



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีจากเมล็ดกระทงลาย <i>Celastrus paniculatus</i> Willd. Antioxidant and chemical composition from <i>Celastrus paniculatus</i> Willd. seed
ชื่อนิสิต	นางสาวณัฐธิดา มานะไชย
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีจากเมล็ดกระทงลาย

Celastrus paniculatus Willd.

Antioxidant and chemical composition from
Celastrus paniculatus Willd. seed

โดย

นางสาวณัฐธิดา มานะไชย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

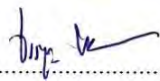
ปีการศึกษา 2559

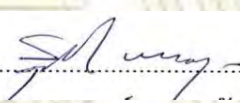
โครงการ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีจากเมล็ดกระถางลาย *Celastrus-paniculatus* Willd.

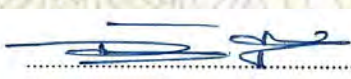
โดย นางสาวณัฐธิดา มานะไชย

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมบุญ หนูจักร)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรภักกุล)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.บัญชา พูลโกศา)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่.....เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

Project Title Antioxidant and chemical composition from *Celastrus-paniculatus* Willd. seed

Student Name Miss Nuthida Manachai Student ID 5633073223

Advisor Name Associate Professor Surachai Pornpakakul, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016.

Abstract

The objectives of this research were to investigate antioxidant activity and chemical composition of *Celastrus-paniculatus* seeds extract, where the seeds were collected from tambon Tanchum, Wiangsa district, Nan province. *Celastrus-paniculatus* seeds were extracted with hexane, ethyl acetate and methanol. The antioxidant activity of those crude extracts was evaluated by DPPH radical scavenging activity method using Trolox as a positive control. The results showed that hexane, ethyl acetate, methanol crude extracts had antioxidant activity with Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values of 0.16, 0.23 and 0.10 mg Trolox/g Sample, respectively. In addition, α -glucosidase and lipase inhibitory activities of those extracts were examined and hexane, ethyl acetate, methanol crude extracts at 25 mg/mL showed α -glucosidase inhibition values 100, 98.2 and 97.3%, respectively and lipase inhibition values 73.5, 85.4 and 83.4%, respectively. The column separation of hexane extract chromatographic gave 16 fraction (A1 - A16) and fraction A3 showed the strongest antioxidant activity than the hexane extract. Since ^1H NMR of hexane extract and fraction A3 revealed that both comprised of fatty acids and glycerides, the fraction A3 and hexane extract were determined by GC-MS analysis. The results showed that the A3 comprised of palmitic acid (81.63%), stearic acid (11.5%) and oleic acid (4.50%). While the hexane extract comprised of oleic acid (52.11%), palmitic acid (37.04%), stearic acid (5.68%) and linoleic acid (5.17%). In addition, analysis of volatile compound in seeds by HP-SPME/GC-MS displayed alkaloids and sesquiterpenoids, as main composition.

Keyword: *Celastrus paniculatus* Willd. seed, Antioxidant activity, Chemical composition

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเล่มนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ นิสิตคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี และเจ้าหน้าที่หลายฝ่ายที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภาคกุล ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและงานวิจัย ตลอดจนช่วยชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการวิจัย รวมทั้งตรวจทานและแก้ไขการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมบุญ หนูจักร ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบ และรองศาสตราจารย์ ดร.บัญชา พูลโกภา ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบที่ได้ให้คำแนะนำ และคำวิจารณ์ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกด้านสถานที่ทำงานวิจัย ตลอดจนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณพีนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอก โดยเฉพาะ นางสาวณัฐธา รัตนปัญญา นายธีรณัย อธิธิดุตรักษ์ และนางสาวพรรณิกา จันทา ที่ได้ให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคต่างๆ คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ และช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตารางประกอบ.....	ญ
สารบัญรูปประกอบ.....	ฎ
สารบัญภาคผนวก.....	ฏ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ.....	1
1.2. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของกระทงลาย.....	2
1.3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1.4. หลักการและทฤษฎี.....	9
1.4.1. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography).....	9
1.4.2. Size Exclusion Chromatography.....	10
1.4.3. ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography).....	10
1.4.4. การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH assay.....	10
1.4.5. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส.....	11
1.4.6. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส.....	11
1.4.7. การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของสารไขมันโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี -แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS).....	12
1.4.8. เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS).....	12
1.5. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	13
1.6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	13
บทที่ 2 การทดลอง.....	14

2.1	วัตถุประสงค์.....	14
2.2	สารเคมี.....	14
2.3	เครื่องมือและอุปกรณ์	15
3.3.1	อุปกรณ์	15
2.3.2	เครื่องมือ	16
2.4	ขั้นตอนการทำการทดลอง.....	16
2.4.1	ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย.....	16
2.4.2	ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเฮกเซนจากเมล็ดกระทงลายโดยใช้เทคนิค ฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	18
2.4.3	การแยกสารจากส่วนแยก A3 โดยใช้เทคนิค Size exclusion-chromatography	20
2.4.4	ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายในชั้นเฮกเซน และส่วนแยก A3 และ A4 โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS).....	20
2.4.5	ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่ระเหยของเมล็ดกระทงลาย โดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอ็กแทรกชัน/แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (HP-SPME/GC-MS).....	21
2.4.6	ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลกระทงลายโดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH radical.....	22
2.4.7	ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	23
2.4.8	ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส.....	233
บทที่ 3	ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	244
3.1	การสกัดสารจากเมล็ดกระทงลาย.....	244
3.1.1	การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย	244
3.1.2	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ.....	255
3.1.3	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	266
3.1.4	ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส.....	277
3.2	การแยกสารสกัดชั้นเฮกเซนที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	288
3.2.1	ผลการแยกสารสกัดชั้นเฮกเซน.....	288

3.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ.....288

3.3 การแยกสารจากส่วนแยก A3 โดยใช้เทคนิค Size exclusion chromatography 299

 3.3.1 ผลการแยกสารของส่วนแยก A3 29

3.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายในชั้นเฮกเซน ส่วนแยก A3 และ A4 โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS).. 300

3.5 การวิเคราะห์หองค์ประกอบของสารระเหยของเมล็ดกระทงลายโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิต เฟสไมโครเอ็กแทรกชัน/แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (HP-SPME/GC-MS).... 377

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง..... 39

เอกสารอ้างอิง 40

ภาคผนวก..... 42

ประวัติผู้วิจัย..... 522



สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่ 1-1	10 องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดกระทงลาย	9
ตารางที่ 2-1	น้ำหนัก และลักษณะทางกายภาพของสารที่แยกได้ในสารสกัดชั้นเฮกเซน	19
ตารางที่ 3-1	ค่า %Inhibition และ ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดชั้นต่างๆ และ Trolox	255
ตารางที่ 3-2	ค่า TEAC ของสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและชั้นเมทานอล	266
ตารางที่ 3-3	%Inhibition และ ค่า IC ₅₀ ของส่วนแยก A3 และ A4.....	287
ตารางที่ 3-4	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเฮกเซน ส่วนแยก A3 และ A4 ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมทรี	31
ตารางที่ 3-5	องค์ประกอบของสารระเหยจากเมล็ดกระทงลาย	34
ตารางที่ 3-6	10 องค์ประกอบที่มีปริมาณสูงสุดของสารระเหยจากเมล็ดกระทงลาย.....	388

สารบัญรูปประกอบ

รูปที่ 1-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นและผลกระทงลาย	2
รูปที่ 1-2 โครงสร้างของสาร polyalcohol A – D.....	4
รูปที่ 1-3 โครงสร้างของสารในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters 5-6.....	5
รูปที่ 1-4 โครงสร้างของสารกลุ่ม sesquiterpenoids 7-10.....	6
รูปที่ 1-5 โครงสร้างของสารในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters 11-12	7
รูปที่ 1-6 โครงสร้างของสารในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters 13-16	7
รูปที่ 1-7 ความสามารถในการรบกวนอิเล็กตรอนของอนุมูลอิสระ DPPH	10
รูปที่ 1-8 ปฏิกิริยาไฮโดไลซ์ <i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside.....	11
รูปที่ 1-9 ปฏิกิริยาไฮโดไลซ์ <i>p</i> -nitrophenyl- palmitate (PNPP)	11
รูปที่ 1-10 ปฏิกิริยา esterification ของ fatty acid.....	12
รูปที่ 1-11 เครื่องโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)	13
รูปที่ 3-1 ผล TLC ของสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเมทานอล สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทต.....	244
รูปที่ 3-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition และ Concentration ของสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลเอซีเทตและชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ	26
รูปที่ 3-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % α -glucosidase inhibition ของสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลเอซีเทตและชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้น 25 mg/mL.....	277
รูปที่ 3-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % lipase inhibition ของสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลเอซีเทตและชั้นเมทานอลที่ความเข้มข้น 25 mg/mL.....	277
รูปที่ 3-5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition และ Concentration ของส่วนแยก A3 และ A4.....	29
รูปที่ 3-6 ผล TLC ของส่วนแยก A3-2	300
รูปที่ 3-8 โครมาโทแกรมสารระเหยของเมล็ดกระทงลาย	331

สารบัญภาคผนวก

รูปที่ 2 ¹ H NMR ของสารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทต.....	444
รูปที่ 3 ¹ H NMR ของสารสกัดชั้นเมทานอล.....	455
รูปที่ 4 ¹ H NMR ของแถบสารที่ 1.....	466
รูปที่ 5 ¹ H NMR ของแถบสารที่ 2.....	477
รูปที่ 6 ¹ H NMR ของแถบสารที่ 3.....	488
รูปที่ 7 ¹ H NMR ของแถบสารที่ 4.....	49
รูปที่ 8 ¹ H NMR ของแถบสารที่ 5.....	500
การหาค่า IC ₅₀ (Half maximal inhibitory concentration).....	51
การหาค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).....	51

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย.....	17
--	----

คำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้



^1H NMR	Proton nuclear magnetic resonance
TLC	Thin layer chromatography
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
mg	มิลลิกรัม
μg	ไมโครกรัม
mL	มิลลิลิตร
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

ในปัจจุบันโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคเบาหวาน ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อ การดำเนินชีวิต ซึ่งสาเหตุหนึ่งที่เป็นปัจจัยต่อการเกิดโรคร้าย คือ การสะสมอนุมูลอิสระมาก ทำให้สาร ต้านอนุมูลอิสระในร่างกายทำงานไม่ทัน จึงจำเป็นต้องรับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกโดย การบริโภคพืชผัก และผลไม้ สารต้านอนุมูลอิสระที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน โคเอนไซม์คิวเท็น และพฤกษเคมีต่างๆ เป็นต้น

จากงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์พบว่า พืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ ที่สามารถชะลอ หรือป้องกัน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุลภายในร่างกาย เช่น สโคโปเลติน (scopoletin) จากผลยอมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน [1] และเคอร์คูมินอยด์ (cucuminoids) จากขมิ้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง [2]

กระถงลาย (*Celastrus paniculatus* Willd) เป็นพืชในวงศ์ Celastraceae จัดเป็นไม้เถา เนื้อแข็งขนาดใหญ่ความสูงของต้นประมาณ 10 เมตร หรือขึ้นพาดผ่านต้นไม้ขึ้นไปได้ไกลถึง 10 เมตร ผลมีรูปร่างค่อนข้างกลม ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีส้มปนเหลือง และเมล็ดมีเยื่อหุ้มสีแดงอมน้ำตาล กระจายพันธุ์ทั่วไปในแถบเอเชียตะวันตกเฉียงใต้ ไปจนถึงมาเลเซีย และออสเตรเลีย ในประเทศไทย สามารถพบได้ทั่วทุกภาค และออกดอกเดือนมีนาคม-พฤษภาคม ติดผลเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม ตาม ตำรายาไทยใช้เมล็ดมาบดละเอียดเป็นยารักษาโรคอัมพาต และใช้น้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดเป็นยา แก้โรคเหน็บชา

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ด กระถงลายที่สามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เพื่อประยุกต์ให้เกิดประโยชน์สูงสุด และเพิ่ม มูลค่าของเมล็ดกระถงลายให้มากขึ้น

1.2. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของกระทิงลาย



รูปที่ 1-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นและผลกระทิงลาย [3]

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Celastrus paniculatus* Willd.

วงศ์ : Celastraceae

ชื่ออื่น : กระทิงลาย, มะแตก (เลย), หมาแตก, เครือหมาแตก (เหนือ, อีสาน), นางแตก (โคราช), โขต (กลาง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่ ขึ้นพาดพันต้นไม้อื่นไปได้ไกลถึง 10 เมตร ใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับ รูปรี รูปรีแกมรูปขอบขนาน รูปไข่ รูปไข่แกมรูปขอบขนาน รูปไข่กลับ หรือรูปกลม ปลายแหลม มน หรือเว้าเล็กน้อย โคนแหลมหรือมน ขอบจักเป็นคลื่นถี่ๆ ช่อดอกแบบช่อแยกแขนง ออกตามปลายกิ่ง ดอกเล็ก สีขาวอมเหลือง มีจำนวนมาก ดอกแยกเพศ กลีบเลี้ยง 5 กลีบ ติดกันคล้ายรูปประฆัง กลีบดอก 5 กลีบ แยกกัน ผลกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร ผลแก่สีส้มปนเหลือง แตกตามผนัง ออกเป็น 3 กลีบ มี 3-6 เมล็ด เมล็ดรูปไข่ มีเนื้อสีแดงอมน้ำตาลหุ้มโดยรอบ

การกระจายพันธุ์

กระจายพันธุ์ทั่วไปในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไปจนถึงมาเลเซีย (ไม่พบที่บอร์เนียว) และ ออสเตรเลีย ในประเทศไทยพบที่จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย น่าน ลำปาง เลย มุกดาหาร ชัยภูมิ นครราชสีมา ชลบุรี จันทบุรี กาญจนบุรี และเพชรบุรี พบตามป่าดิบ ป่าผลัดใบ ระดับความสูง 0-1300 เมตร เหนือระดับน้ำทะเลออกดอกช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคมและ ติดผลช่วงเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม

สรรพคุณ [4]

ใบ : รสขมฝาดเมา แก้บิด กระตุ้นประสาท ถอนพิษฝิ่น มอร์ฟีน

ลูก : รสขมเมา แก้จุกเสียด บำรุงเลือด แก้พิษงู แก้ปวดกล้ามเนื้อ ขับเหงื่อ แก้ไข้จับ พอกแก้ลมพาด
แก้เหน็บชา

เมล็ด : รสขมเมา แก้ลมพาด แก้ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ แก้ไข้

น้ำมันจากเมล็ด : รสร้อนเมา แก้เหน็บชา ขับเหงื่อ

เปลือกเถา : รสร้อนเมา ขับระดู กินมากทำให้แท้งลูก

เถา : รสขมฝาดเมา แก้ไอ แก้บิด แก้ปวดท้อง แก้วัณโรค แก้ไข้ป่า บำรุงน้ำนม ต้มดื่มขับน้ำคามาปลา
แทนการรยู่ไฟ

ราก : รสขมเมา แก้ปวดท้อง แก้บิด แก้ไข้จับสั่น

ประโยชน์ของต้นกระทงลาย [5]

ยอดอ่อน : สามารถนำมาใช้แกงใส่ไข่มดแดงหรือใช้ลวกรับประทานร่วมกับน้ำพริก

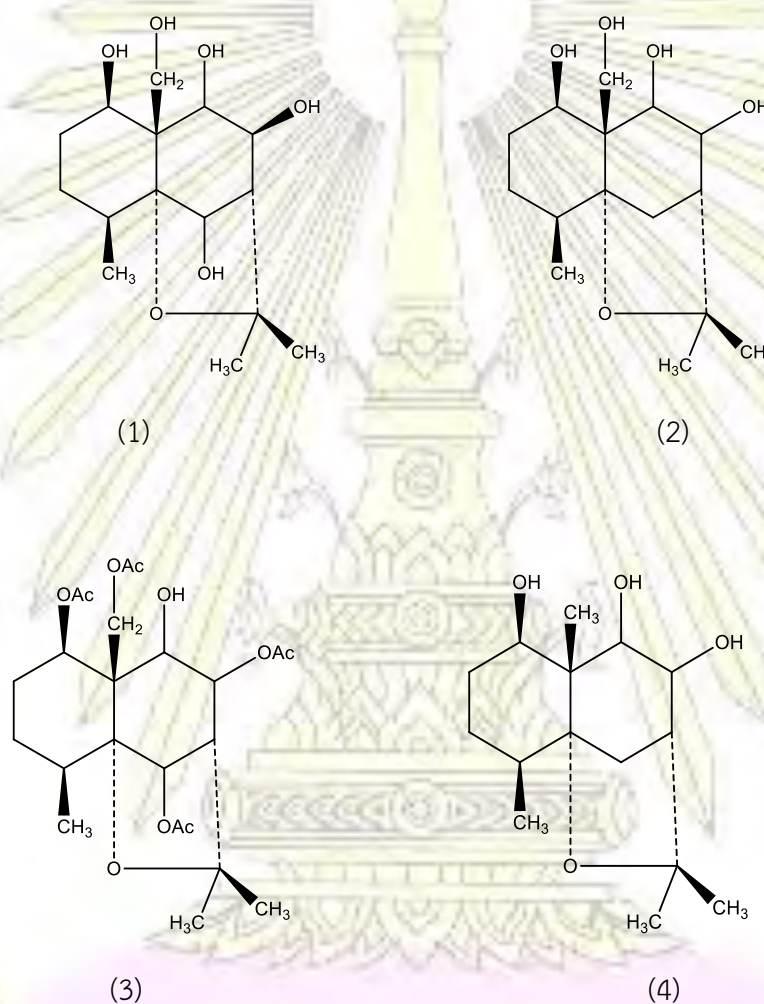
น้ำมันจากเมล็ด : ใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับใช้จุดตะเกียง

ผล : สามารถนำไปสกัดน้ำมันทำเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงได้

1.3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1970 Sengupta และคณะ⁶ ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดกระถางลายโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย พบว่าองค์ประกอบหลัก คือ กรดไขมัน (fatty acid) ได้แก่ palmitic acid (31.2%), oleic acid (22.5%), linolenic acid (22.2%), linoleic acid (15.7%) และ stearic (3.5%)

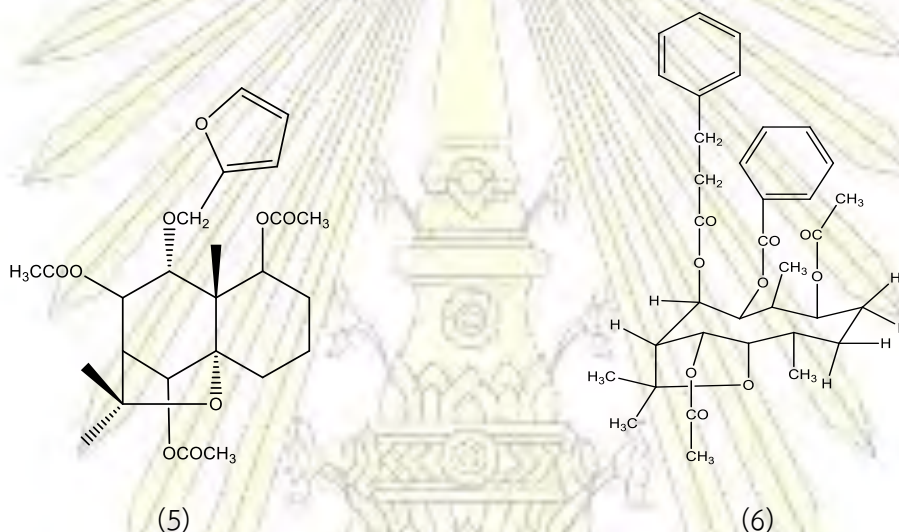
ในปี 1974 Den Hertog และคณะ⁷ ได้ทำการสกัดแยกสารจากเมล็ดกระถางลายโดยใช้ 80% เมทานอล ได้สารในกลุ่ม sesquiterpene polyalcohols ได้แก่ polyalcohol A (1), polyalcohol B (2), polyalcohol C (3) และ polyalcohol D (4)



รูปที่ 1-2 โครงสร้างของสาร polyalcohol A - D

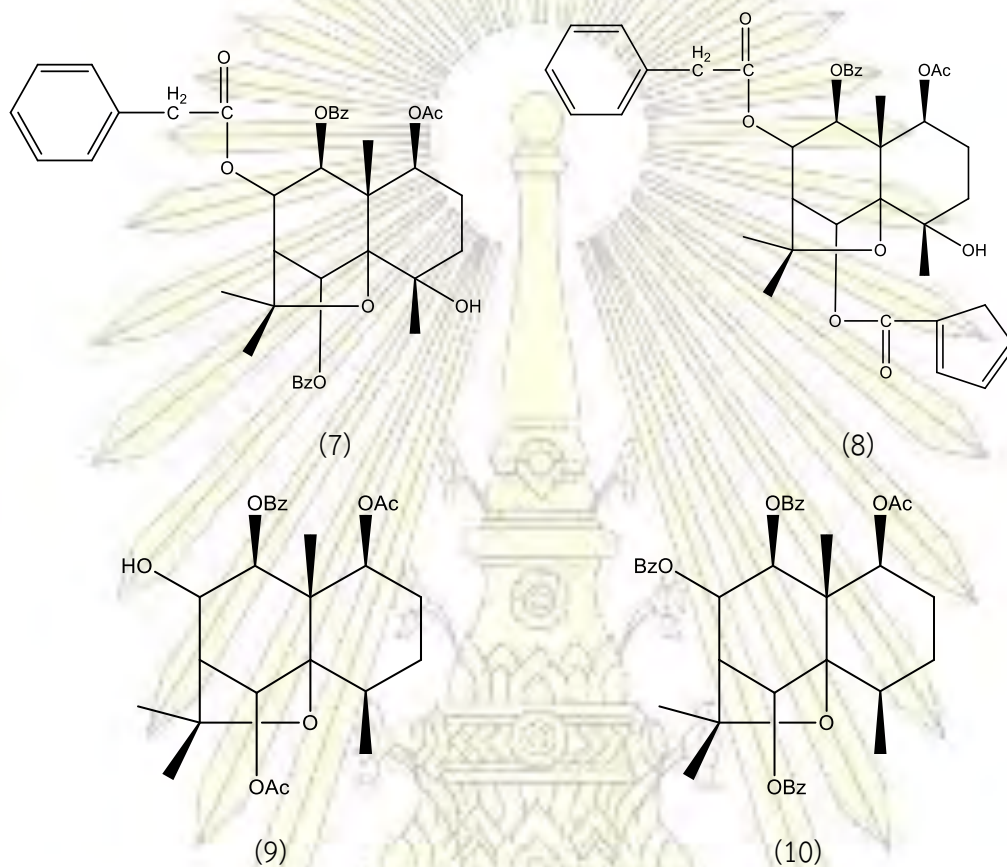
ในปี 1987 Sengupta และคณะ⁸ ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดกระทงหลายโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย พบว่าองค์ประกอบหลัก คือ กรดไขมัน (fatty acid) ประกอบด้วย normal triglycerides (20.2%) , polar triglycerides (44.4%), polar nonglyceridic ester (23.5%) และ nonpolar nonglyceridic ester (11%) และยังพบว่า normal triglycerides คือ palmitooleopalmitin, palmitooleostearin, palmitodiolein, triolein, palmitooleolinolein, steardiolein และ dioleolinolein

ในปี 1993 Yong และคณะ⁹ ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดกระทงหลายพบสารใหม่ ได้แก่ 1 β ,6 α ,8 β -triacetoxo-9 α -(β -furancaronyloxy)- β -dihydroagarofuran (5) และพบอีกสารคือ 1 β ,6 α -diacetoxo-9 β -benzoyloxy-8 β -cinnamoyloxy- β -dihydroagarofuran (6) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene- polyol esters



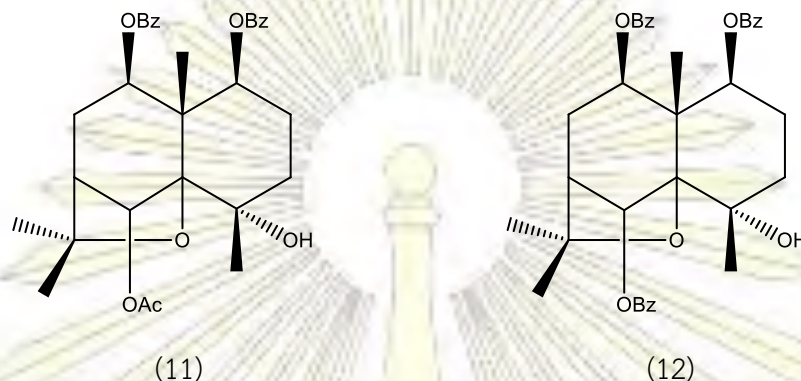
รูปที่ 1-3 โครงสร้างของสารในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters 5-6

ในปี 1993 Yong และคณะ¹⁰ ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดกระทงหลายพบสารใหม่ ได้แก่ 1 β -6 α -diacetoxy-9 β -benzoyloxy-8 β -hydroxy- β -dihydroagarofuran (7), 1 β -8 α -diacetoxy-6 α ,9 α -dibenzoyloxy- β -dihydroagarofuran (8), 1 β ,6 α -diacetoxy-9 β -benzoyloxy-8 β -hydroxy- β -dihydroagarofuran(9) และพบอีกสาร คือ 1 β ,8 α -diacetoxy-6 α ,9 α -dibenzoyloxy- β -dihydroagarofuran (10) ซึ่งสารใหม่ทั้ง 4 สารซึ่งเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenoids



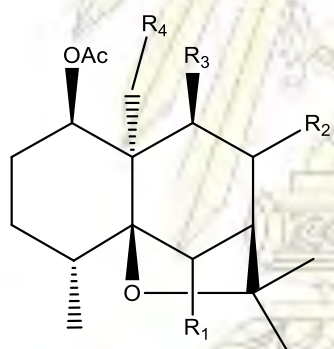
รูปที่ 1-4 โครงสร้างของสารกลุ่ม sesquiterpenoids 7-10

ในปี 1998 Zong และคณะ¹¹ ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดกระทงลายได้สารใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ 1 β ,9 α -dibenzoyloxy-4 α -hydroxy-6 α -acetoxy- β -dihydroagarofuran (11) และ 1 β ,6 α ,9 β -tribenzoyloxy-4 α -hydroxy-6 α -acetoxy- β -dihydroagarofuran (12) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters



รูปที่ 1-5 โครงสร้างของสารในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters 11-12

ในปี 2007 Borbone และคณะ¹² ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดกระทงลายโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าได้สารใหม่ในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters 1 ชนิด ได้แก่ 1 α ,6 β ,8 β -triacetoxy-9 β -benzoyloxydihydro- β -agarofuran (13) และสารที่มีรายงานมาก่อนอีก 3 ชนิด ได้แก่ 1 α ,6 β ,8 α -triacetoxy-9 β -benzoyloxydihydro- β -agarofuran (14), angulatueoid C (15) และ 1 α ,6 β ,8 β -tetraacetoxy-9 α -benzoyloxydihydro- β -agarofuran (16)



สาร	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
13	β -OAc	β -OAc	β -OBz	H
14	β -OAc	α -OAc	α -OBz	α -OAc
15	H	β -OAc	α -OBz	α -OAc
16	β -OAc	β -OAc	α -OBz	α -OAc

รูปที่ 1-6 โครงสร้างของสารในกลุ่ม sesquiterpene polyol esters 13-16

ในปี 2009 Ramadan และคณะ¹³ ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดกระทงลายใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดในชั้นเฮกเซนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีพบว่า สารสกัดประกอบด้วย fatty acid ได้แก่ oleic (54.2%) เป็นองค์ประกอบหลักตามด้วย palmitic (26.1%), linoleic (11.2%) และ stearic (2.75%) ต่อมาทดสอบค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเทียบกับน้ำมันมะกอกที่เวลาบ่มต่างกัน พบว่าสารสกัดของเมล็ดกระทงลายมีค่าการต้านอนุมูลอิสระหรือ เปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazy) ได้ดีกว่า น้ำมันมะกอก

ในปี 2010 Zohera และคณะ¹⁴ ทำการทดลองเปรียบเทียบค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในเมล็ดกระทงลายในชั้นน้ำ เมทานอล เอทิลเอซีเทตและปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยวัดความสามารถฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายในการดักจับอนุมูลอิสระของ DPPH พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 585.59 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่สารสกัดในชั้นเมทานอล ชั้นน้ำ ชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ มีค่า IC_{50} มากกว่า 10,000 $\mu\text{g/ml}$

. ในปี 2011 Alama และคณะ¹⁵ ได้สกัดแยกสารในเมล็ดกระทงลายโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล ไดคลอโรมีเทน และเอทิลเอซีเทตนำมาทดสอบค่าการต้านอนุมูลอิสระโดยดูความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระของ DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazy) พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลเอซีเทตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $25.92 \pm 1.02 \mu\text{g/ml}$ ตามด้วยสารสกัดในชั้นเมทานอล และไดคลอโรมีเทน ในขณะที่สารสกัดชั้นน้ำไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ในปี 2014 Arora และคณะ¹⁶ ได้สกัดแยกสารในเมล็ดกระทงลายโดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม นำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดชั้นน้ำมีเปอร์เซ็นต์ในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดชั้นเมทานอล และชั้นคลอโรฟอร์ม และได้วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้โดยการกลั่นไอน้ำ โดยใช้เทคนิค โครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) พบ 10 องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดกระทงลาย ดังตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 แสดง 10 องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดกระทูลาย

ลำดับ	สารประกอบ	Retention time	Peak area (%)
1	Palmitic acid	31.516	38.61
2	Phytol	34.384	11.72
3	Erucic acid	35.359	6.99
4	Trans-beta-Copaene	27.480	4.78
5	Linalool	6.471	3.97
6	Gamma-Muurolene	29.682	2.50
7	Cubenol	22.680	2.35
8	Valeric acid, 3-pentadecyl ester	34.089	2.28
9	Phytone	27.852	2.10
10	Palmitaldehyde, diallyl acetal	35.024	1.80

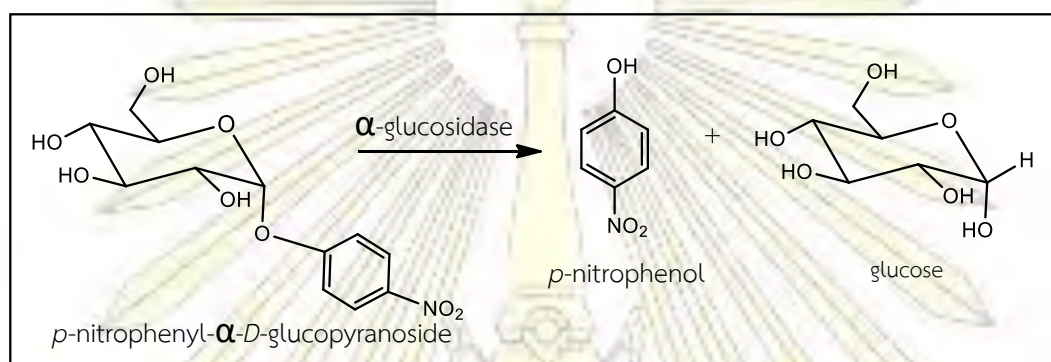
1.4. หลักการและทฤษฎี

1.4.1. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกสารต่าง ๆ มากมายหลายชนิด เช่น การแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เทคนิคนี้สามารถปรับขนาดคอลัมน์ให้เหมาะกับปริมาณสารที่ต้องการแยกได้โดยมีวิถึภาคหนึ่งที่เป็นของแข็ง เช่น ซิลิกาเจล บรรจุอยู่ในคอลัมน์ยาว จากนั้นจึงเติมสารที่ต้องการแยกลงไปด้านบนของคอลัมน์ก่อนที่จะผ่านตัวทำละลายที่เป็นวิถึภาคเคลื่อนที่ลงไปเพื่อทำให้เกิดการแยกวิถึภาคหนึ่งจะมีแรงดึงดูดกับสารชนิดต่างๆ กันด้วยความแรงต่างกัน ซิลิกาเจลมีความมีขั้วสูงจึงมีแรงดึงดูดกับสารที่มีขั้วมาก ๆ ได้แข็งแรงกว่าสารไม่มีขั้ว ดังนั้นตัวทำละลายหรือวิถึภาคเคลื่อนที่จึงจะพาสารต่างชนิดออกมาไม่พร้อมกัน สารที่ถูกดูดซับไว้ได้ดี (สารมีขั้วสูง) จะออกมาจากคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้ไม่ดี สารที่นิยมใช้เป็นวิถึภาคหนึ่ง ได้แก่ ซิลิกาเจล ซึ่งซิลิกาเจลสามารถใช้แยกสารได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นสารที่มีขั้วมากๆ

1.4.5. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

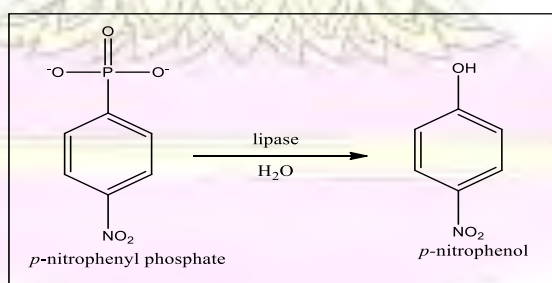
เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยใช้ reagent คือ *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNP-G) ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสีทำหน้าที่เป็น substrate ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งให้สีเหลือง และกลูโคส เมื่อ PNP-G ทำปฏิกิริยากับแอลฟาไกลูโคซิเดส ดังรูปที่ 1-7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ถ้าค่าการดูดกลืนแสงน้อย แสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสไม่ทำให้ทำปฏิกิริยากับ PNP-G [19]



รูปที่ 1-8 ปฏิกิริยาไฮโดลิสซ์ *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside

1.4.6 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

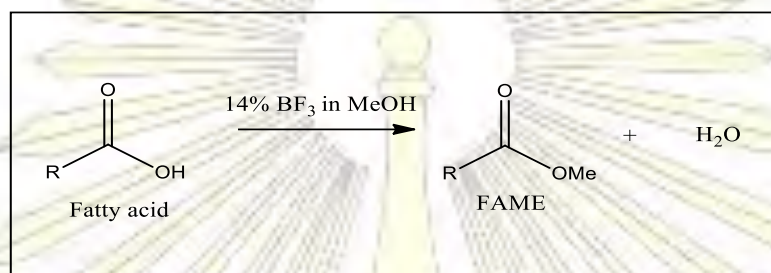
เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ reagent คือ *p*-nitrophenyl palmitate (PNPP) ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสีทำหน้าที่เป็น substrate ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อ PNPP ทำปฏิกิริยากับไลเปส ดังรูปที่ 1-8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ถ้าค่าการดูดกลืนแสงน้อย แสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายสามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสไม่ทำให้ทำปฏิกิริยากับ PNPP [20]



รูปที่ 1-9 ปฏิกิริยาไฮโดลิสซ์ *p*-nitrophenyl- palmitate (PNPP)

1.4.7. การวิเคราะห์หองค์ประกอบกรดไขมันของสารไขมันโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

เนื่องจากผล NMR ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงหลายบ่งบอกว่าเป็นกรดไขมัน และกลีเซอไรด์ จึงต้องนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาองค์ประกอบโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) มาทำปฏิกิริยา esterification ดังรูปที่ 1-9 กับ 14% BF_3 ในเมทานอล เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันให้เป็น fatty acid methyl esters (FAME) ตามวิธีของ Weston และคณะ [17]



รูปที่ 1-10 แสดงปฏิกิริยา esterification ของ fatty acid

1.4.8. เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ได้ทั้งวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ ให้ข้อมูลที่มีความแม่นยำสูง โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี อาศัยเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสม โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (Stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) แก๊สตัวพา คือ แก๊สฮีเลียม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง GC สารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นไอ และส่วนไอของสารผสมจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยแก๊สฮีเลียม ซึ่งภายในคอลัมน์จะเกิดการแยกสารผสม โดยอาศัยเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ และสารผสม จากนั้นโมเลกุลของสารเชิงเดี่ยวจะถูกพาเข้าสู่เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass Spectrometer) โมเลกุลของสารเชิงเดี่ยวจะได้รับพลังงานจากลำแสงอิเล็กตรอนพลังงานสูงทำให้เกิดการแตกตัวอยู่ในรูปประจุ เรียกว่า “Molecular ion”, M^+ [18]



รูปที่ 1-11 เครื่องโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) [18]

1.5. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. สกัดสารและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดกระทงลาย
2. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย ทราบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดกระทงลาย

บทที่ 2 การทดลอง

2.1 วัสดุดิบ

เมล็ดกระทงลาย (*Celastrus paniculatus* Willd. seed) เก็บจากตำบลตาลชุม อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน วันที่ 20 สิงหาคม พ.ศ.2559

2.2 สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane)
2. เอทิลแอซีเตต (Ethyl acetate)
3. เมทานอล (Methanol)
4. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
5. 95% เอทานอล (Ethanol)
6. คลอโรฟอร์ม (CHCl_3)
7. ซิลิกาเจล (0.063-200 mm, Merck 1.0773)
8. Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences)
9. Vanillin Solution (เป็นสารละลายที่ผสมระหว่างผง Vanillin) ละลายในเอทานอลแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น
10. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
11. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-carboxylic-acid)

หมายเหตุ : ตัวทำละลาย ในข้อ 1-4 มี 2 Grade คือ

1. AR Grade คือ ใช้ในการทำ Mobile phase
2. Commercial Grade คือ นำมากลั่นก่อนนำไปใช้ในการชะคอลัมน์

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ขนาด 25, 50, 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร
 2. กระบอกตวง 10 และ 500 มิลลิลิตร
 3. ขวดก้นกลมขนาด 50, 250, 1,000 มิลลิลิตร
 4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 25, 50, 250
 5. กรวยแก้ว
 6. กระจกนาฬิกา
 7. Sinter glass
 8. ขวด fraction
 9. Capillary
 10. หลอดหยด
 11. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
 12. อลูมิเนียมฟอยด์
 13. กรวยบุคเนอร์
 14. เครื่องปั่น
 15. คอลัมน์ปริมาตร 250 mL และ 500 mL
 16. ที่วัดความถ่วงจำเพาะ
 17. Thin layer chromatography (TLC) ยี่ห้อ MERCK Frankfurter
 18. Hot plate
- 

2.3.2 เครื่องมือ

1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator)
2. เครื่อง Micro plate reader
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
4. UV Lamp ใช้ตรวจสอบสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC
5. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)
6. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

2.4 ขั้นตอนการทำการทดลอง

2.4.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย

1. ท่อเมล็ดกระถางลายที่เก็บจาก จังหวัด น่าน ด้วยหนังสือพิมพ์ตากในที่ร่มมีอากาศถ่ายเท 7 วัน แล้วนำมาอบให้แห้ง 1 วัน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
2. ชั่งเมล็ดกระถางลาย 1.6 กิโลกรัม มาปั่นละเอียดใส่โหลแก้ว และแช่ตัวทำละลายเฮกเซน 3 ลิตร ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์และฝา แช่เฮกเซน 1 วัน และทำซ้ำอีก 3 ครั้ง
3. กรองเอาส่วนที่เป็นสารละลายโดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum-evaporator) จะได้ส่วนสกัดชั้นเฮกเซน ได้ส่วนสกัดชั้นเฮกเซน 495.7 กรัม
4. นำกากจากข้อ 3 เติมตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 3 ลิตร ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ และปิดฝา แช่เอทิลแอลกอฮอล์ 1 วัน และทำซ้ำอีก 3 ครั้ง กรองและระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดชั้นเอทิลแอลกอฮอล์ 386.9 กรัม
5. นำกากจากข้อ 4 เติมตัวทำละลายเมทานอล 3 ลิตร ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ และปิดฝาแช่เมทานอล 1 วัน และทำซ้ำอีก 3 ครั้ง กรองและระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดชั้นเมทานอล 140.7 กรัม
6. นำสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอลกอฮอล์และชั้นเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสและไลเปส



แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย

2.4.2 ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเฮกเซนจากเมล็ดกระทงลายโดยใช้เทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. แบ่งสารสกัดชั้นเฮกเซนมาเล็กน้อย มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อทำการหา ระบบของตัวทำละลายผสมหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการลงคอลัมน์ โดยอาศัยเทคนิค thin layer chromatography (TLC)

2. ชั่งสารสกัดชั้นเฮกเซนประมาณ 55 กรัม ลงในขวดก้นกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม เอทิลเอซีเตตลงไป คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ผสมกับซิลิกาเจล 190.16 กรัม ระเหยตัวทำละลาย ออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) จะได้ผงของแข็งสี เหลืองละเอียด

3. นำซิลิกาเจล บรรจุในซินเทอร์กลาส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร ความสูง 6.5 เซนติเมตร จากนั้นนำสารที่ผสมกับซิลิกาเจลในข้อ 2 เทลงบนผิวหน้าของซิลิกาเจลที่บรรจุใน ซินเทอร์กลาส ทำผิวหน้าซิลิกาเจลให้เรียบแล้วปิดด้วยกระดาษกรอง

4. ชะคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยเริ่มจากตัวทำละลาย เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลเอซีเตต, เอทิลอะซิเตต, เอทิลอะซิเตต-เมทานอล, เมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่า ขึ้นเรื่อยๆ ชะตัวทำละลายครั้งละ 400 มิลลิลิตร แล้วเก็บเป็นส่วนแยก นำส่วนแยกที่ได้ไประเหยตัว ทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ได้ส่วนแยก ทั้งหมด 81 ส่วนแยก รวมน้ำหนักสารได้ 52.2 กรัม ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสารบน TLC คล้ายคลึงกันได้ 16 ส่วนแยก

5. นำส่วนแยกทั้ง 16 ส่วนแยก ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระตามขั้นตอนที่ 2.4.6 พบว่า ส่วนแยก A3 และ A4 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าส่วนแยกอื่นจึงนำส่วนแยก A3 มาแยกต่อ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแยกตามขนาดโมเลกุล (Size exclusion chromatography)

ตารางที่ 2-1 แสดงน้ำหนัก และลักษณะทางกายภาพของสารที่แยกได้ในสารสกัดชั้นเฮกเซน

ส่วนแยก	น้ำหนักสารที่แยกได้ (g)	ลักษณะสาร
A1	9.0461	ของเหลวหนืดสีส้มแดง
A2	0.2144	ของเหลวใสสีขาว
A3	15.8563	ของเหลวหนืดสีเหลืองส้ม
A4	10.4070	ของเหลวหนืดสีเหลืองเขียว
A5	2.1710	ไขสีขาวขุ่น
A6	2.2227	ไขสีขาวขุ่น
A7	0.9263	แผ่นฟิล์มสีเหลืองเขียว
A8	1.8099	แผ่นฟิล์มสีเหลืองเขียว
A9	3.0348	แผ่นฟิล์มสีเหลืองเขียว
A10	1.6296	แผ่นฟิล์มสีเหลือง
A11	0.6049	แผ่นฟิล์มสีเหลือง
A12	0.6467	แผ่นฟิล์มสีเหลือง
A13	1.5888	ของเหลวหนืดสีเหลืองส้ม
A14	0.8640	ของเหลวหนืดสีเหลืองส้ม
A15	0.1273	ของเหลวหนืดสีเหลืองส้ม
A16	0.2590	ของเหลวสีส้มน้ำตาล

2.4.3 การแยกสารจากส่วนแยก A3 โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแยกตามขนาดโมเลกุล (Size exclusion- chromatography)

1. ทดสอบการละลายของส่วนแยก A3 โดยแบ่งส่วนแยก A3 มาละลายด้วยตัวทำละลายพบว่าสามารถละลายได้ใน 20% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน
2. ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้วัฏภาคหนึ่งคือ Sephadex LH20 และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ 20% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน
3. ทำการเก็บส่วนแยกที่ออกมาจากคอลัมน์ และนำส่วนแยกที่ได้ไประเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ตรวจสอบส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) รวมกลุ่มส่วนที่ออกมาที่มีจุดของสารบน TLC คล้ายคลึงกันได้ 7 ส่วนแยก คือ ส่วนแยก A3-1 ถึง A3-7

2.4.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายในชั้นเฮกเซน และส่วนแยก A3 และ A4 โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS)

1. เตรียม fatty acid methyl ester (FAME) ตามวิธีของ Weston และคณะ [17] โดยชั่งตัวอย่าง (สารสกัดชั้นเฮกเซน, ส่วนแยก A3 และ A4) ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ขวดกันกลม ปริมาตร 10 mL เติม 14% BF₃ ในเมทานอล 2 mL ตั้งรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ล้าง FAME โดยการเติมน้ำ 2 mL และ เฮกเซน 2 mL ในกรวยแยก เขย่าของผสมและตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งแยกเป็น 2 ชั้น ไซชั้นเฮกเซนที่มี FAME ผสมอยู่ ระเหยเฮกเซนออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน
3. เตรียม FAME ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS)
4. ตั้งค่าสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) โดยอ้างอิงจาก Arora และคณะ [16]

คอลัมน์: HP-5ms 30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m

แก๊สตัวพา: ฮีเลียม

อุณหภูมิโอเว่น: 80 องศาเซลเซียส ถึง 210 องศาเซลเซียส ที่ 4 องศาเซลเซียส/นาที เป็นเวลา 2 นาที และจาก 210 องศาเซลเซียส ถึง 300 องศาเซลเซียส ที่ 15 องศาเซลเซียส/นาที นาน 5 นาที และที่ 300 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

อุณหภูมิที่ฉีด: 270 องศาเซลเซียส ปริมาตรที่ฉีด คือ 1.0 μ L, Split Ratio 100: 1

เครื่องตรวจจับ: MS, EI 70 eV, ion source temperature 230 องศาเซลเซียส โหมดสแกน

m/z 45-350

2.4.5 ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยของเมล็ดกระทงลายโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอ็กแทรกชัน/แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (HP-SPME/GC-MS)

1. ชั่งเมล็ดกระทงลายที่บดละเอียดในขวดแก้ว 3 ขวด ขวดละ 1 กรัม ปิดจุกยางและฟาลอูมิเนียมบิจนแน่นสนิท

2. สกัดสารอินทรีย์ที่ระเหยของเมล็ดกระทงลายโดยใช้ SPME ไฟเบอร์ (50/30 μm DVB/CAR/PDME, Stable flex) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารอินทรีย์ที่ระเหยของเมล็ดกระทงลาย โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

3. ตั้งค่าสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

คอลัมน์: HP-5ms 30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μm

แก๊สตัวพา: ฮีเลียม

อุณหภูมิโอเว่น: 50 องศาเซลเซียส ถึง 200 องศาเซลเซียส และจาก 200 องศาเซลเซียส

ถึง 280 องศาเซลเซียส ที่ 60 องศาเซลเซียส/นาที นาน 5 นาที

อุณหภูมิที่ฉีด: 250 องศาเซลเซียส Split Ratio 100: 1

เครื่องตรวจจับ: MS, EI 70 eV, ion source temperature 230 องศาเซลเซียส โหมดสแกน

m/z 35-350

2.4.6 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลกระทงลาย โดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH radical

2.4.6.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นที่แน่นอนในช่วง 12.5, 10.0, 7.50, 5.0 และ 2.5 $\mu\text{g/mL}$ โดยชั่ง Trolox 1.25 mg ละลายด้วยเอทานอล 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10.0, 7.50, 5.0 และ 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

2.4.6.2 เตรียมสารละลาย DPPH radical ความเข้มข้น 0.1 mM

เตรียมสารละลาย DPPH radical ความเข้มข้น 0.1 mM โดยชั่ง DPPH 2 mg ละลายด้วยเอทานอล 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL

2.4.6.3 เตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียม stock ของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100 mg/mL โดยชั่งสาร 100 mg ละลายด้วยเอทานอล 95% ปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 80, 50, 20, 10 mg/mL ตามลำดับ

2.4.6.4 ตรวจวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน Trolox

1. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Trolox หรือ สารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 100 μL ลงใน 96 well plate
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน DPPH ปริมาตร 200 μL จนครบทุกช่องของ 96 well plate ที่มีสารละลายมาตรฐาน Trolox และสารละลายตัวอย่าง ปิดฝาและหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ทิ้งไว้ 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร วัดซ้ำ 3 รอบ โดยใช้เครื่อง Micro-plate reader
4. คำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการ 2.1 และหาค่า IC_{50} จากกราฟระหว่างค่า % inhibition และ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox หรือสารละลายตัวอย่าง

$$\% \text{ inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

สมการ 2.1

เมื่อ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอทานอล

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

2.4.7 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

2.4.7.1 เตรียมสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลเอซีเทตและเมทานอล ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL โดยชั่งสารสกัด 25 mg ละลายด้วย DMSO 1 mL

2.4.7.2 เติมส่วนผสมดังนี้

1. *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNP-G) 40 μ L
2. α -glucosidase enzyme (1Unit/mL) 20 μ L
3. สารตัวอย่าง (สารสกัดชั้นเฮกเซน, เอทิลเอซีเทตและเมทานอล) 20 μ L

2.4.7.3 นำสารผสมในข้อ 2.4.7.2 มาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.4.7.4 จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 200 μ L วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร วัดซ้ำ 3 รอบ โดยใช้เครื่อง Micro- plate reader

2.4.7.5 คำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (%Inhibition) ดังสมการ 2.1 โดยใช้สารละลาย DMSO แทนสารละลายเอทานอล

2.4.8 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

2.4.8.1 เตรียมสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลเอซีเทตและเมทานอล ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL โดยชั่งสารสกัด 25 mg ละลายด้วย DMSO 1 mL

2.4.8.2 เติมส่วนผสมดังนี้

1. Tris-HCl (0.061M) 280 μ L
2. สารตัวอย่าง (สารสกัดชั้นเฮกเซน, เอทิลเอซีเทตและเมทานอล) 32 μ L
3. *p*-nitrophenyl palmitate (PNPP) 40 μ L
4. Lipase enzyme (5mg/mL) 48 μ L

2.4.8.3 นำสารผสมในข้อ 2.4.8.2 มาผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที

2.4.8.4 จากนั้นเติมสารละลายเอทานอล 60 μ L วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร วัดซ้ำ 3 รอบ โดยใช้เครื่อง Micro- plate reader

2.4.8.5 คำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (%Inhibition) ดังสมการ 2.1 โดยใช้สารละลาย DMSO แทนสารละลายเอทานอล

บทที่ 3

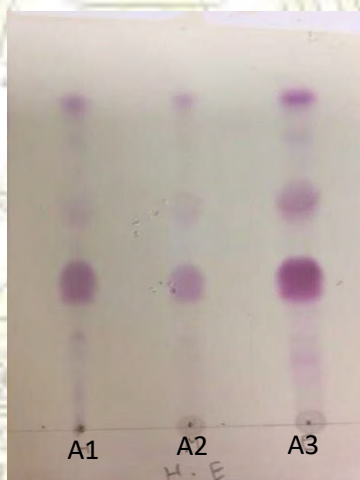
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การสกัดสารจากเมล็ดกระทงลาย

3.1.1 การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย

ซึ่งเมล็ดกระทงลายปั่นละเอียดมา 1.6 กิโลกรัม นำมาสกัดด้วยแช่ตัวทำละลายได้แก่ เฮกเซน เอทิลเอซีเตตเมทานอล ดังแผนภาพที่ 1 ได้ส่วนสกัดชั้นเฮกเซน 495.7 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีส้มแดงเข้ม ส่วนสกัดชั้นเอทิลเอซีเตต 386.9 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีส้มแดง และส่วนสกัดชั้นเมทานอล 140.7 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีแดงน้ำตาล

จากการสกัดสารจากเมล็ดกระทงลายด้วยตัวทำละลายพบว่า เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดนี้เมื่อเทียบกับ เอทิลเอซีเตตและเมทานอล เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีปริมาณมากที่สุด และองค์ประกอบของสารที่สกัดได้ในชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลอะซิเตต และชั้นเมทานอล มีความใกล้เคียงกันจากเทคนิค TLC ดังรูปที่ 3-1 และ เทคนิค ^1H NMR spectroscopy ดังรูปที่ 1,2 และ 3 ในภาคผนวก



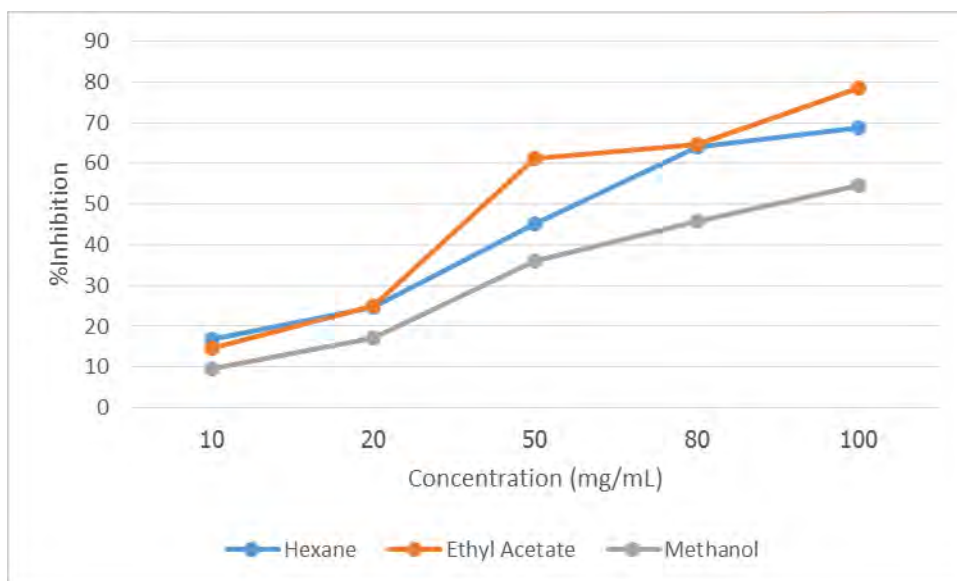
รูปที่ 3-1 ผล TLC ที่ใช้ 10% เอทิลเอซีเตตในเฮกเซนเป็นเฟสเคลื่อนที่ (A1) สารสกัดชั้นเฮกเซน (A2) สารสกัดชั้นเมทานอล (A3) สารสกัดชั้นเอทิลเอซีเตต

3.1.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและชั้นเมทานอล ที่มีความเข้มข้น 100, 80, 50, 20 และ 10 mg/mL มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH พบว่าสารสกัดในชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและเมทานอล มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ซึ่งสารสกัดในชั้นเอทิลแอสีเทตมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ตามด้วยสารสกัดชั้นเฮกเซน และชั้นเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.60, 56.45 และ 89.17 mg/mL ดังตารางที่ 3-1 และเมื่อเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกับ Trolox ที่เป็น Positive control รายงานเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ดังตารางที่ 3-2 ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดมีผลต่อร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ หรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น คือเมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้น จะทำให้อัตราการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 3-2

ตารางที่ 3-1 แสดงค่า %Inhibition และ ค่า IC_{50} ของสารสกัดชั้นต่างๆ และ Trolox

สาร	Concentration (μ g/mL)	%Inhibition	IC_{50}
Trolox	12.5	68.70	9.26
	10.0	53.90	
	7.5	39.00	
	5.0	26.70	
	2.5	12.90	
สารสกัด	Concentration (mg/mL)	%Inhibition	IC_{50}
ชั้นเฮกเซน	100	68.60	56.45
	80	64.10	
	50	45.30	
	20	24.70	
	10	17.00	
ชั้นเอทิลแอสีเทต	100	78.60	40.60
	80	64.61	
	50	61.17	
	20	25.10	
	10	14.68	
ชั้นเมทานอล	100	54.73	89.17
	80	45.81	
	50	35.94	
	20	17.01	
	10	9.60	



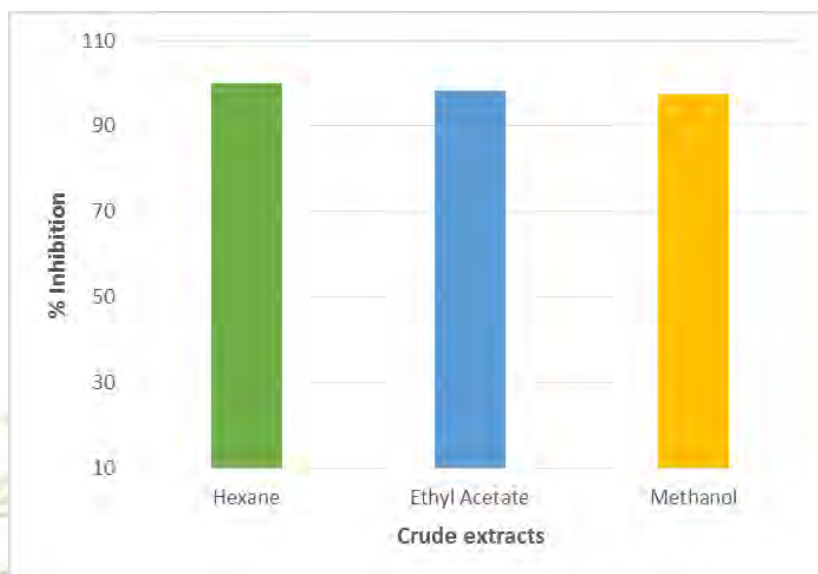
รูปที่ 3-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition และ Concentration ของสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและชั้นเมทานอล

ตารางที่ 3-2 แสดงค่า TEAC ของสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและชั้นเมทานอล

สารสกัด	TEAC (mg Trolox/g Sample)
ชั้นเฮกเซน	0.16
ชั้นเอทิลแอสีเทต	0.23
ชั้นเมทานอล	0.10

3.1.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

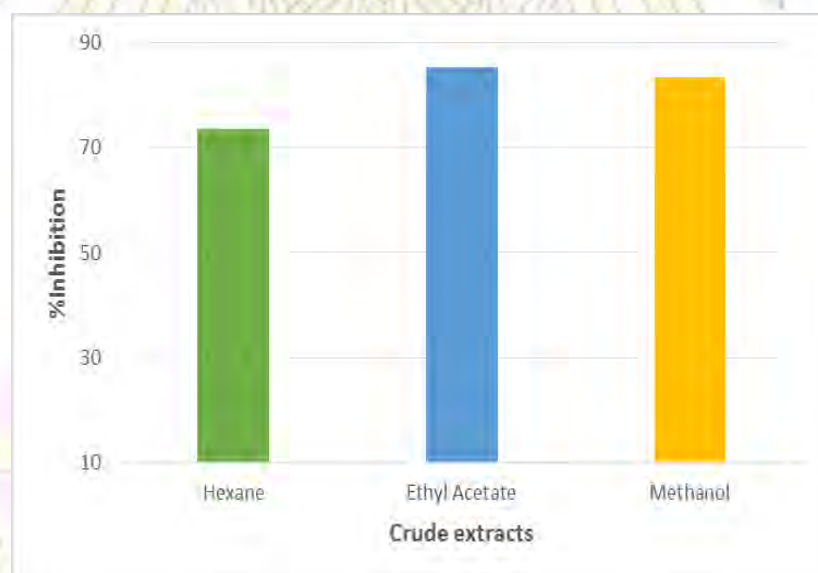
เมื่อนำสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและชั้นเมทานอล ที่มีความเข้มข้น 25 mg/mL มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่าสารสกัดในชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสูงที่สุด ตามด้วยสารสกัดชั้นเอทิลแอสีเทตและเมทานอลมีค่า %Inhibition เท่ากับ 100.0, 98.2, 97.3% ตามลำดับ ดังรูปที่ 3-3



รูปที่ 3-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % α -glucosidase inhibition ของสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและชั้นเมทานอล ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL

3.1.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

เมื่อนำสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและชั้นเมทานอล ที่มีความเข้มข้น 25 mg/mL มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส พบว่าสารสกัดในชั้นเอทิลแอสีเทตมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสดีที่สุด ตามด้วยสารสกัดชั้นเมทานอล และเฮกเซนมีค่า %Inhibition เท่ากับ 85.4, 83.4, 73.5 % ตามลำดับ ดังรูปที่ 3-4



รูปที่ 3-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % lipase inhibition ของสารสกัดชั้นเฮกเซน ชั้นเอทิลแอสีเทตและชั้นเมทานอล ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL

3.2 การแยกสารสกัดชั้นเฮกเซนที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.2.1 ผลการแยกสารสกัดชั้นเฮกเซน

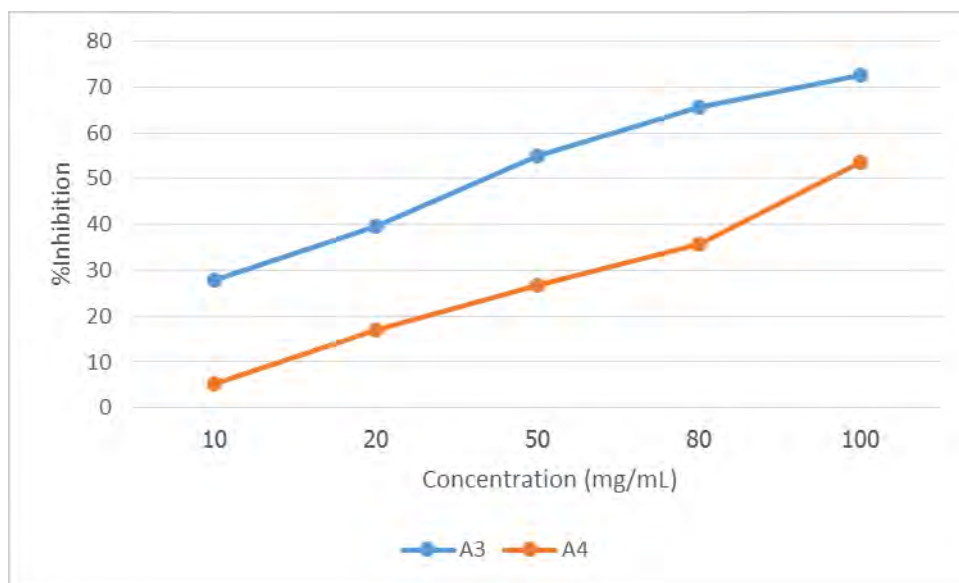
นำสารสกัดชั้นเฮกเซน 55 กรัมมาแยกด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้เฮกเซน, เฮกเซน-เอทิลแอลกอฮอล์, เอทิลอะซิเตต, เอทิลอะซิเตต-เมทานอล, เมทานอล โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อยๆ รวมส่วนแยกที่ได้จากผล TLC และ $^1\text{H NMR}$ ที่คล้ายกันได้เป็น 16 ส่วนแยก คือ A1-A16 (ดังตารางที่ 2-1) รวมน้ำหนักสารได้ 52.2 กรัม

3.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

นำส่วนแยก A1-A16 มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH พบว่า ส่วนแยก A3 และ A4 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งส่วนแยก A3 มีค่าการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนแยก A4 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.00 และ 95.50 mg/mL ดังตารางที่ 3-3 ซึ่งความเข้มข้นของส่วนแยกมีผลต่อร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ หรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น คือเมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 3-5

ตารางที่ 3-3 แสดงค่า %Inhibition และ ค่า IC_{50} ของส่วนแยก A3 และ A4

ส่วนแยก	Concentration (mg/mL)	% Inhibition	IC_{50}
A3	100	72.50	40.00
	80	65.50	
	50	54.90	
	20	39.70	
	10	28.00	
A4	100	53.50	95.50
	80	35.70	
	50	26.70	
	20	17.10	
	10	5.20	

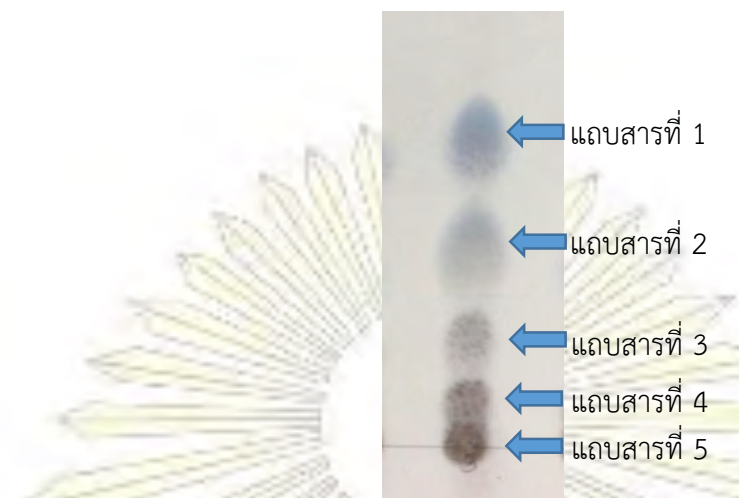


รูปที่ 3-5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition และ Concentration ของส่วนแยก A3 และ A4

3.3 การแยกสารจากส่วนแยก A3 โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแยกตามขนาดโมเลกุล (Size exclusion- chromatography)

3.3.1 ผลการแยกสารของส่วนแยก A3

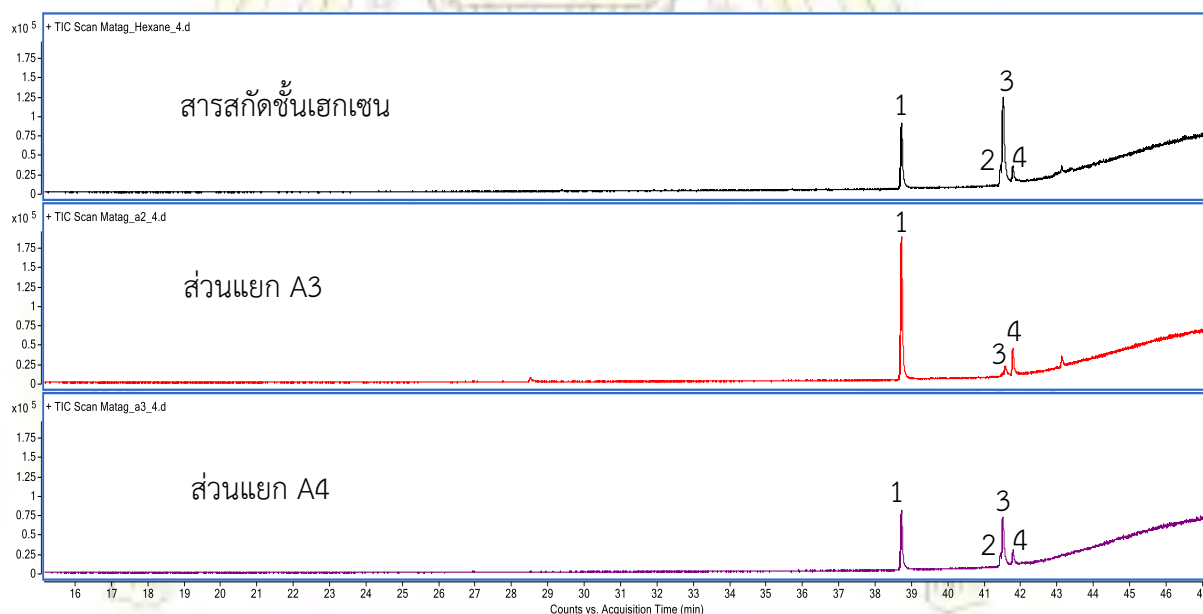
นำส่วนแยก A3 มา 2.3 กรัม ละลายด้วย 20% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน มาแยกด้วยใช้เทคนิคเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ Sephadex LH20 และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ 20% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน รวมส่วนแยกจากผล TLC ที่คล้ายกัน ได้ 7 ส่วนแยก คือ A3-1 ถึง A3-7 พบว่าส่วนแยก A3-2 ตกตะกอนเป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาแยกด้วย TLC โดยใช้ 10% เอทิลแอสีเทต ในเฮกเซนเป็นเฟสเคลื่อนที่ พบแถบสาร 5 แถบ ดังรูปภาพที่ 3-6 ทำการจุดแถบสาร 5 แถบบนซิลิกาเจล แล้วนำมารองสุญญากาศเพื่อกรองเอาซิลิกาออก ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จากผล $^1\text{H NMR}$ พบว่าทั้ง 5 แถบสารเป็นสารพวกกรดไขมัน และกลีเซอไรด์ ดังรูปภาพที่ 4 ถึง รูปที่ 8 ในภาคผนวก จึงไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากการแยกโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เนื่องจากสารสกัดมีส่วนประกอบหลักเป็นกรดไขมัน และกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นไปตามการรายงานของ Sengupta⁷ และ Ramadan¹³



รูปที่ 3-6 ผล TLC ของส่วนแยก A3-2 ที่ใช้ 10% เอทิลแอสีเทตในเฮกเซนเป็นเฟสเคลื่อนที่

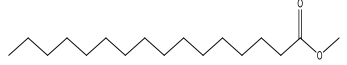
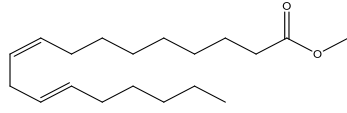
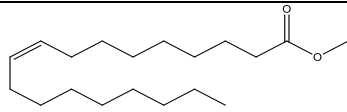
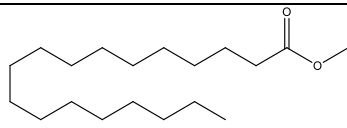
3.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายในชั้นเฮกเซน ส่วนแยก A3 และ A4 โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS)

จากผลการทดลองการแยกสารด้วยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี และตรวจสอบองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ โดยดูผลจาก ^1H NMR ดังรูปที่ 4 ถึง รูปที่ 8 ในภาคผนวก พบว่าสารสกัดในชั้นเฮกเซน ส่วนแยก A3 และ A4 มีองค์ประกอบหลักเป็นสารไขมันในกลุ่มกรดไขมัน และกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นไปตามการทดลองของ Sengupta⁷ และ Ramadan¹³ ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงสนใจนำสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายในชั้นเฮกเซน ส่วนแยก A3 และ A4 มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-MS เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมี โดยตัวอย่างโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 3-7 และองค์ประกอบทางเคมี แสดงในตารางที่ 3-4



รูปที่ 3-7 โครมาโทแกรมของสารสกัดชั้นเฮกเซน ส่วนแยก A3 และ A4

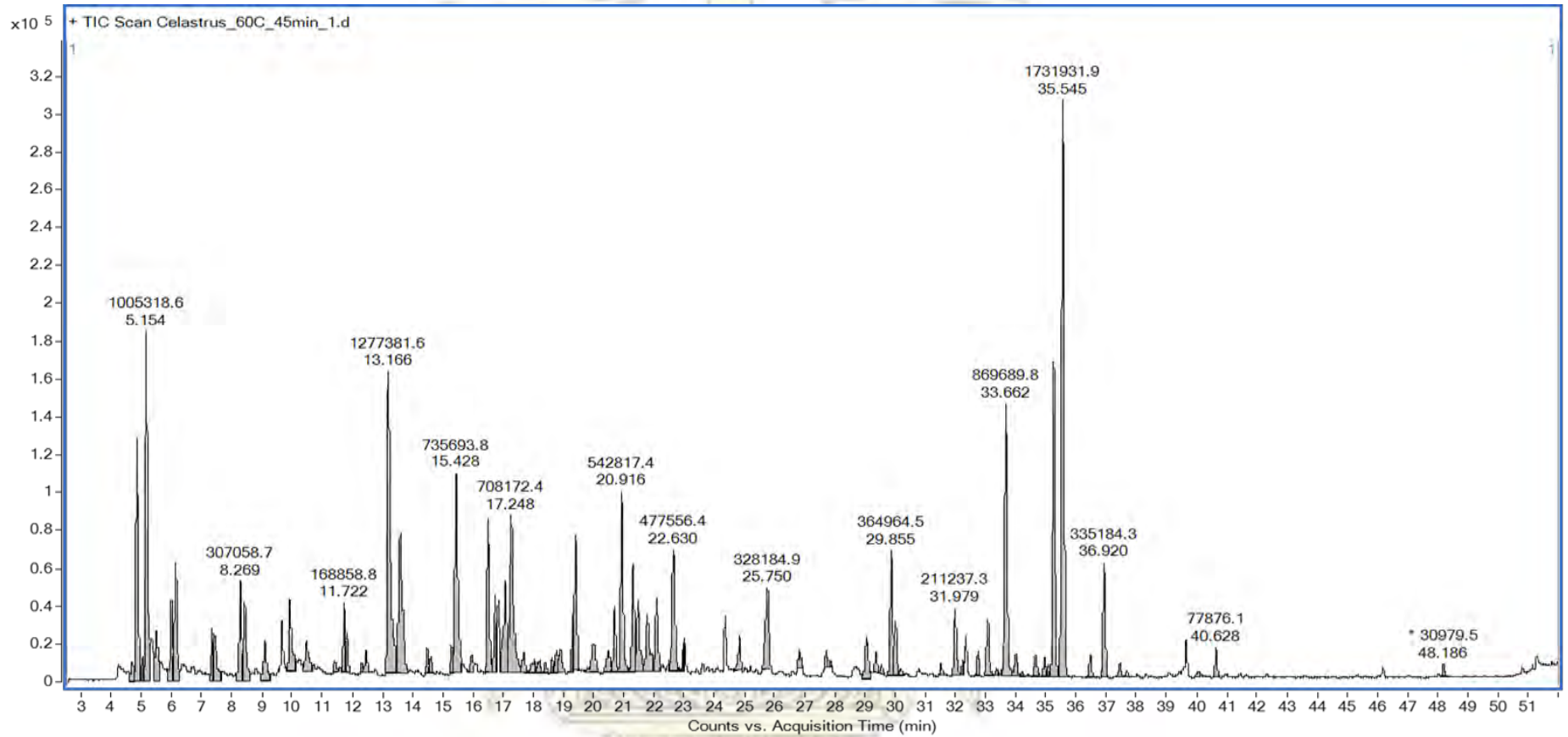
ตารางที่ 3-4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเฮกเซน ส่วนแยก A3 และ A4 ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรี

Peak	สารประกอบ	Retention Time (minute)	% of total			สูตรโมเลกุล	กลุ่มสารประกอบ	โครงสร้าง
			เฮกเซน	A3	A3			
1	Palmitic acid, methyl ester	38.7	37.04	81.63	46.14	$C_{17}H_{34}O_2$	Saturated fatty acid	
2	Linoleic acid, methyl ester	41.4	5.17	-	5.64	$C_{19}H_{34}O_2$	Unsaturated fatty acid	
3	Oleic acid, methyl ester	41.5	52.11	4.50	39.0	$C_{19}H_{36}O_2$	Unsaturated fatty acid	
4	Stearic acid, methyl ester	41.8	5.68	11.50	9.23	$C_{19}H_{38}O_2$	Saturated fatty acid	

จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซนประกอบด้วย กรดไขมัน (fatty acid) 2 กลุ่ม ได้แก่ กรดไขมันไม่อิ่มตัว (57.28%) และกรดไขมันอิ่มตัว (42.72%) ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ oleic acid (52.11%) และ linoleic acid (5.17%) กรดไขมันอิ่มตัว คือ palmitic acid (37.04%) และ stearic acid (5.68%) ส่วนแยก A3 ประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acid) 2 กลุ่ม ได้แก่ กรดไขมันอิ่มตัว (95.50%) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (4.50%) ซึ่งกรดไขมันอิ่มตัว คือ palmitic acid (81.63%), azelaic acid acid (2.37%) และ stearic acid (11.5%) กรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ oleic acid (4.50%) ส่วนแยก A4 กรดไขมัน (fatty acid) 2 กลุ่ม ได้แก่ กรดไขมันอิ่มตัว (55.37%) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (44.63%) ซึ่งกรดไขมันอิ่มตัว คือ palmitic acid (46.14%) และ stearic acid (9.23%) กรดไขมันไม่อิ่มตัว คือ linoleic acid (5.64%) และ oleic acid (39.0%)

จากผลการวิเคราะห์สารสกัดชั้นเฮกเซนเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยของ Sengupta และคณะ⁶ มีความสอดคล้องกันโดยพบว่าองค์ประกอบหลักของสารสกัดชั้นเฮกเซนประกอบด้วย กรดไขมัน (fatty acid) ได้แก่ oleic acid (54.2%), palmitic acid acid (26.1%), linoleic (11.2%) และ stearic acid (2.75%) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramadan และคณะ¹³ ที่ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดกระทงลายใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย และวิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดในชั้นเฮกเซนโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีพบว่า สารสกัดชั้นเฮกเซนประกอบด้วย fatty acid ได้แก่ Oleic (54.2%) เป็นองค์ประกอบหลักตามด้วย palmitic (26.1%), linoleic (11.2%) และ Stearic (2.75%)

รูปที่ 3-8 แสดงโครมาโทแกรมสารระเหยของเมล็ดกระทงลาย



ตารางที่ 3-5 แสดงองค์ประกอบของสารระเหยจากเมล็ดกระทงลาย

Peak	สารประกอบ	Retention Time (minute)	% of total
1	Ethylenediamine	4.686	0.36
2	Acetic acid, methyl ester	4.843	3.47
3	2-methyl-Propanal	5.030	0.35
4	Acetic acid	5.154	5.33
5	Ethyl Acetate	5.482	1.08
6	3-methyl-Butanal	5.986	1.17
7	2-methyl-Butanal	6.124	1.78
8	1-Pentanol	7.346	0.67
9	2-methyl-1-Butanol	7.426	0.91
10	Toluene	8.269	1.63
11	Methyl 3-methylbutanoate	8.415	1.44
12	Hexanal	9.074	0.86
13	methyl-Pyrazine	9.899	1.48
14	3-methyl-Butanoic acid	10.477	0.77
15	3-Furanmethanol	11.405	0.18
16	1-Butanol, 3-methyl-acetate	11.722	0.90
17	1-Butanol, 2-methyl-acetate	11.81	0.52
18	4-methyl-Pentanoic acid, methyl ester	12.305	0.10
19	Styrene	12.434	0.35
20	2,5-dimethyl-Pyrazine	13.166	6.78
21	3-Furancarboxylic acid, methyl ester	13.571	0.36
22	1-methylethylidene-Cyclohexane	14.465	3.47
23	3-(1-methylethyl)-Cyclohexene	14.595	0.35
24	Dihydro-4-methyl-2(3H)-Furanone	15.278	5.33
25	Benzaldehyde	15.428	1.08
26	Dimethyl trisulfide	15.953	1.17
27	6-methyl-5-Hepten-2-one	16.478	2.41
28	2-pentyl-Furan	16.737	1.17
29	2-ethyl-6-methyl-Pyrazine	17.059	2.11
30	2,6-dimethyl-4-Pyridinamine	17.248	3.76

Peak	สารประกอบ	Retention Time (minute)	% of total
31	Ketone,3 α ,4,5,6,7,7 α -hexahydro-7 α -methyl-1 α -indanyl methyl	17.663	0.37
32	1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	18.012	0.33
33	3-methoxy-Phenylalanine	18.191	0.25
34	1-methyl-4-(1-methylethyl)-Benzene	18.378	0.13
35	1-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (R)-Cyclohexene	18.603	0.23
36	N-carbobenzyloxy-L-tyrosyl-L-valine	18.774	0.35
37	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene,3	18.878	0.46
38	Benzeneacetaldehyde	19.299	0.68
39	(3Z)-3,7-dimethylocta-1,3,6-triene	19.395	1.97
40	1-(1H-pyrrol-2-yl)-Ethanone	19.998	0.81
41	2,7-dimethyloct-7-en-5-yn-4-yl, Hexanoic acid	20.475	0.51
42	α -Methyl- α -[4-methyl-3-pentenyl]-oxiranemethanol	20.679	0.98
43	3-ethyl-2,5-dimethyl-Pyrazine	20.916	2.88
44	2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine	21.288	1.76
45	2-Nonanone	21.466	1.41
46	Benzoic acid, methyl ester	21.768	1.47
47	Nonanal	22.073	1.26
48	Phenylethyl Alcohol	22.63	2.53
49	Octanoic acid, methyl ester	22.987	0.51
50	3,5-diethyl-2-methyl-Pyrazine	24.833	0.56
51	4(1H)-Quinolinone, octahydro-4a,8a-dimethyl-	25.75	1.74
52	2,5-dimethyl-3-(2-methylpropyl)-Pyrazine	26.802	0.32
53	Nonanoic acid, methyl ester	27.71	0.18
54	6,7-Dimethoxy-1-styryl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline	27.852	0.07
55	2-Isoamyl-6-methylpyrazine	29.028	0.93
56	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	29.371	0.31

Peak	สารประกอบ	Retention Time (minute)	% of total
57	endo-1,5,6,7-Tetramethylbicyclo[3.2.0]hept-6-en-3-ol	29.549	0.15
58	octahydro-4H-Cyclopenta[b]pyridin-4-one	29.855	1.94
59	2-hexyl-5-methyl-Oxazole	30.003	0.89
60	2-Ethyl-2,3-dihydro-1H-indene	30.167	0.11
61	2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-Pyrazine	31.979	1.12
62	Methyl 8-methyl-nonanoate	32.249	0.15
63	2,2,8-Trimethyltricyclo[6.2.2.0 ^{1,6}]dodec-5-ene	32.744	0.33
64	beta-patchoulene	33.064	0.88
65	(-)-Aristolene	33.342	0.12
66	1,2,4,8-Tetramethylbicyclo[6.3.0]undeca-2,4-diene	33.662	4.61
67	(-)-Tricyclo[6.2.1.0(4,11)]undec-5-ene, 1,5,9,9-tetramethyl- (isocaryophyllene-11)	33.997	0.44
68	[1R-(1 α ,3 $\alpha\beta$,4 α ,8 $\alpha\beta$,9S*)]-1,4-Methanoazulen-9-ol, decahydro-1,5,5,8a-tetramethyl	34.195	0.06
69	cis-(-)-2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1H)benzocycloheptene	34.647	0.36
70	Azulene, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1 α ,3 $\alpha\beta$,4 α ,7 β)]-	34.95	0.34
71	Cedran-diol, 8S,14-	35.087	0.16
72	Naphthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl),(1 α ,4 $\alpha\beta$,8 α)	35.253	4.97
73	2-(3-Isopropyl-4-methyl-pent-3-en-1-ynyl)-2-methyl-cyclobutanone	35.545	9.19
74	[1S-(1 α ,4 α ,7 α)]-Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)	36.457	0.36
75	2,2-Dimethyl-1-(2,4,6-trimethylphenyl)propan-1-one	36.92	1.78
76	1,4-dichloro-2,5-dimethoxy-benzene	37.455	0.20

Peak	สารประกอบ	Retention Time (minute)	% of total
77	(-)-Tricyclo[6.2.1.0(4,11)]undec-5-ene, 1,5,9,9-tetramethyl- (isocaryophyllene-I1)	37.674	0.09
78	Patchoulene	40.06	0.11
79	Methyl 10-methyl-undecanoate	40.628	0.41
80	Methyl tetradecanoate	48.186	0.16
Total			100

3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยของเมล็ดกระทงลายโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอ็กแทรกชัน/แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (HP-SPME/GC-MS)

เนื่องจากตอนปั่นเมล็ดกระทงลายผู้วิจัยได้กลิ่นของเมล็ดกระทงลาย และยังไม่มีการวิจัยรายงานเกี่ยวกับสารที่ระเหยออกมาจากเมล็ดกระทงลาย ดังนั้นจึงสนใจวิเคราะห์หาสารที่ระเหยออกมาจากเมล็ดกระทงลายโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซโซลิดเฟสไมโครเอ็กแทรกชัน/แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (HP-SPME/GC-MS) แสดงผลดังโครมาโทแกรม รูปที่ 3-8 และองค์ประกอบของสารระเหยของเมล็ดกระทงลาย ดังตารางที่ 3-5

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยจากเมล็ดกระทงลาย พบว่ามีองค์ประกอบของสาร 80 สาร ซึ่ง 10 องค์ประกอบที่มีปริมาณสูงสุดอยู่ในกลุ่ม alkaloid ได้แก่ 2,6-dimethyl-4-pyridinamine (3.76%), 2,5-dimethylpyrazine (3.36%) และ 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine (2.88%) กลุ่ม sesquiterpenoid ได้แก่ α -Cadinene (4.97%) และ 1,2,4,8-tetramethylbicyclo [6.3.0]undeca-2,4-diene กลุ่ม ketone คือ 2-(3-Isopropyl-4-methyl-pent-3-en-1-ynyl)-2-methyl-cyclobutanone (9.19%) กลุ่ม furan คือ methyl-3-furoate (6.78%) กลุ่ม acid คือ acetic acid (5.33%) กลุ่ม aldehyde คือ benzaldehyde กลุ่ม ester คือ methyl acetate (3.47%) ดังตารางที่ 3-6

ตารางที่ 3-6 แสดง 10 องค์ประกอบที่มีปริมาณสูงสุดของสารระเหยจากเมล็ดกระทงลาย

สารประกอบ	สูตรโมเลกุล	PubChem CID/CAS	กลุ่มสารประกอบ
2-(3-Isopropyl-4-methyl-pent-3-en-1-ynyl)-2-methyl-cyclobutanone	C ₁₄ H ₂₀ O	-	Ketone
methyl-3-furoate	C ₆ H ₆ O ₃	13129-23-2	Furan
Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	64-19-7	Acid
α -Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	24406-05-1	Sesquiterpenoid
1,2,4,8-tetramethylbicyclo[6.3.0]undeca-2,4-diene	C ₁₅ H ₂₄	137235-51-9	Bicyclic-sesquiterpenoid
Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	100-52-7	Aldehyde
2,6-dimethyl-4-pyridinamine	C ₇ H ₁₀ N ₂	3512-80-9	Alkaloid
Methyl acetate	C ₃ H ₆ O ₂	79-20-9	Ester
2,5-dimethylpyrazine	C ₆ H ₈ N ₂	123-32-0	Alkaloid
3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine	C ₈ H ₁₂ N ₂	13360-65-1	Alkaloid

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดสารจากเมล็ดกระทงลายโดยสกัดด้วยตัวทำละลายได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอสีเทต และเมทานอล พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซนมีปริมาณมากที่สุด เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคการดักจับอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยใช้ Trolox เป็น positive control พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทตและเมทานอล แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีค่า TEAC เท่ากับ 0.16, 0.23 และ 0.10 mg Trolox/g Sample ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแอลฟาโทลูอิลโคไซด์และไลเปสที่ความเข้มข้น 25 mg/mL พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทตและเมทานอล แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาโทลูอิลโคไซด์ เท่ากับ 100, 98.2 และ 97.3% ตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 73.5, 85.4 และ 83.4% ตามลำดับ สารสกัดชั้นเฮกเซนนำมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์ โครมาโทกราฟีได้ 16 ส่วนแยก (A1-A16) พบว่าส่วนแยก A3 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน ซึ่งผล ^1H NMR ของสารสกัดชั้นเฮกเซน และส่วนแยก A3 มีองค์ประกอบหลักเป็นกรดไขมัน และกลีเซอไรด์เพียงแต่สัดส่วนและชนิดของกรดไขมันแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของส่วนแยก A3 ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) พบว่าส่วนแยก A3 ประกอบด้วย palmitic acid (81.63%), oleic acid (4.50%) และ stearic acid (11.5%) และสารสกัดชั้นเฮกเซนประกอบด้วย oleic acid (52.11%), palmitic acid (37.04%), stearic acid (5.68%) และ linoleic acid (5.17%) นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์องค์ประกอบสารระเหยของเมล็ดกระทงลายพบว่าสารระเหยของเมล็ดที่มีปริมาณสูง คือ สารในกลุ่ม alkaloid และกลุ่ม sesquiterpenoids

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดลองทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาโทลูอิลโคไซด์ และไลเปส พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอสีเทตและเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาโทลูอิลโคไซด์ และไลเปสได้ดี ดังนั้นควรมีการศึกษาและแยกสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาโทลูอิลโคไซด์ และไลเปส

เอกสารอ้างอิง

1. Palu, A. K.; Kim, A. H.; West, B. J.; Deng, S.; Jensen, J.; White, L. The Effects of *Morinda citrifolia* L.(noni) on the Immune System: Its Molecular Mechanisms of Action. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *115*, 502-506.
2. Masuda, T.; Jitoe, A. Antioxidative and Antiinflammatory Compounds from Tropical Gingers: Isolation, Structure Determination and Activities of Cassumunins A, B, and C, New Complex Curcuminoids from *Zingiber cassumunar*. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1850-1856.
3. ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ วันที่สืบค้นข้อมูล 29 มีนาคม 2560 จากเว็บไซต์ http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2465
4. วุฒิ วุฒิธรรมเวช, หนังสือสารานุกรมสมุนไพร, โอเดียนสโตร์, **2540**, 79
5. อัปสร และคณะ, หนังสือพืชและอาหารสมุนไพรท้องถิ่นบนพื้นที่สูง, สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) วันที่สืบค้นข้อมูล 29 มีนาคม 2560 จากเว็บไซต์ <https://medthai.com/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%97%E0%B8%87%E0%B8%A5%E0%B8%B2%E0%B8%A2/>
6. Sengupta, A.; Bhargava, H. N. Investigation of the seed fat of *Celastrus Panzculatus*. *J. Sci. Food Agric.* **1970**, *21*, 628-631.
7. Den, H. J.; Kruk, C.; Nanavati, D.; Sukh, D. Stereochemistry of malkanguniol and stereostructures of some other related polyalcohols from *Celastrus paniculatus* Willd. *Tetrahedron Letter.* **1974**, *26*, 2219-2222.
8. Sengupta, A.; Sengupta, C. Chemical investigations of *Celastrus paniculatus* seed oil. *Fat Sci. Technol.* **1987**, *89*, 119-123.
9. Yong, Q. T.; Tong, X. W.; Zi, Z.; Zhen, T.; Yao, Z. Sesquiterpene polyol esters from *Celastrus paniculatus*. *J Nat Prod.* **1991**, *54(5)*, 1383-1386

10. Yong, Q. T.; Yao, Z. C. Sesquiterpenoids from *Celastrus paniculatus*. *J Nat Prod.* **1993**, *56(1)*, 122-125.
11. Kun, Z.; Yanhong, W.; Yaozu, C.; Yongqiang, T.; Hai, J.; Huang, H.; Huang, Z.; Fan, J. Sesquiterpenes from *Celastrus paniculatus* subsp. *Paniculatus*. *Phytochemistry.* **1998**, *48(6)*, 1067-1069
12. Borbone, N.; Borrelli, F.; Montesano, D.; Izzo, A.; Marino, S.D.; Capasso, R.; Zollo, F. Identification of a new sesquiterpene polyol ester from *Celastrus paniculatus*. *Planta Medica.* **2007**, *73(8)*, 792794.
13. Ramadan, M. F.; Kinni, S. G.; Rajanna, L. N.; Seetharam, Y. N.; Seshagiri, M. Fatty Acid, Bioactive Lipid and Radical Scavenging Acitivity of *Celastrus paniculatus* Willd. Seed oil. *Sci. Hortic.* **2009**, *123*, 104-109.
14. Zohera, F. T.; Habib, M. R.; Imam, M. Z.; Mazumder, E. H.; Rana, S. Comparative Antioxidant Potential of Different Extracts of *Calastrus paniculatus* Willd. Seed. *S. J. Pharm. Sci.* **2010**, *3*, 68-74.
15. Alama, B.; Haque, E. Anti-Alzheimer and Antioxidant Activity of *Celastrus paniculatus* Seed. *Iran. J. Pharm. Sci.* **2011**, *7(1)*, 49-56.
16. Arora, N.; Shashi, P. GC-MS analysis of the essential oil of *Celastrus paniculatus* Willd. Seed and antioxidant, anti-inflammatory study of its various solvent extracts. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *61*, 345-351.
17. Weston, T. R.; Derner, J. D.; Murrieta, C. M.; Rule, D. C.; Hess, B. W. Comparison of Catalysts for Direct Transesterification of Fatty Acid in Freeze-Dried Forage Samples. *Crop Sci.* **2008**, *48*, 1636-1641.
18. สืบค้นเมื่อวันที่ 19 เมษายน พ.ศ. 2560 <http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/gas-chromatograph-mass-spectrometer-gcms>
19. Kim, Y. M.; Wang, M. H.; Rhee, H. I. A Novel α -Glucosidase Inhibitor from Pine Bark. *Carbohydrate Research.* **2004**, *339(3)*, 715-717.
20. Slanc, P.; Doljak, B.; Mlinaric, A.; Strukelj, B. Screening of Wood Damaging Fungi and Macrofungi for Inhibitors of Pancreatic Lipase . *Phytother. Res.* **2004**, *18(9)*, 758-762.



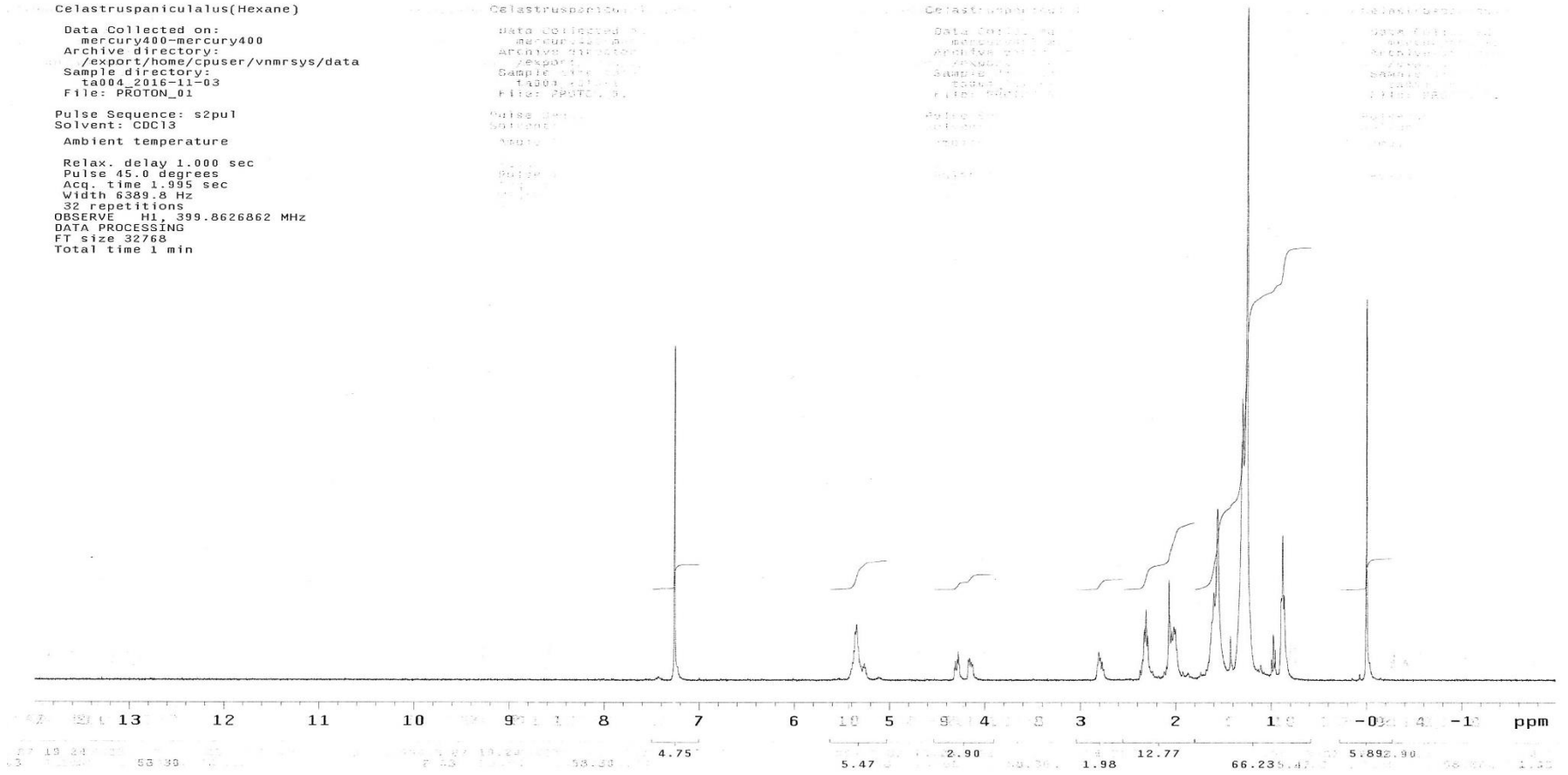
ภาคผนวก

Celastruspaniculatus(Hexane)
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
ta004_2016-11-03
File: PR0TON_01
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1 399.8626862 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min

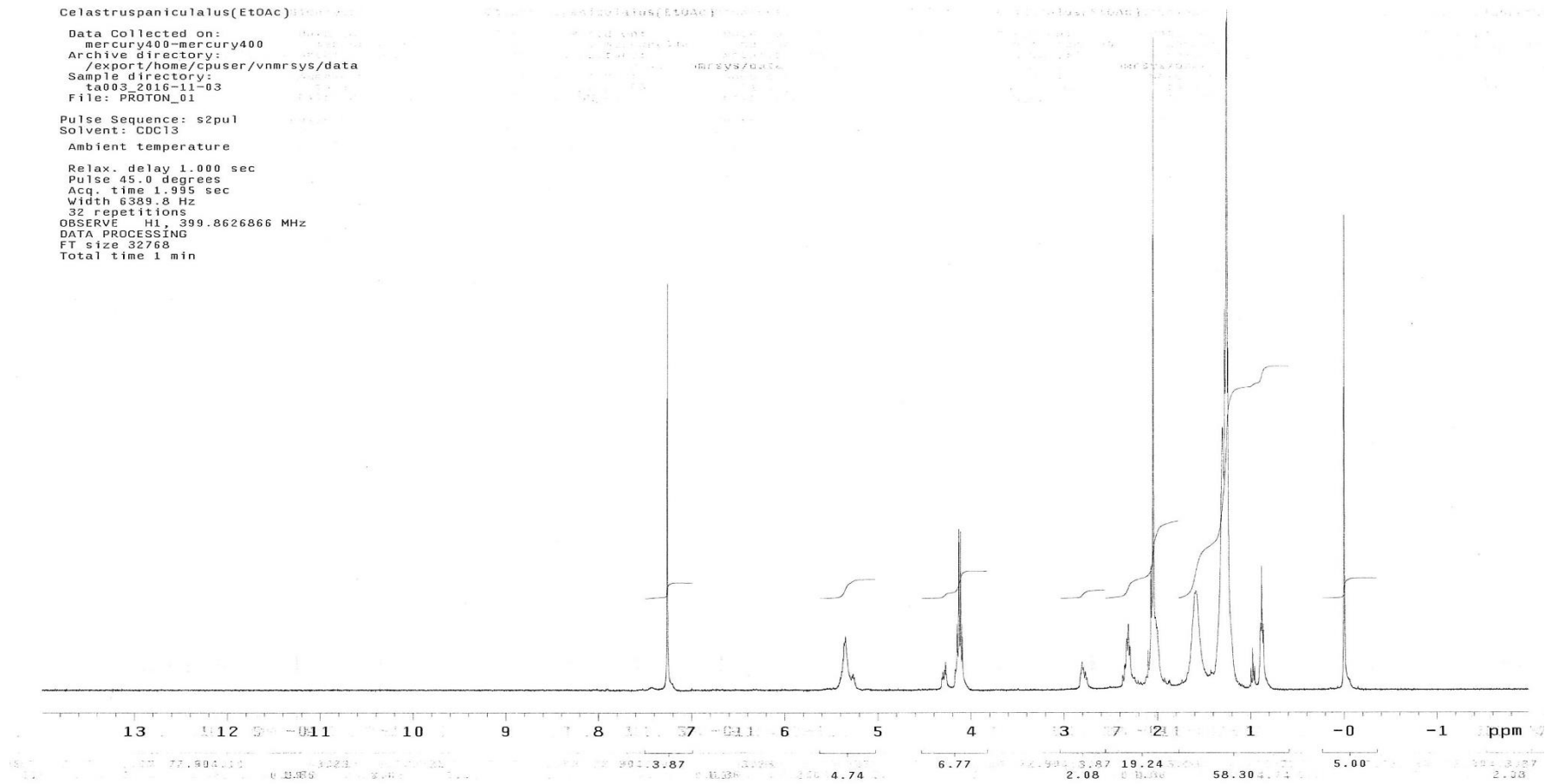
Celastruspaniculatus
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
ta004_2016-11-03
File: PR0TON_01
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1 399.8626862 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min

Celastruspaniculatus
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
ta004_2016-11-03
File: PR0TON_01
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1 399.8626862 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min

Celastruspaniculatus
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
ta004_2016-11-03
File: PR0TON_01
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1 399.8626862 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 min



รูปที่ 1 ¹H NMR ของสารสกัดชั้นเฮกเซน

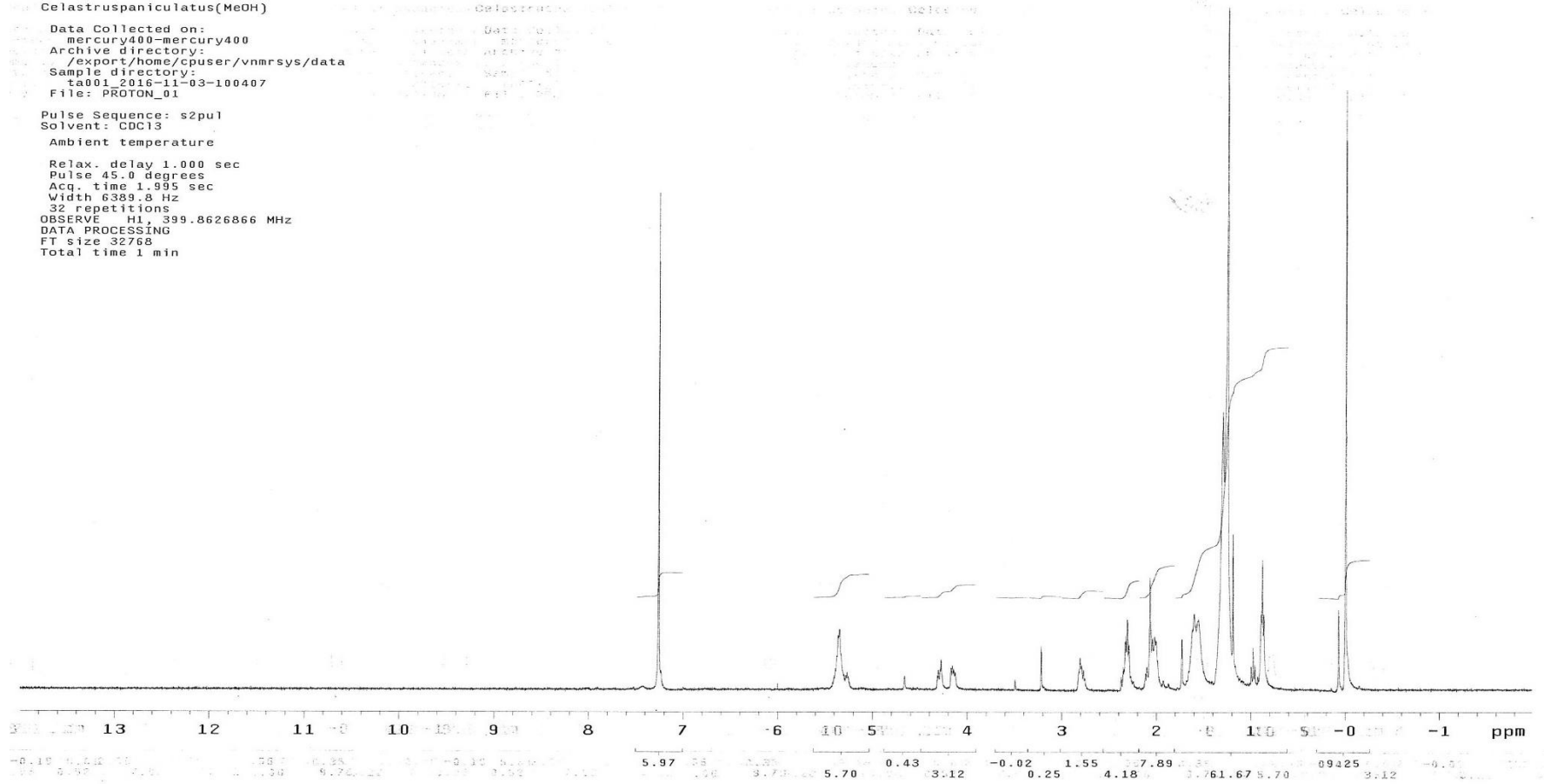


รูปที่ 2 ^1H NMR ของสารสกัดชั้นเอทิลแอซีเทต

Celastrus paniculatus (MeOH)

Data Collected on: mercury400-mercury400
 Archive directory: /export/home/cpuser/vnmrsys/data
 Sample directory: ta001_2015-11-03-100407
 File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.995 sec
 Width 6389.8 Hz
 32 repetitions
 OBSERVE H1, 399.8626866 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 1 min

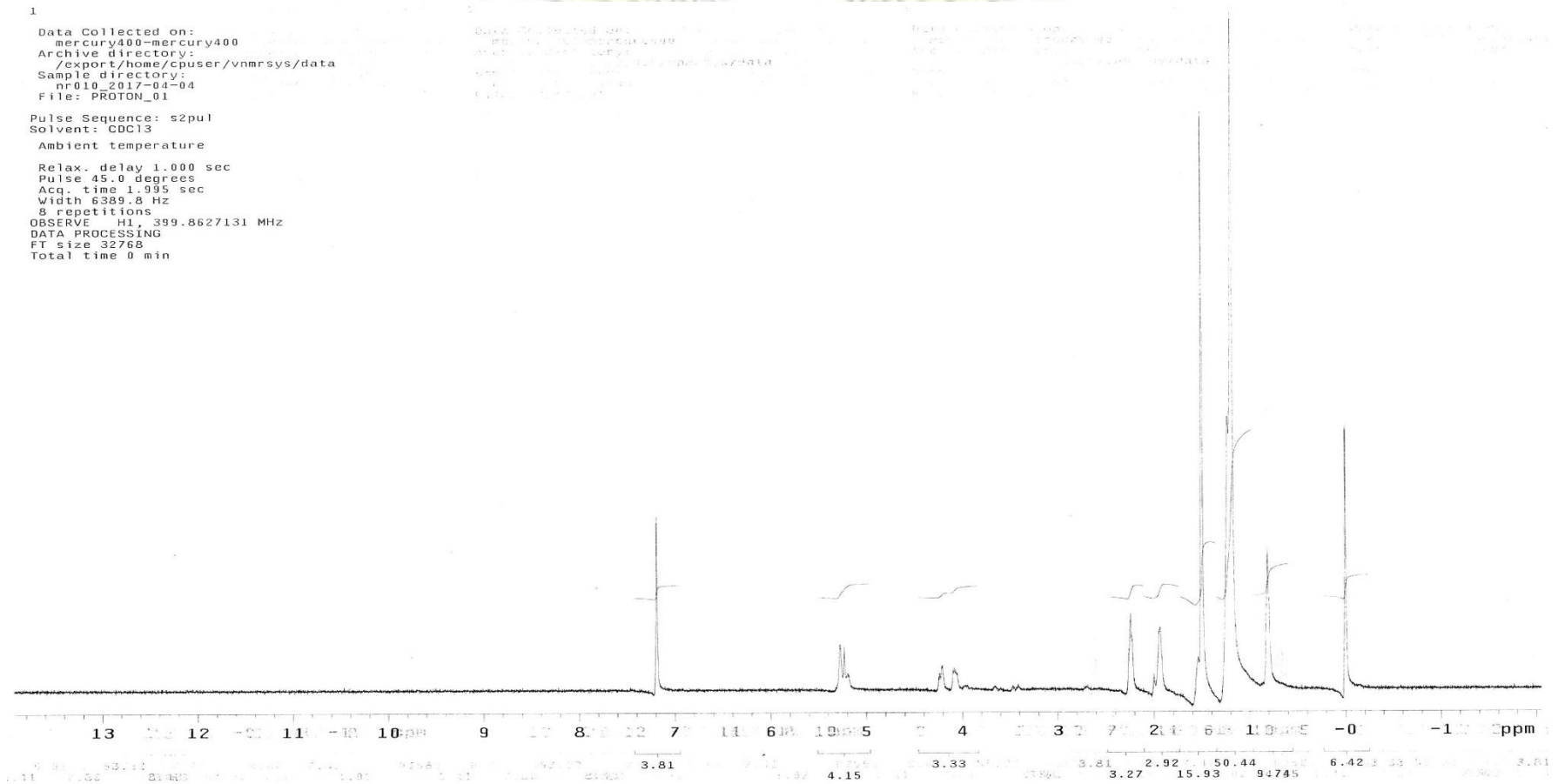


1

Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /export/home/cpuser/vnmrsys/data
 Sample directory:
 nr010_2017-04-04
 File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature

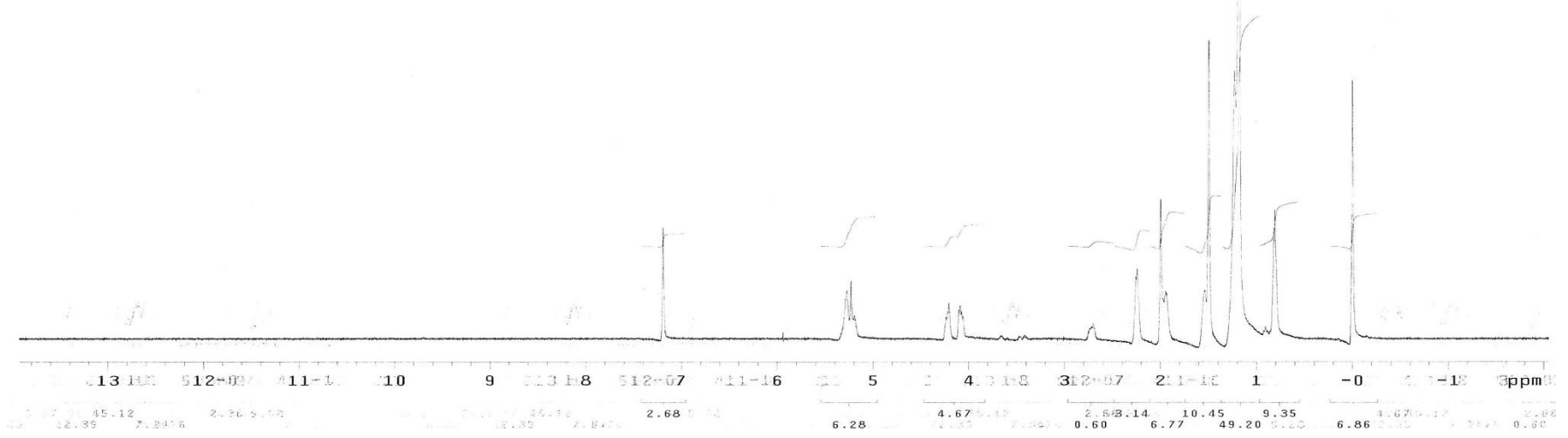
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.995 sec
 Width 6389.8 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE F1: 399.8627131 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min



รูปที่ 4 ^1H NMR ของแถบสารที่ 1

2
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr002_2017-04-05
File: PROTON_01
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
& repetitions
OBSERVE H1, 399.8627135 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min

2
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr002_2017-04-05
File: PROTON_01
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
& repetitions
OBSERVE H1, 399.8627135 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min



รูปที่ 5 1H NMR ของแถบสารที่ 2

3

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr011_2017-04-04
File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 399.8627131 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min

3

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr011_2017-04-04
File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 399.8627131 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr011_2017-04-04
File: PROTON_01

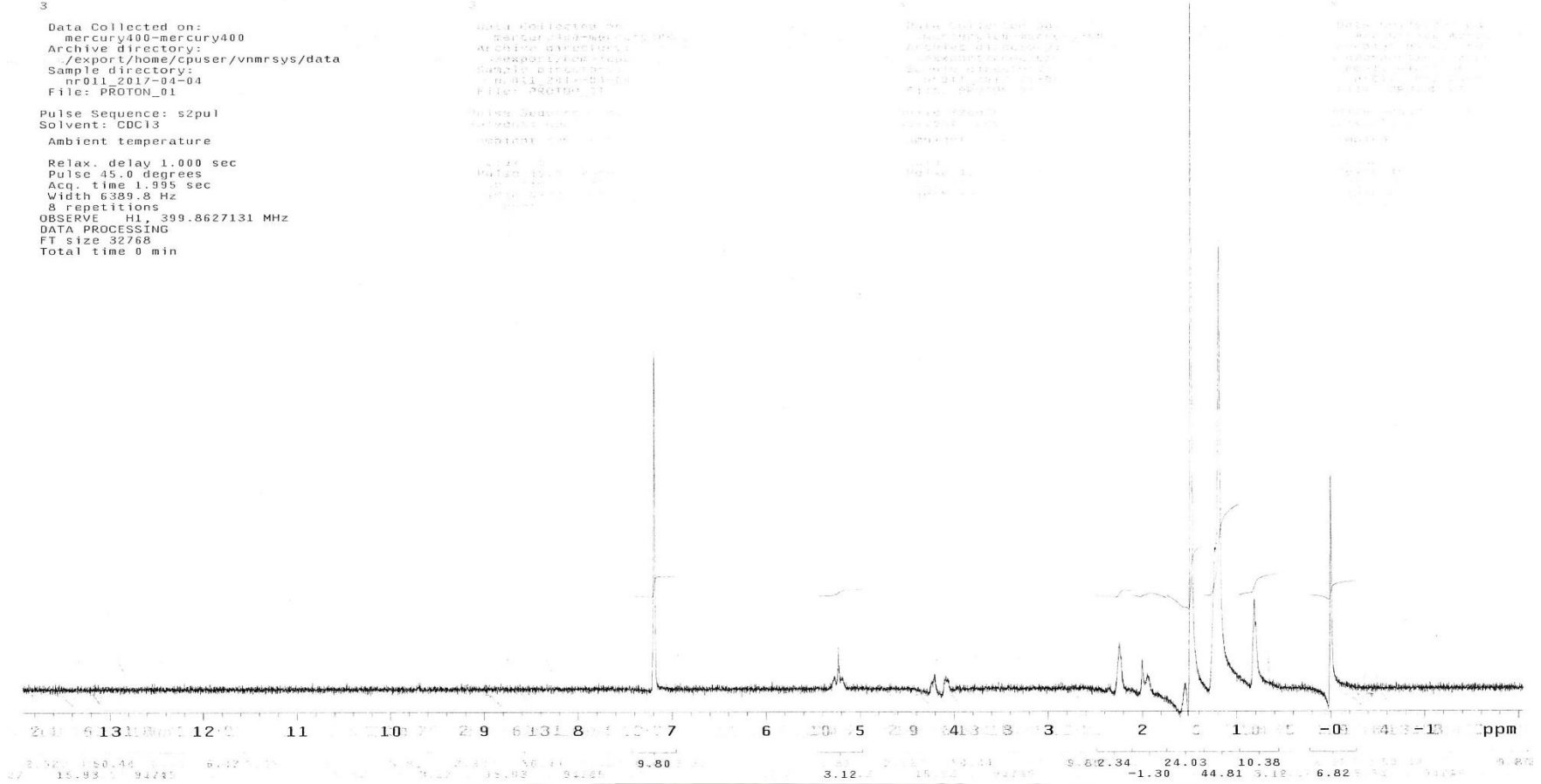
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 399.8627131 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min

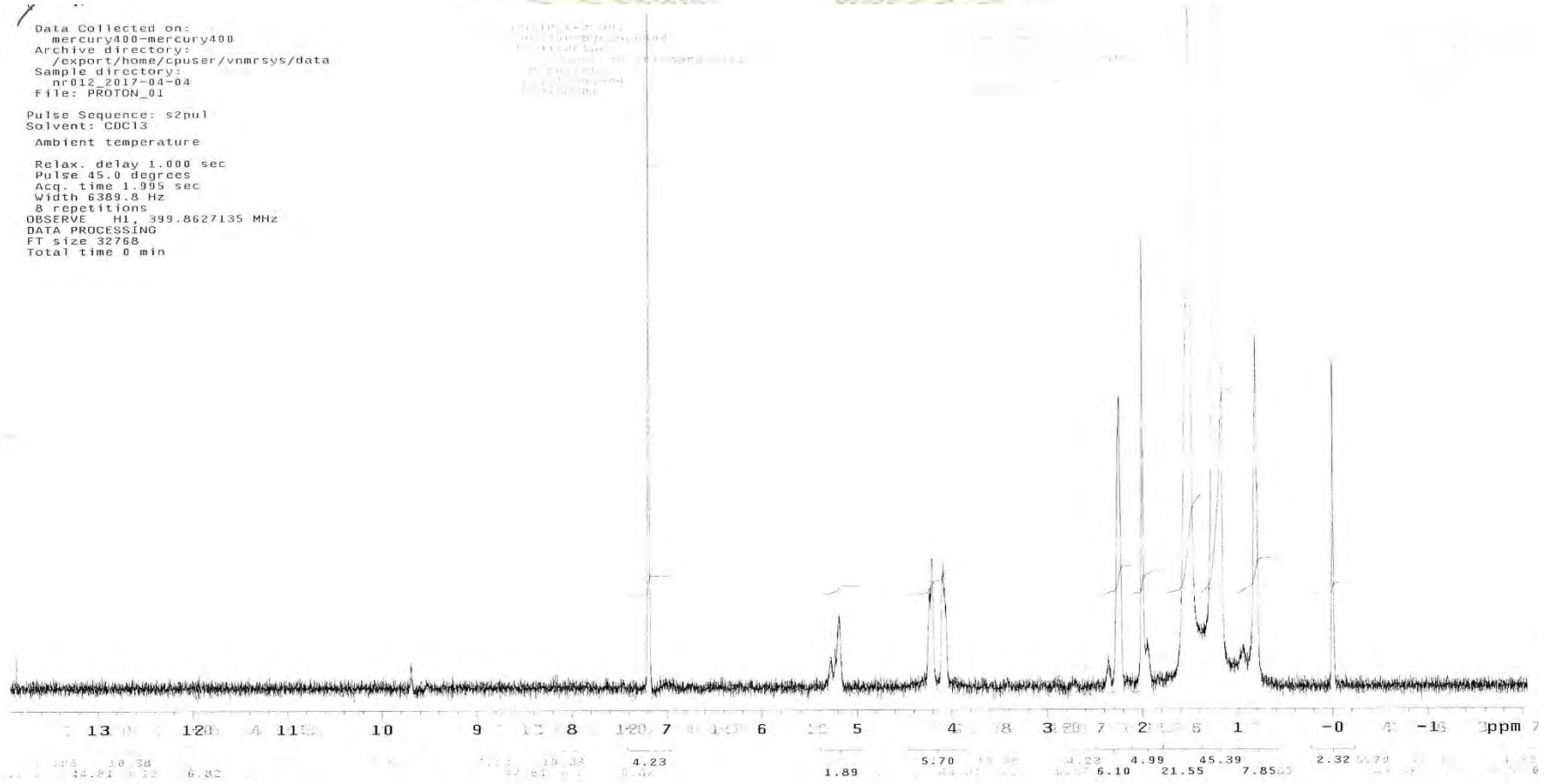
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr011_2017-04-04
File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 399.8627131 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min



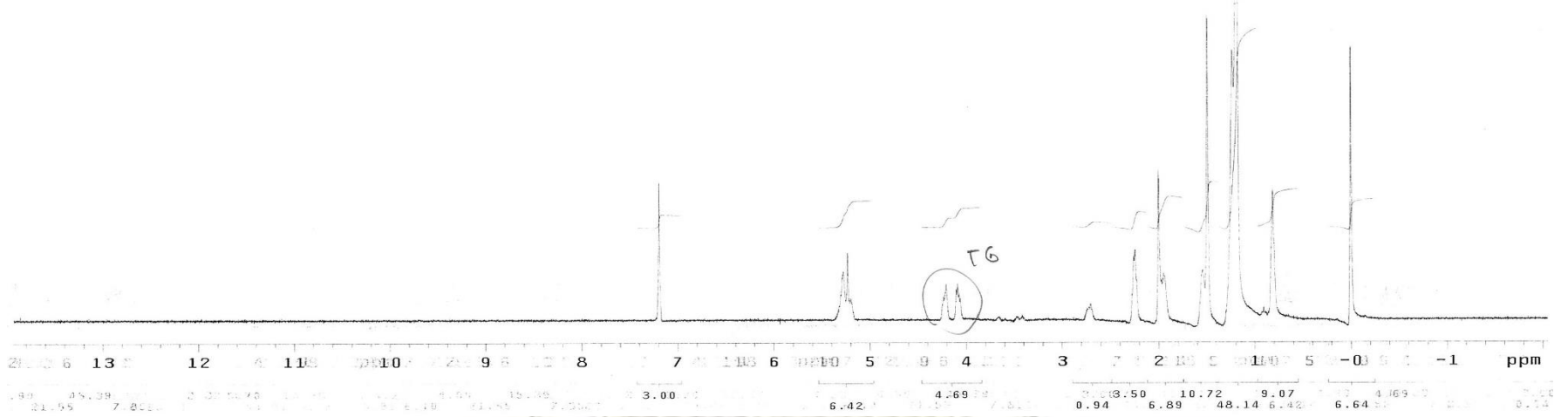
รูปที่ 6 ¹H NMR ของแถบสารที่ 3



รูปที่ 7 ^1H NMR ของแถบสารที่ 4

Data Collected On: mercury400-mercury400
Archive directory: /export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory: nr013_2017-04-04
File: PROTON_01
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE F1: 399.8627131 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min

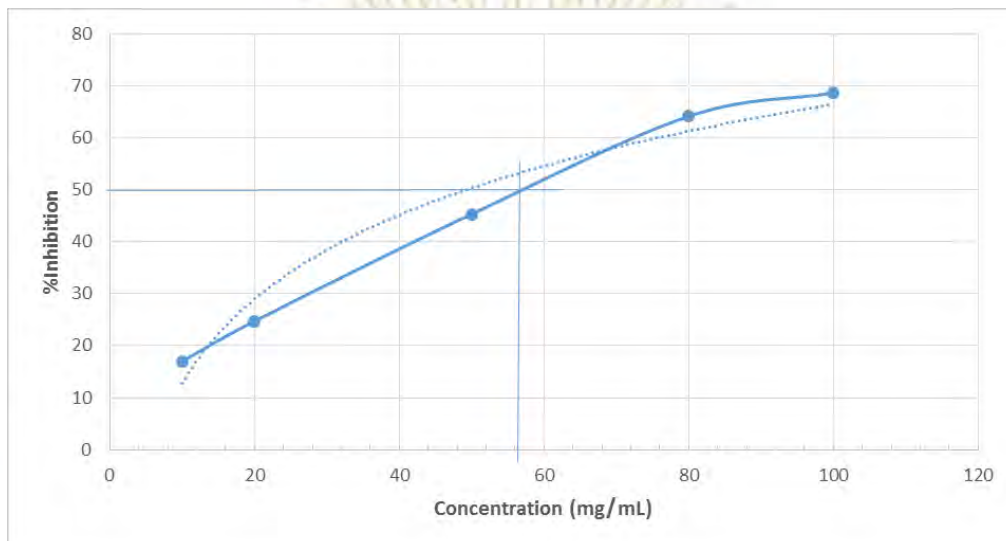
Data Collected On: mercury400-mercury400
Archive directory: /export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory: nr013_2017-04-04
File: PROTON_01
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE F1: 399.8627131 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min



รูปที่ 8 ¹H NMR ของแถบสารที่ 5

การหาค่า IC₅₀ (Half maximal inhibitory concentration)

1. ดูจากค่า %Inhibition ที่ 50 ลากมาตัดกับกราฟ แล้วลากลงมาว่าตรงกับความเข้มข้นเท่าใด



2. หาคความเข้มข้นที่ได้โดยการเทียบบัญญัติตรงยงศ์

สมมติให้ช่วงความต่างของความเข้มข้น 20 mg/mL มีความกว้าง 3.10 หากเส้นลากจากกราฟตัดแกน x ที่ตำแหน่ง 2.55 จะได้ว่า

ที่ความกว้าง 3.10 จะตัดแกน x ที่ตำแหน่ง 2.55

ถ้าความกว้าง 20 จะตัดแกน x ที่ตำแหน่ง $\frac{20 \times 2.55}{3.10} = 16.45$

ดังนั้นจะได้ว่าค่า %Inhibition ที่ 50 ตรงกับความเข้มข้น $40 + 16.45 = 56.45$ mg/mL

การหาค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

$$\text{TEAC (mgTrolox/gSample)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ Trolox } (\mu\text{g/mL})}{\text{IC}_{50} \text{ Sample (mg/mL)}}$$

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวณัฐธิดา มานะไชย เกิดเมื่อวันที่ 2 พฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดน่าน สำเร็จการศึกษาในชั้นระดับมัธยมศึกษาตอนปลายแผนกวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ ที่โรงเรียนสตรีศรีน่าน จังหวัดน่าน และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารรถที่ติดต่อได้คือ 77 หมู่ 5 ตำบลท่าน้ำว อำเภอกู่เพียง จังหวัดน่าน รหัสไปรษณีย์ 55000

