อาจเป็นของ methylene และ methine โปรตอน



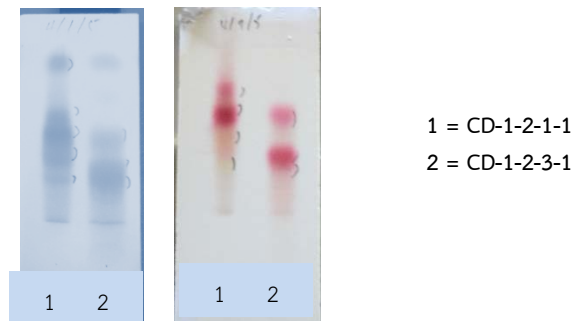
ภาพที่ 4.21 วิเคราะห์โปรตอน NMR ของ CD-1-2-1-1



ภาพที่ 4.22 วิเคราะห์ <sup>13</sup>C NMR ของ CD-1-2-1-1

แนวทางการแก้ปัญหาคือ การทำ acetylation แต่ปรากฏว่าสาร CD-1-2-1-1 ไม่เกิดปฏิกิริยา คาดว่าในโครงสร้างอาจไม่มีหมู่ hydroxyl (-OH) หรือสถานะของการทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสม เช่น อาจมีความชื้น ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยา หรือเกิดปฏิกิริยาแล้วเกิดไฮโดรไลซิสกลับเป็นสารเดิม เป็นต้น ดังนั้นจึงยังไม่สามารถแก้ปัญหาเรื่องการละลายของสารตัวอย่างได้ และยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าเหตุใดสารที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซีในโมเลกุลจึงมีขั้วค่อนข้างสูง

การจะพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสาร CD-1-2-1-1 และสารอีก 2 ชนิดที่เหลือ ต้องวิเคราะห์ข้อมูลอื่นๆ เพิ่ม เช่น IR และ 2D-NMR แต่เนื่องจากสารละลายตัวอย่างค่อนข้างเจือจาง (เพราะต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมากกว่าปกติ) การวิเคราะห์ข้อมูล 2D-NMR จึงทำได้ค่อนข้างยาก ประกอบกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานานสารเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบดังภาพที่ 4.23 ดังนั้นจึงยังไม่สามารถหาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ทั้งสามชนิดได้ แต่คาดว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน และโครงสร้างทางเคมีคล้ายกันอย่างมาก



ภาพที่ 4.23 องค์ประกอบทางเคมีของ CD-1-2-1-1 และ CD-1-2-3-1 เมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิห้อง

อย่างไรก็ตามหากไม่สามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์แต่ละชนิดได้ เนื่องจากการแยกองค์ประกอบทางเคมีแต่ละชนิดออกจากกัน ส่งผลให้องค์ประกอบเหล่านั้นเกิดการสลายตัว ส่งผลให้ประสิทธิภาพของสมุนไพรมีเปลี่ยนแปลงไป (Hostettmann and Marston, 1995) การใช้สารสกัดใบช่อดำในรูปแบบของสารสกัดหยาบ ในเบื้องต้นพบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ทั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนจนกว่าจะมีผลการวิจัยเพิ่มเติม

#### ข้อเสนอแนะ

1. แยกสารสกัด CD-1-2-1-1 CD-1-2-3-1 และ CD-3-PLC-1 เพิ่มเติม และควรเก็บสารดังกล่าวไว้ในที่เย็นและมีมืด เพื่อป้องกันสารสลายตัว
2. ส่งสารบริสุทธิ์ทุกชนิดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งเต้านม และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส เพราะสารสกัดใบช่อดำถูกนำมาใช้เป็นสมุนไพรรักษา มะเร็งเต้านมและลดน้ำตาลในพื่นที่อำเภอลำปาง

## บรรณานุกรม

- จำลอง นาคนคร. (2557, กันยายน 4). หัวหน้ากลุ่มแม่บ้านศูนย์สมุนไพรและยาหมอพื้นบ้าน. ศูนย์สมุนไพรและยาหมอพื้นบ้านตำบลท่าแร่. สัมภาษณ์.
- ชูศรี ตลับมูข และจตุพร เผ่าพงษ์ไทย. (2553). ระดับน้ำตาลในเลือดและค่าทางโลหิตวิทยาในหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดใบช่อดำ. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*. 6(1): 77-84.
- วงศ์สถิต ฉั่วกุล. (2553). สมุนไพรพื้นบ้านแก้ปวดเมื่อย. *ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*. 5(1): 1-13.
- ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ วรางคณา สบายใจ และ สิริมาส นิยมไทย. (2556). *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* 41(3): 723-730.
- Block, S., Baccelli, C., Tinant, B., Meervelt, L.V., Rozenberg, R., Habib Jiwan, J.L., Llabres, G., Paur-Gillet, M.C., and Quetin-Leclercq, J.Q. (2004). Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*. 65: 1165-117.
- Heinrich, M., and Teoh, H.L. (2004). Galantamine from snowdrop-the development of a modern drug Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 92(2-3): 147-162.
- Hostettmann, K., and Marston, A. (1995). *Saponins*. Cambridge: Cambridge university press.
- Leeratiwong, C., Chantaranothai, P., and Paton, A. (2011). A synopsis of the genus *Clerodendrum* L. (Lamiaceae) in Thailand. *Tropical Natural History*. 11: 177-211.
- Shivastava, N., and Patel, T. (2007). *Clerodendrum* and healthcare: An overview- Part II. *Phytochemistry and Biotechnology. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 1(1): 209-223.
- Su, W.C., Fang, J.M., Cheng, Y.S. (1995). Sesquiterpenes from leaves of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 39(3): 603-607.
- Zhang, J., Liu, Y., Lv, J., and Li, G. (2015). A colorimetric method for  $\alpha$ -glucosidase activity assay and its inhibitor screening based on aggregation of gold nanoparticles induced by specific recognition between phenylenediboronic acid and 4-aminophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside. *Nano Research*. 8(3): 920-930.

## ประวัติผู้วิจัย



1. ชื่อ - สกุล ผศ. ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์  
Asst. Prof. Sarinrut Chattiranan
2. วัน เดือน ปีเกิด 8 มิถุนายน 2520
3. เริ่มทำงาน ก.พ. 2549
4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
5. สถานที่ทำงาน  
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โทรศัพท์ 032-493300-6 ต่อ 1307 โทรสาร 032-493266 E-mail address: kae\_2028@hotmail.com  
ที่อยู่ปัจจุบัน  
บ้านเลขที่ 163/157 หมู่ 3 ตำบล บ้านหาด อำเภอ บ้านลาด จังหวัด เพชรบุรี 76150  
โทรศัพท์ 083-038-1288
6. ประวัติการศึกษา  
ปริญญาตรี (2539-2542) วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปริญญาโท (2546-2548) วท.ม. (เคมีอินทรีย์) มหาวิทยาลัยศิลปากร  
วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากข้าพลุ (*Piper sarmentosum*)  
กำลังศึกษาต่อในระดับปริญญาเอกสาขาเคมีอินทรีย์ ณ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม
7. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ  
สาขาวิชาที่มีความชำนาญ เคมีอินทรีย์/เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
8. ประสบการณ์วิจัย
  1. ผู้ช่วยวิจัย  
เป็นผู้ช่วยวิจัยด้านเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยมี ศ. เกียรติคุณ ดร. พิทยา ตันติเวชวุฒิกุล เป็นหัวหน้าโครงการ โดยมีส่วนร่วมในผลงานที่เผยแพร่ดังต่อไปนี้  
1) Tuntiwachwuttikul, P., Pootaeng-on, Y., Phansa\*, P., Srisanpang, T., and Taylor, W.C. (2003). Sulfur-containing compounds from *Clinacanthus siamensis*. Chem. Pharm. Bull. 51: 1423-1425.

- 2) Tuntiwachwuttikul, P., Pootaeng-on, Y., Phansa, P., and Taylor, W.C. (2004). Cerebrosides and a monoacylmonogalactosylglycerol from *Clinacanthus nutans*. *Chem. Pharm. Bull.* 52: 27-32.
- 3) Tuntiwachwuttikul, P., Phansa, P., Pootaeng-on, Y., and Taylor, W.C. (2006). Chromones from the Branches of *Harrisonia perforate*. *Chem. Pharm. Bull.* 54: 44-47.
- 4) Tuntiwachwuttikul, P., Phansa, P., Pootaeng-on, Y., and Taylor, W.C. (2006). Chemical Constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. *Chem. Pharm. Bull.* 54: 149-151.

หมายเหตุ \* Phansa, P. เปลี่ยนชื่อเป็น ศรีนรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ (Sarinrut Chattiranan)

## 2. ผลงานวิจัย

- 1) ศรีนรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และ กฤษณะ พวงระย้า. (2554). การสกัดและการตรวจสอบสารสำคัญทางพฤกษเคมีเบื้องต้นจากไมยราบ. *วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.* 8: 27-35.
- 2) ศรีนรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ วรางคณา สบายใจ และ สิริมาส นิยมไทย. (2556). การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ. *ว. วิทย์. มข.* 41: 723-730.
- 3) Sarinrat Chattiranan, Sirimas Niyomthai, and Warangkha Sabaijai. (2013). Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of *Leea rubra* Blum. *The Sci. J. of Phetchaburi Rajabhat University.* 10: 19-29.

## 3. บทความทางวิชาการ

- 1) The anti-inflammatory effects of *clerodendrum inerme*. (2558). *วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.* 12: 67-71.

## 4. เอกสารประกอบการสอน

- 1) ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ 1 (2556)