



การศึกษาหาสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากดอกและใบโสน

โดย

นางสาวอุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาหาสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากดอกและใบโสน

โดย

นางสาวอุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีศึกษา

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF COMPOUNDS FROM
FLOWERS AND LEAVES OF *SESBANIA JAVANICA* MIQ**

By

Utaiwan Loedsaksaesakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Chemistry

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2007

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การศึกษาหาสูตรโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากดอกและใบโสน” เสนอโดย นางสาวอุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรษา ปานเจริญ

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศุภชัย สุภลักษณ์นารี)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ลีจรรย์เนียร)

...../...../.....

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ นิมิตรวัฒน์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.นฤมล เพ็ญขาว)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรษา ปานเจริญ)

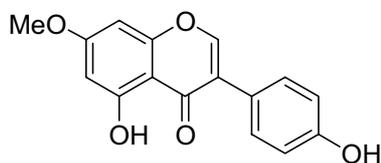
...../...../.....

46301307 : สาขาวิชาเคมีศึกษา

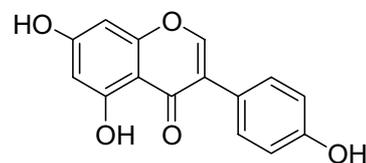
คำสำคัญ : *SESBANIA JAVANICA* MIQ.; โสน; LEGUMINOSAE; ISOFLAVONE

อุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล : การศึกษาหาสูตร โครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากดอกและใบโสน. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.อรษา ปานเจริญ. 53 หน้า.

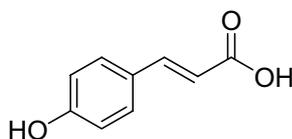
การศึกษาหาสูตร โครงสร้างของสารจากดอกและใบโสน (*Sesbania javanica* Miq) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Leguminosae สามารถแยกสารประกอบบริสุทธิ์ได้ 5 ชนิดคือ β -sitosterol (SJ-1), prunetin (SJ-2), genistein (SJ-3), 4-hydroxycinnamic acid (SJ-4) และ sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (SJ-5) การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ใช้เทคนิคทาง spectroscopy และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานแล้ว ได้นำสารทั้ง 6 สารไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH TLC screening assay พบว่า prunetin (SJ-2), genistein (SJ-3) และ 4-hydroxycinnamic acid (SJ-4) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ



prunetin (SJ-2)



genistein (SJ-3)



4-hydroxycinnamic acid (SJ-4)

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

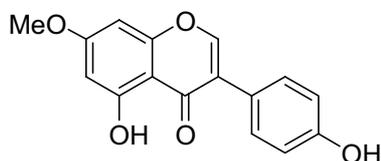
46301307 : MAJOR : CHEMICAL STUDIES

KEY WORD : *SESBANIA JAVANICA* MIQ.; LEGUMINOSAE; ISOFLAVONE

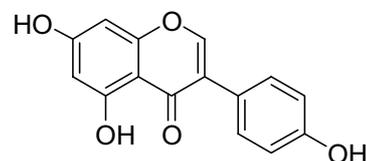
UTAIWAN LOEDSAKSAESAKUL : CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF COMPOUNDS FROM FLOWERS AND LEAVES OF *SESBANIA JAVANICA* MIQ.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. ORASA PANCHAROEN, Ph.D. 53 pp.

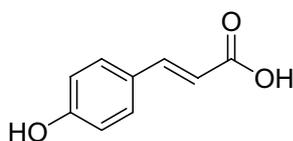
Chemical studies of the flowers and leaves of *Sesbania javanica* Miq. (Leguminosae) led to the isolation of five known compounds : β -sitosterol (**SJ-1**), prunetin (**SJ-2**), genistein (**SJ-3**), 4-hydroxycinnamic acid (**SJ-4**) and sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**SJ-5**). The structures of these compounds were identified on the basis of their spectroscopic data and comparison to those reported in the literatures. Prunetin (**SJ-2**), genistein (**SJ-3**) and 4-hydroxycinnamic acid (**SJ-4**) showed antioxidant activity by using DPPH TLC screening assay.



prunetin (**SJ-2**)



genistein (**SJ-3**)



4-hydroxycinnamic acid (**SJ-4**)

Department of Chemistry Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2007

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรษา ปานเจริญ อาจารย์ผู้ควบคุมงานวิจัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนตรวจและแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ด้วยความเมตตาตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.สุภชัย สุกถลักษณ์นารี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณศรี ลีจිරจำเนียร รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย นิมจิรวัดมน และ อาจารย์ ดร.นฤมล เพ็ญใจ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจแก้ไข ให้แนวคิดและคำแนะนำที่มีประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของส่วนสกัดต่าง ๆ ที่ได้ในการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ นายอนันต์ อธิพรชัย ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ช่วยอ่านและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ช่วยแจ้งข่าวสารต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อผู้วิจัยตลอดการเรียนปริญญาโท

ขอขอบคุณ อาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมีตลอดงานวิจัย

สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเพื่อตอบแทนพระคุณ บิดา มารดา และครู-อาจารย์ทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพประกอบ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 การทดลอง.....	4
เครื่องมือและอุปกรณ์	4
ตัวอย่างพืช.....	4
การสกัดส่วนดอกของโสน (<i>Sesbania javanica</i> Miq.)	5
การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด hexane ของดอกโสน (HF)	6
การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด EtOAc ของดอกโสน (EF)	9
การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด MeOH ของดอกโสน (MF)	14
การสกัดส่วนใบของโสน (<i>Sesbania javanica</i> Miq.)	18
การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด EtOAc ของใบโสน (EL).....	19
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ DPPH TLC screening assay	23
3 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	30
บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก	45
ประวัติผู้วิจัย	53

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่ได้จากการสกัดด้วย hexane, EtOAc และ MeOH ของดอกโสน	5
2 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่ได้จากการสกัดด้วย acetone ของส่วนสกัด HF	6
3 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารแต่ละ fraction จากส่วน acetone soluble (HF-2) ของส่วนสกัด hexane	6
4 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก HF-2-3	7
5 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารแต่ละ fraction จากส่วนสกัด EF	9
6 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-2	9
7 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-3	10
8 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-3-2	11
9 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-3-4	11
10 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-4	12
11 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่ละลายใน <i>n</i> -butanol และน้ำ	14
12 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จากส่วนสกัด MF-1	14
13 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก MF-1-2	15
14 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก MF-1-2-2	15
15 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารจากการสกัดด้วย hexane, EtOAc และ MeOH ของใบโสน	18
16 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารแต่ละ fraction จากส่วนสกัด EL	19
17 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EL-3	20
18 แสดง ¹ H-NMR ของ SJ-1	24
19 แสดง ¹ H และ ¹³ C-NMR ของ SJ-2	25
20 แสดง ¹ H และ ¹³ C-NMR ของ SJ-3	26
21 แสดง ¹ H และ ¹³ C-NMR ของ SJ-4	27
22 แสดง ¹ H-NMR ของ SJ-5	28
23 แสดง ¹ H-NMR ของ SJ-6	29
24 แสดงชนิดของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	34

สารบัญภาพประกอบ

แผนภาพที่	หน้า
1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากดอกโสน	5
2 แสดงขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของดอกโสนในส่วนสกัด hexane	8
3 แสดงขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของดอกโสนในส่วนสกัด EtOAc.....	13
4 แสดงขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของดอกโสนในส่วนสกัด MeOH	17
5 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากใบโสน	18
6 แสดงขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบโสนในส่วนสกัด EtOAc	21

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยพืชสมุนไพรกันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นจึงสามารถหาตัวอย่างพืชได้ง่าย ในพืชดังกล่าวนี้มีหลายชนิดที่ไม่เป็นพิษและนำมาบริโภคได้

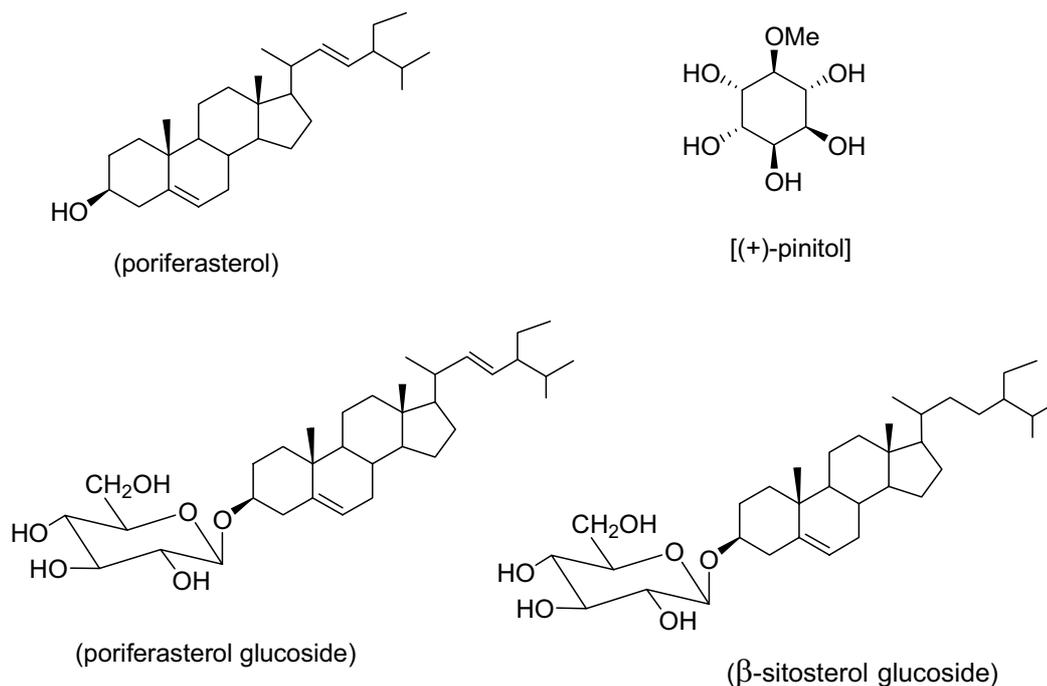
โสน (*Sesbania javanica* Miq.) เป็นพืชชนิดหนึ่งในวงศ์ถั่ว Family Leguminosae-Papilionoideae พืชในวงศ์นี้มี 482 สกุล จำนวนประมาณ 7,200 ชนิด ขึ้นทั่วไปในเขตร้อนของโลก โดยทั่วไปพบทั้งที่เป็นไม้ยืนต้น ไม้พุ่ม ไม้ล้มลุก หรือไม้เลื้อย ส่วนใหญ่เป็นพืชบก แต่ที่เป็นพืชน้ำก็มีบ้าง ตามบริเวณรากจะมีปม (nodule) ซึ่งเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ใบเป็นใบเดี่ยวหรือใบประกอบ ซึ่งพบทั้งใบประกอบแบบขนนก (pinnately compound leaf) และใบประกอบแบบนิ้วมือ (palmately compound leaf) มักมีหูใบ ใบแตกจากลำต้นแบบสลับ ใบบางชนิดเปลี่ยนไปเป็นหนาม (spine) ใบบางชนิดเปลี่ยนไปเป็นมือเกาะ (tendrils) ดอก เป็นดอกเดี่ยว หรือเป็นช่อดอกหลายแบบ ดอกย่อยเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีขนาดและสีแตกต่างกันไป ลักษณะดอกไม่ได้สัดส่วนกัน คล้ายตัวผีเสื้อ (papilionaceous form) ส่วนของดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็นแฉก 2 แฉก กลีบดอก 5 กลีบ ขนาดไม่เท่ากันเรียงซ้อนเหลื่อมกัน กลีบดอกกลีบนอกสุดมีขนาดใหญ่ กลีบในสุดมักติดกันตอนดอกอ่อน เกสรตัวผู้มี 10 อัน อาจติดกันเป็นกลุ่มเดี่ยว หรือ สองกลุ่ม เกสรตัวเมียมีรังไข่อยู่เหนือส่วนของดอก รังไข่รูปร่างยาว ภายในรังไข่มี 1 ช่อง ไข่อ่อนติดที่ผนังรังไข่ตามยาว ผล เป็นผลเดี่ยวแบบฝักยาว (legume หรือ pod) หรือฝักคอดระหว่างเมล็ด บางชนิดผลแห้งแล้วแตกตามตะเข็บ บางชนิดมีก้านยาวส่งผลไปเจริญอยู่ใต้ดิน เมล็ดมีขนาดใหญ่มีน้ำมันสะสมอยู่มาก (สุชาติ ศรีเพ็ญ 2543)



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะดอกและใบของ *Sesbania javanica* Miq.

พืชใน genus *Sesbania* ในประเทศไทยมีประมาณ 5 ชนิด คือ โสนคางคก (*S. bispinosa*) แคนบ้าน (*S. grandiflora*) สมี (*S. sesban*) โสนอินเดีย (*S. speciosa*) และ โสน (*S. javanica*) (Smitinand, T., 2001)

โสนคางคก (*S. bispinosa*) มีรายงานการวิจัยทางเคมีพบสาร poriferasterol, (+)-pinitol β -sitosterol glucoside และ poriferasterol glucoside จากใบ (Misra, L.N. and Siddiqi, S.A., 2004)



แคนบ้าน (*S. grandiflora*) มีการนำสารกลุ่ม flavonoids จากดอกไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* พบว่ามี clear zone 11.3, 10.5 และ 9.8 cm. ตามลำดับ (Krasaekoopt, W. and Kongkarnchanatip, A. 2005) และมีการวิจัยแยกสารประเภทโปรตีนที่เป็น α -glucosidase inhibitor (SGF60 และ SGF90) จากส่วนดอกด้วย (Boonmee, A. *et al.*, 2007)

สมี (*S. sesban*) มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของส่วนสกัดด้วย hexane carbon tetra chloride และ chloroform ของใบ พบว่าส่วนสกัดด้วย chloroform ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ได้ดีที่สุด (Hossain, Md.A. *et al.*, 2007) และยังมีการแยกสารประเภท molluscicidal saponins จากสมี (Dorsaz, A.C. *et al.*, 1987)

โสนอินเดีย (*S. speciosa*) ยังไม่พบมีการวิจัยทางเคมีหรือศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

โสน (*S. javanica*) เป็นไม้ล้มลุกมีลักษณะเป็นพุ่ม อายุปีเดียว ขึ้นตามหนองน้ำ ริมแม่น้ำ ลำคลอง หรือบริเวณที่มีน้ำขังทั่วไป จะออกดอกในช่วงปลายฤดูฝนประมาณเดือนกันยายน-เดือน ตุลาคม

มีผู้ศึกษาฤทธิ์ antimutagenic activity ของส่วนสกัดด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ของ ดอกโสน พบว่าส่วนสกัดดังกล่าวมี inhibitory effect ต่อ benzo(a)pyrene [B(a)P] และ aflatoxin B1 mutagens (Tangvarasittichai, S. *et al.*, 2005)

เนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากโสน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาองค์ ประกอบทางเคมีของดอกและใบโสน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาหาสูตร โครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากดอกและใบโสน โดยวิธีการ สกัดดอกและใบโสนที่แห้งด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ hexane ethyl acetate และ methanol ที่อุณหภูมิ ห้อง นำส่วนสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ แยกส่วนสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีที่ เหมาะสม เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ นำสารบริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยวิธีทางสเปกโตร สโคปี และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้

บทที่ 2

การทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

การวิจัยทำที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม

วัดอินฟราเรดสเปกตรัม (Infrared spectra) ในสภาพ acetone film ด้วยเครื่อง Perkin Elmer spectrum GX FT-IR จุดหลอมเหลววัดด้วยเครื่อง Kofler hot stage apparatus NMR วัดในสารละลาย CDCl_3 โดยมี tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิงภายในโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer Bruker AVANCE 300 MHz สำหรับ Column Chromatography (CC) และ Vacuum Liquid Chromatography (VLC) ใช้ silica gel 60 (Art. 7734, Merck) Size Exclusion Chromatography (SEC) ใช้ Sephadex LH-20 เป็น adsorbent Preparative Thin Layer Chromatography (PLC) ใช้ silica gel 60 PF254 (Art. 7747, Merck) เป็น adsorbent และ Thin Layer Chromatography (TLC) ใช้ precoated silica gel plates หนา 0.2 มม. โดยใช้ UV-detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือย้อมสีด้วยสารละลาย 1% CeSO_4 ใน 10% aq. H_2SO_4 และให้ความร้อน

ตัวอย่างพืช

ใบและดอกโสนที่ใช้ในการวิจัยเก็บที่อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2548 โดยดอกที่เก็บเป็นดอกที่ตูมและดอกที่เริ่มบาน ส่วนใบที่เก็บเป็นใบแก่ที่มีสีเขียวเข้ม เมื่อเก็บตัวอย่างพืชมาแล้ว นำไปตากแดดให้แห้งและอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 คืน ก่อนนำไปทดลอง

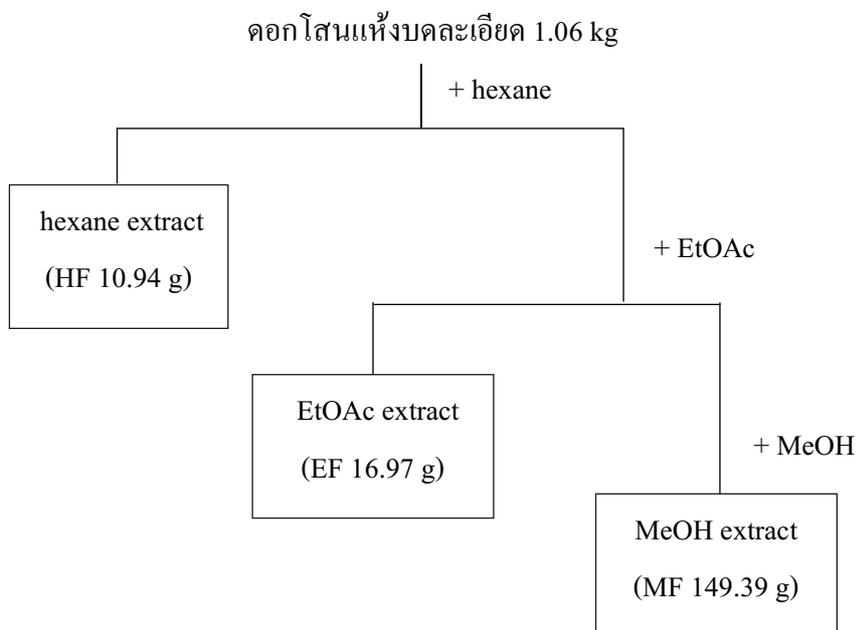
การสกัดส่วนดอกของโสน (*Sesbania javanica* Miq.)

นำดอกโสนแห้งบดละเอียด (1.06 kg) สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ hexane, EtOAc และ MeOH ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง ระบายตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำได้สารสกัดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่ได้จากการสกัดด้วย hexane, EtOAc และ MeOH ของดอกโสน

ส่วนสกัด	น้ำหนักสาร (g)	ลักษณะสาร
hexane (HF)	10.94	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
EtOAc (EF)	16.97	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MeOH (MF)	149.39	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

ขั้นตอนการสกัดส่วนดอกของโสน โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง สรุปได้ดังแผนภาพ



แผนภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากดอกโสน

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด hexane ของดอกโสน (HF)

นำส่วนสกัด hexane (HF 7.00 g) ของดอกโสน ตกผลึกด้วย acetone (100 mL) ได้สารสกัด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่ได้จากการสกัดด้วย acetone ของส่วนสกัด HF

ส่วนสกัด	น้ำหนักสาร (g)	ลักษณะสาร
acetone insoluble (HF-1)	2.39	ของแข็งสีขาวเหลือง
acetone soluble (HF-2)	4.38	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

นำสารส่วน HF-2 (4.38 g) มาแยกด้วย VLC โดยใช้ silica gel จำนวน 20.0 g ใช้ hexane, hexane : EtOAc และ EtOAc ในระบบที่เพิ่มความมีขี้ของตัวทำละลาย เป็น mobile phase ใช้ตัวทำละลายครั้งละ 100 mL ทำ TLC และรวม fraction ที่มี TLC เหมือนกัน ระเหยตัวทำละลายออก ภายใต้อากาศที่ความดันต่ำได้สารทั้งหมด 7 fractions ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารแต่ละ fraction จากส่วน acetone soluble (HF-2) ของส่วนสกัด hexane

Fraction No.	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
HF-2-1	hexane	1102.3	ของเหลวสีส้ม
HF-2-2	hexane : EtOAc (95:5)	1262.6	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
* HF-2-3	hexane : EtOAc (95:5)	305.9	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
* HF-2-4	hexane : EtOAc (90:10)	374.4	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
HF-2-5	hexane : EtOAc (85:15)	415.1	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
HF-2-6	hexane : EtOAc (80:20-50:50)	612.8	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
HF-2-7	hexane : EtOAc (40:60-10:90) และ EtOAc (100%)	221.4	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม

* fraction ที่ศึกษา : fraction ที่ทำ TLC แล้วมองเห็น main spot ที่เด่นชัดภายใต้ UV หรือจาก NMR spectrum มีสัญญาณของ aromatic proton หรือ olefinic proton ที่น่าสนใจ

นำสาร HF-2-3 (305.9 mg) ทำ CC โดยใช้ silica gel จำนวน 10.0 g และผงถ่าน ใช้ CH_2Cl_2 เป็น mobile phase ได้สารทั้งหมด 8 fractions ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก HF-2-3

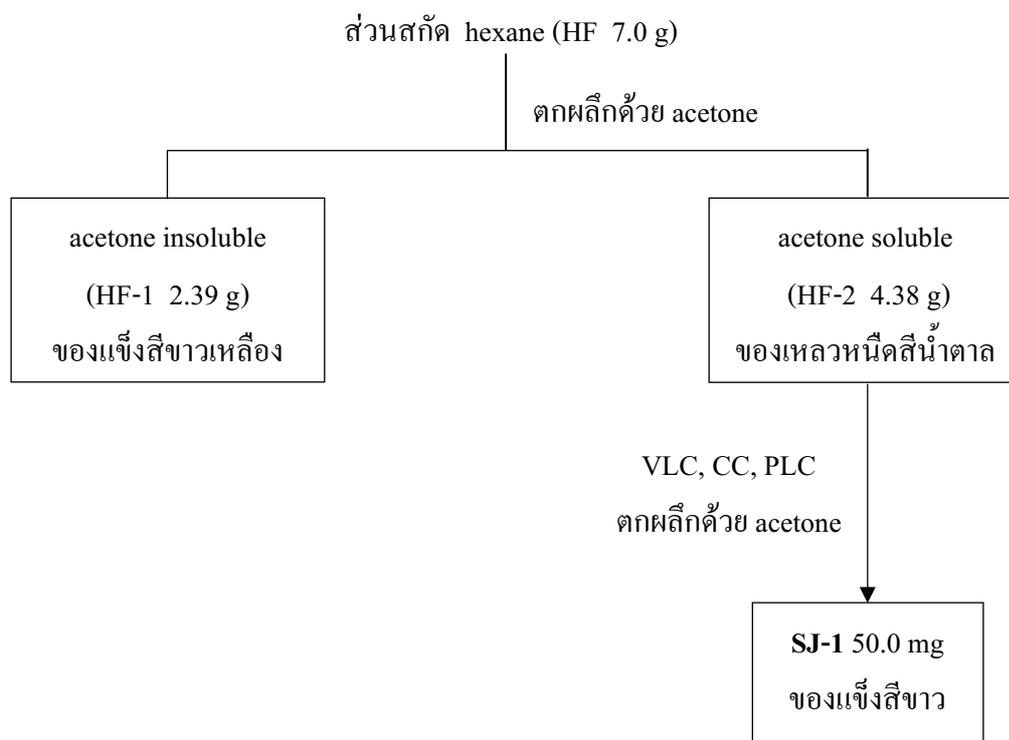
Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
HF-2-3-1	7.9	ของเหลวสีเหลือง
HF-2-3-2	6.8	ของเหลวสีเหลือง
HF-2-3-3	10.2	ของเหลวสีเหลือง
HF-2-3-4	24.4	ของเหลวสีเหลือง
* HF-2-3-5	40.2	ของเหลวสีเหลือง
* HF-2-3-6	48.0	ของแข็งสีเหลือง
* HF-2-3-7	23.9	ของเหลวสีเหลือง
HF-2-3-8	77.9	ของเหลวสีเหลือง

*fraction ที่ศึกษา

นำสาร HF-2-3-5 (40.2 mg) แยกด้วย PLC ใช้ hexane : acetone (9:1) เป็น mobile phase (2 ครั้ง) ได้สารเป็นของแข็งสีขาว (SJ-1, 12.0 mg)

นำสาร HF-2-3-6 (48.0 mg) และ HF-2-3-7 (23.9 mg) ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย acetone ได้สารเป็นของแข็งสีขาว HF-2-3-6-1 (20.4 mg) และ HF-2-3-7-1 (6.7 mg) และทำ TLC [hexane : acetone (9:1)] เทียบกับ SJ-1 พบว่า HF-2-3-6-1 และ HF-2-3-7-1 เป็น SJ-1

นำสาร HF-2-4 (374.4 mg) ทำ CC โดยใช้ silica gel จำนวน 12.0 g และผงถ่าน ใช้ CH_2Cl_2 เป็น mobile phase ได้สารเป็นของแข็งสีม่วงแดง (41.6 mg) และทำการตกผลึกด้วย acetone ได้สารเป็นของแข็งสีขาว HF-2-4-1 (10.9 mg) และทำ TLC [hexane : acetone (9:1)] เทียบกับ SJ-1 พบว่า HF-2-4-1 เป็น SJ-1



แผนภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของดอกโสนในส่วนสกัด hexane

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด EtOAc ของดอกโสน (EF)

นำส่วนสกัด EtOAc (EF 15.0 g) ของดอกโสน แยกด้วย VLC โดยใช้ silica gel จำนวน 140.0 g ใช้ hexane, hexane : EtOAc และ EtOAc ในระบบที่เพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลาย เป็น mobile phase ใช้ตัวทำละลายครั้งละ 200 mL ได้สารทั้งหมด 5 fractions ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารแต่ละ fraction จากส่วนสกัด EF

Fraction No.	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสาร (g)	ลักษณะสาร
EF-1	hexane	1.25	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
*EF-2	hexane : EtOAc (95:5-80:20)	1.97	ของเหลวสีเหลือง
*EF-3	hexane : EtOAc (70:30-50:50)	1.68	ของเหลวสีเหลือง
*EF-4	hexane : EtOAc (40:60-20:80) และ EtOAc (100%)	2.58	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
EF-5	EtOAc : MeOH (95:5-90:10)	0.18	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

*fraction ที่ศึกษา

นำสาร EF-2 (1.97 g) แยกด้วย CC โดยใช้ silica gel จำนวน 60.0 g ใช้ hexane, hexane : EtOAc (95:5, 90:10, 80:20, 60:40, 40:60 และ 20:80), EtOAc และ EtOAc : MeOH (95:5, 90:10 และ 80:20) เป็น mobile phase ได้สารทั้งหมด 10 fractions ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-2

Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
EF-2-1	108.2	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
EF-2-2	37.5	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
EF-2-3	84.9	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
EF-2-4	173.1	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
EF-2-5	412.6	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
*EF-2-6	98.0	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
EF-2-7	216.4	ของเหลวสีเหลืองอ่อน

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-2 (ต่อ)

Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
EF-2-8	205.0	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
EF-2-9	97.3	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
EF-2-10	95.5	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

*fraction ที่ศึกษา

นำสาร EF-2-6 (98.0 mg) ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย acetone ได้สารเป็นของแข็งสีขาว EF-2-6-1 (9.8 mg) และทำ TLC [hexane : acetone (9:1)] เทียบกับ **SJ-1** พบว่า EF-2-6-1 เป็น **SJ-1**

นำสาร EF-3 (1.68 g) แยกด้วย CC โดยใช้ silica gel จำนวน 50.0 g ใช้ hexane, hexane : EtOAc (95:5, 80:20, 60:40, 40:60 และ 20:80), EtOAc และ EtOAc : MeOH (95:5, 90:10 และ 80:20) เป็น mobile phase ได้สารทั้งหมด 7 fractions ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-3

Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
EF-3-1	20.0	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
* EF-3-2	221.7	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
* EF-3-3	200.2	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
* EF-3-4	292.2	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
EF-3-5	214.7	ของเหลวหนืดสีเหลือง
EF-3-6	158.3	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
EF-3-7	128.7	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

* fraction ที่ศึกษา

นำสาร EF-3-2 (221.7 mg) แยกด้วย PLC ใช้ hexane : acetone (7:3) เป็น mobile phase (3 ครั้ง) ได้สาร 3 fractions ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-3-2

Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
*EF-3-2-1	24.4	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
*EF-3-2-2	11.4	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
EF-3-2-3	30.4	ของเหลวสีน้ำตาล

* fraction ที่ศึกษา

นำ EF-3-2-1 (24.4 mg) และ EF-3-2-2 (11.4 mg) แยกด้วย PLC ใช้ CH_2Cl_2 : MeOH (15:1) เป็น mobile phase ได้สารเป็นของแข็งสีขาว EF-3-2-1-1 (6.3 mg) และ EF-3-2-2-1 (1.7 mg) ตามลำดับ และทำ TLC [CH_2Cl_2 : MeOH (15:1)] พบว่าเป็นสารเดียวกันคือ **SJ-2**

นำสาร EF-3-3 (200.2 mg) แยกด้วย PLC ใช้ hexane : acetone (7:3) เป็น mobile phase (5 ครั้ง) ได้สารผสม (9.7 mg) เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน นำมาแยกต่อให้บริสุทธิ์ด้วย PLC ใช้ CH_2Cl_2 : MeOH (15:1) เป็น mobile phase ได้เป็นของแข็งสีขาว (**SJ-3**, 2.6 mg)

นำสาร EF-3-4 (292.2 mg) แยกด้วย PLC ใช้ hexane : acetone (7:3) เป็น mobile phase (5 ครั้ง) ได้สาร 3 fractions ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-3-4

Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
EF-3-4-1	66.7	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
*EF-3-4-2	28.2	ของเหลวสีน้ำตาล
*EF-3-4-3	17.1	ของเหลวสีน้ำตาล

* fraction ที่ศึกษา

นำสาร EF-3-4-2 (28.2 mg) และ EF-3-4-3 (17.1 mg) แยกด้วย PLC ใช้ CH_2Cl_2 : MeOH (25:1) เป็น mobile phase (2 ครั้ง) ได้สารบริสุทธิ์เป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน EF-3-4-2-1 (5.5 mg) และ EF-3-4-3-1 (4.3 mg) ตามลำดับ ทำ TLC [CH_2Cl_2 : MeOH (25:1)] พบว่าเป็นสารเดียวกันคือ **SJ-4**

นำสาร EF-4 (2.58 g) แยกด้วย CC โดยใช้ silica gel จำนวน 77.5 g ใช้ hexane, hexane : EtOAc (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 และ 10:90), EtOAc และ EtOAc : MeOH (95:5, 90:10, 80:20 และ 70:30) เป็น mobile phase ได้สารทั้งหมด 8 fractions ดังตารางที่ 10

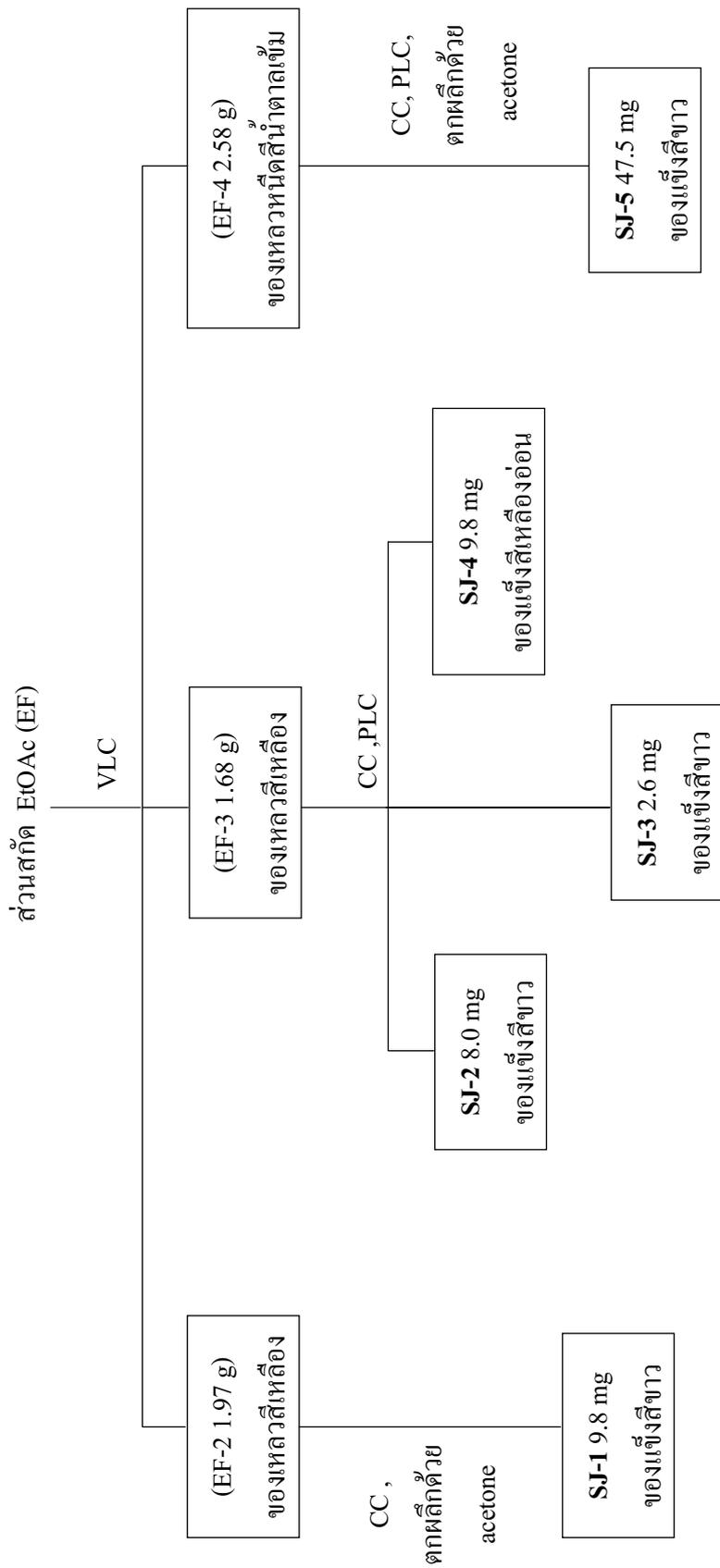
ตารางที่ 10 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก EF-4

Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
EF-4-1	47.3	ของเหลวสีเหลือง
EF-4-2	127.6	ของเหลวสีเหลือง
EF-4-3	239.7	ของเหลวสีเหลือง
*EF-4-4	262.1	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
*EF-4-5	324.0	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
EF-4-6	131.3	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
EF-4-7	244.5	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
EF-4-8	203.8	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

* fraction ที่ศึกษา

นำสาร EF-4-4 (262.1 mg) แยกด้วย PLC ใช้ CH_2Cl_2 : MeOH (15:1) เป็น mobile phase (4 ครั้ง) ได้สารผสมเป็นของแข็งสีเหลือง นำไปตกผลึกให้บริสุทธิ์โดยใช้ acetone ได้สารเป็นของแข็งสีขาว (**SJ-5**, 17.9 mg)

นำสาร EF-4-5 (324.0 mg) แยกด้วย PLC ใช้ CH_2Cl_2 : MeOH (15:1) เป็น mobile phase (7 ครั้ง) ได้สารผสมเป็นของแข็งสีเหลือง นำไปตกผลึกให้บริสุทธิ์โดยใช้ acetone ได้สารเป็นของแข็งสีขาว EF-4-5-1 (29.6 mg) ทำ TLC เทียบกับ **SJ-5** พบว่า EF-4-5-1 เป็น **SJ-5**



แผนภาพที่ 3 แสดงขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของดอก โสนในส่วนสกัด EtOAc

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด MeOH ของดอกโสน (MF)

นำส่วนสกัดจาก MeOH ของดอกโสน (MF 149.39 g) มาละลายน้ำและสกัดด้วย *n*-butanol ได้ส่วนสกัดดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่ละลายใน *n*-butanol และน้ำ

ส่วนสกัด	น้ำหนักสาร (g)	ลักษณะสาร
<i>n</i> -butanol (MF-1)	52.93	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
น้ำ (MF-2)	93.48	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

นำส่วนสกัดจาก *n*-butanol (MF-1 9.61 g) แยกด้วยวิธี Size Exclusion Chromatography (SEC) โดยใช้ Sephadex LH-20 จำนวน 25.0 g ใช้ MeOH เป็น mobile phase ได้สารทั้งหมด 3 fractions ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จากส่วนสกัด MF-1

Fraction No.	น้ำหนักสาร (g)	ลักษณะสาร
MF-1-1	7.77	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
*MF-1-2	1.05	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
*MF-1-3	0.14	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

* fraction ที่ศึกษา

นำสาร MF-1-2 (898.8 mg) มาแยกด้วยวิธี Size Exclusion Chromatography (SEC) ใช้ Sephadex LH-20 จำนวน 25.0 g ใช้ MeOH เป็น mobile phase ได้สารทั้งหมด 3 fractions ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก MF-1-2

Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
MF-1-2-1	395.1	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
*MF-1-2-2	425.9	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MF-1-2-3	26.7	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม

*fraction ที่ศึกษา

นำสาร MF-1-2-2 (425.9 mg) มาแยกด้วย CC ใช้ silica gel จำนวน 20.0 g ใช้ EtOAc : MeOH : H₂O (30:3:1, 25:3:1, 20:3:1, 15:3:1, 10:3:1 และ 7:3:1) เป็น mobile phase ได้สารทั้งหมด 8 fractions ดังตารางที่ 14

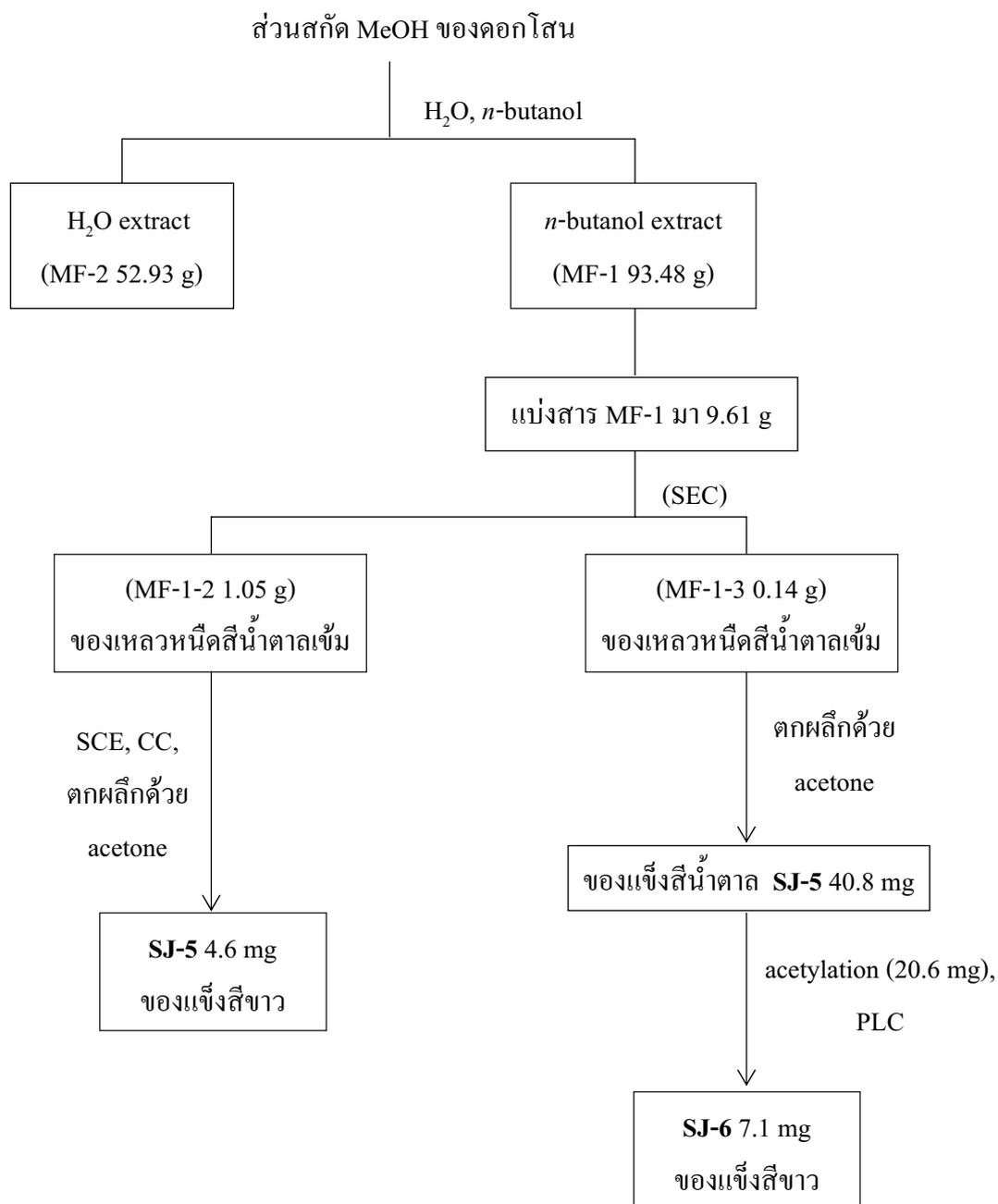
ตารางที่ 14 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารที่แยกได้จาก MF-1-2-2

Fraction No.	น้ำหนักสาร (mg)	ลักษณะสาร
MF-1-2-2-1	1.2	ของเหลวสีเหลือง
MF-1-2-2-2	51.5	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
*MF-1-2-2-3	22.2	ของแข็งสีเหลือง
*MF-1-2-2-4	20.8	ของแข็งสีเหลือง
MF-1-2-2-5	18.5	ของเหลวสีเหลือง
MF-1-2-2-6	39.7	ของเหลวสีเหลือง
MF-1-2-2-7	91.2	ของเหลวสีเหลือง
MF-1-2-2-8	119.4	ของเหลวสีเหลือง

*fraction ที่ศึกษา

นำ MF-1-2-2-3 (22.2 mg) และ MF-1-2-2-4 (20.8 mg) ตกผลึกด้วย acetone ได้สารเป็นของแข็งสีขาว MF-1-2-2-3-1 (1.6 mg) และ MF-1-2-2-4-1 (3.0 mg) ตามลำดับ ทำ TLC เทียบกับ SJ-5 พบว่า MF-1-2-2-3-1 และ MF-1-2-2-4-1 เป็น SJ-5

นำสาร MF-1-3 (0.14 g) ตกผลึกด้วย acetone ได้ของแข็งสีน้ำตาล (40.8 mg) นำของแข็งสีน้ำตาลจำนวน 20.6 mg มาทำปฏิกิริยา acetylation โดยละลายใน pyridine 2 mL เติม acetic anhydride 1 mL กวนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน เเทลงในน้ำเย็น 10 mL สกัดด้วย CH_2Cl_2 (20 mL, 2 ครั้ง) นำส่วนสกัด CH_2Cl_2 ล้างด้วย 10% HCl (20 mL, 2 ครั้ง) และ น้ำ (20 mL) นำชั้น CH_2Cl_2 มาเติม anh. Na_2SO_4 กรอง นำไประเหยภายใต้ความดันต่ำ ได้สารเป็นของเหลวสีเหลือง (19.9 mg) นำมาแยกให้บริสุทธิ์โดยทำ PLC ใช้ hexane : acetone (8:2) เป็น mobile phase (2 ครั้ง) ได้สารเป็นของแข็งสีขาว (SJ-6, 7.1 mg)



แผนภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของดอกโสนในส่วนสกัด MeOH

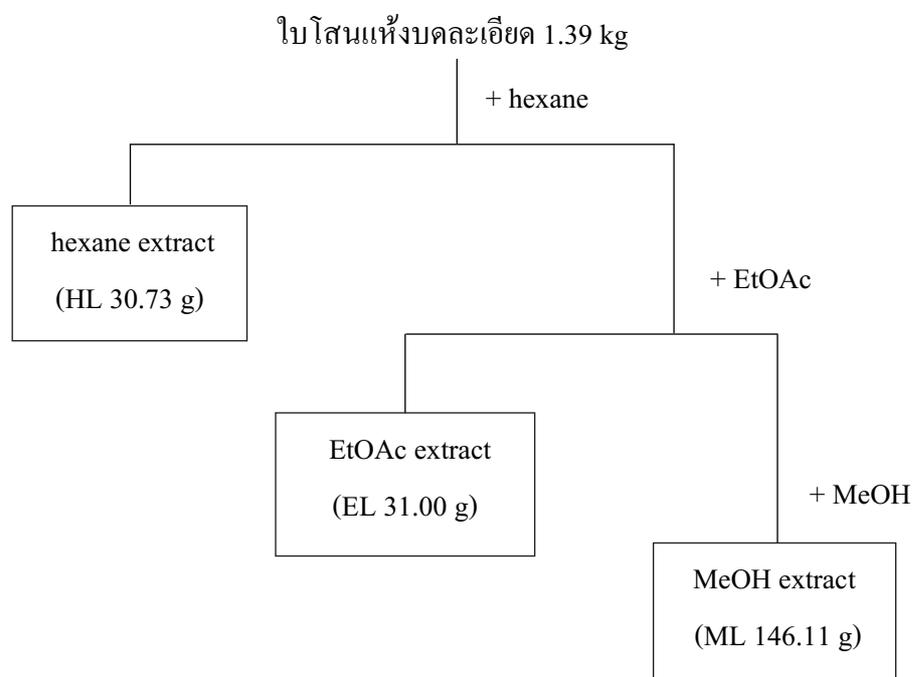
การสกัดส่วนใบของโสน (*Sesbania javanica* Miq.)

นำใบโสนแห้งบดละเอียดน้ำหนัก 1.39 kg สกัดด้วย hexane, EtOAc และ MeOH ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ ได้สารสกัดแต่ละส่วน ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงน้ำหนักและลักษณะสารจากการสกัดด้วย hexane, EtOAc และ MeOH ของใบโสน

ส่วนสกัด	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
Hexane (HL)	30.73	ของเหลวหนืดสีดำ
EtOAc (EL)	31.00	ของเหลวหนืดสีดำ
MeOH (ML)	146.11	ของเหลวหนืดสีดำ

ขั้นตอนการสกัดส่วนใบของโสน โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง สรุปลงได้ดังแผนภาพ



แผนภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากใบโสน

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด EtOAc ของใบโสน (EL)

นำส่วนสกัดจาก EtOAc (EL, 29.00 g) แยกด้วย VLC โดยใช้ silica gel 150.0 g ใช้ hexane, hexane : EtOAc, EtOAc และ EtOAc : MeOH ในระบบที่เพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย เป็น mobile phase ใช้ตัวทำละลายครั้งละ 200 mL ได้สารทั้งหมด 11 fractions ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงน้ำหนักและลักษณะของสารแต่ละ fraction จากส่วนสกัด EL

Fraction No.	ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
EL-1	hexane	2.18	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-2	hexane : EtOAc (95:5)	2.22	ของเหลวหนืดสีดำ
*EL-3	hexane : EtOAc (95:5)	3.48	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-4	hexane : EtOAc (90:10)	1.78	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-5	hexane : EtOAc (80:20)	3.32	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-6	hexane : EtOAc (70:30)	2.33	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-7	hexane : EtOAc (60:40)	2.81	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-8	hexane : EtOAc (50:50-40:60)	3.60	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-9	hexane : EtOAc (30:70-10:90)	3.38	ของเหลวหนืดสีดำ
*EL-10	EtOAc (100%) และ EtOAc : MeOH (95:5)	1.14	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-11	EtOAc : MeOH (90:10-70:30)	1.60	ของเหลวหนืดสีดำ

*fraction ที่ศึกษา

นำสาร EL-3 (3.48 g) แยกด้วย CC ใช้ silica gel จำนวน 112.0 g ใช้ hexane, hexane : EtOAc (90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70 และ 10:90) EtOAc และ EtOAc : MeOH (90:10 และ 80:20) เป็น mobile phase ได้สารทั้งหมด 18 fractions ดังตารางที่ 17

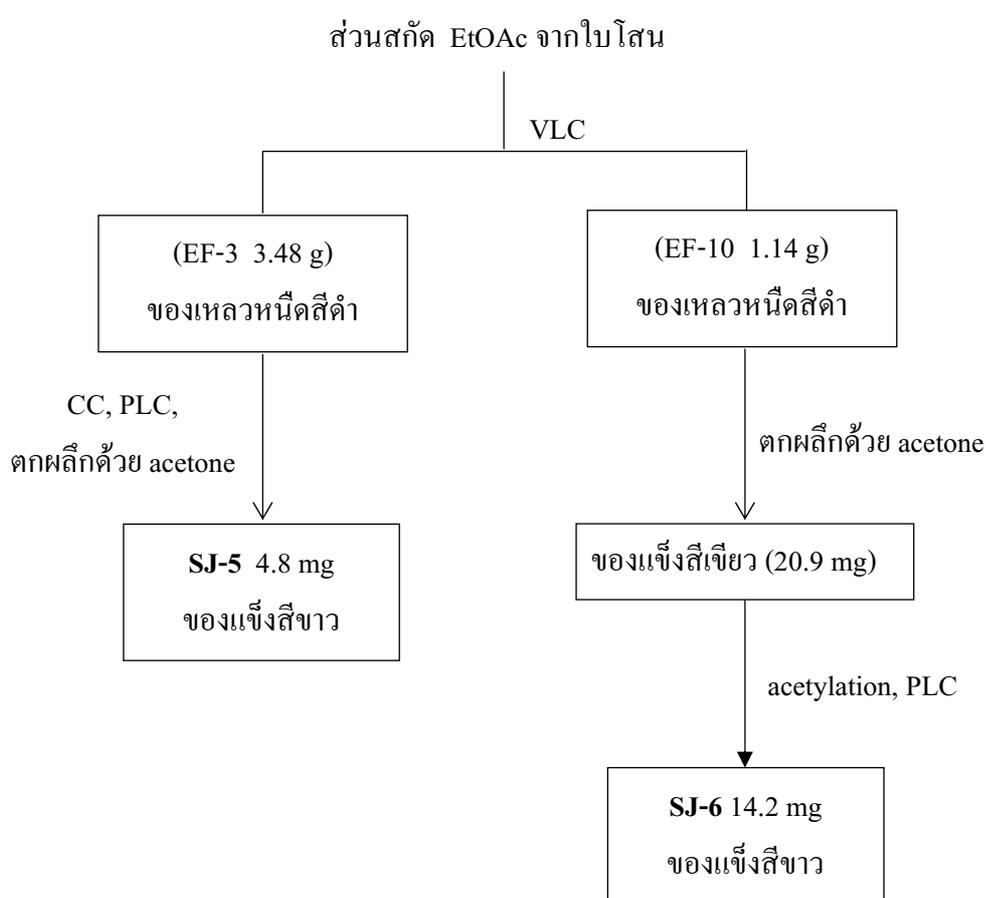
ตารางที่ 17 แสดงน้ำหนักและลักษณะของสารที่แยกได้จาก EL-3

Fraction No.	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสาร
EL-3-1	286.5	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-2	88.9	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-3	169.9	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-4	59.5	ของแข็งสีดำ
EL-3-5	440.6	ของแข็งสีดำ
EL-3-6	691.7	ของแข็งสีดำ
EL-3-7	188.5	ของเหลวสีเหลือง
*EL-3-8	219.5	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-9	310.4	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-10	212.2	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-11	125.8	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-12	44.1	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-13	50.6	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-14	45.4	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-15	46.4	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-16	35.8	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-17	13.5	ของเหลวหนืดสีดำ
EL-3-18	57.4	ของเหลวหนืดสีดำ

*fraction ที่ศึกษา

นำสาร EL-3-8 (219.5 mg) แยกด้วย PLC ใช้ hexane : EtOAc (7:1) เป็น mobile phase (5 ครั้ง) ได้สารเป็นของแข็งสีเหลือง (36.0 mg) นำไปตกผลึกด้วย acetone ได้สารบริสุทธิ์เป็นของแข็งสีขาว EL-3-8-1 (4.8 mg) ทำ TLC เทียบกับ SJ- 5 พบว่า EL-3-8-1 เป็น SJ-5

นำสาร EL-10 (1.14 g) ตกผลึกด้วย acetone ได้สารที่เป็นของแข็งสีเขียว EL-10-1 (20.9 mg) แล้วนำ EL-10-1 จำนวน 20.9 mg มาทำปฏิกิริยา acetylation โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับ MF-1-3 ได้สารเป็นของเหลวสีเหลือง (22.1 mg) นำมาแยกให้บริสุทธิ์โดยทำ PLC ใช้ hexane : acetone (8:2) เป็น mobile phase (2 ครั้ง) ได้สารเป็นของแข็งสีขาว EL-10-1-1 (14.2 mg) ทำ TLC เทียบกับ **SJ-6** พบว่า EL-10-1-1 เป็น **SJ-6**



แผนภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบโสมในส่วนสกัด EtOAc

SJ-1

ลักษณะสาร : เป็นของแข็งสีขาว ตกผลึกใน acetone

mp. : 142–144 °C

IR (acetone film) V_{\max} (cm^{-1}) : 3443, 2937, 2893, 1459, 1382, 1046, 970

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ แสดงในตารางที่ 18

SJ-2

ลักษณะสาร : เป็นของแข็งสีขาว ตกผลึกใน CH_2Cl_2

mp. : 238–240 °C

IR (acetone film) V_{\max} (cm^{-1}) : 3384, 1614, 1570, 1275, 1257, 1219, 1196, 1173, 1053, 825

ข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงในตารางที่ 19

SJ-3

ลักษณะสาร : ของแข็งสีขาว ตกผลึกใน CH_2Cl_2

mp. : 296–298 °C

IR (acetone film) V_{\max} (cm^{-1}) : 3347, 2940, 2873, 1622, 1577, 1249, 1059

ข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงในตารางที่ 20

SJ-4

ลักษณะสาร : ของแข็งสีเหลืองอ่อน รูปเข็ม ตกผลึกใน CH_2Cl_2

mp. : 216–218 °C

IR (acetone film) V_{\max} (cm^{-1}) : 3356, 3027, 2960, 2829, 1673, 1591, 1246, 1214

ข้อมูล ^1H และ $^{13}\text{C-NMR}$ แสดงในตารางที่ 21

SJ-5

ลักษณะสาร : ของแข็งสีขาว ตกผลึกใน acetone

mp. : 262–264 °C

IR (acetone film) V_{\max} (cm^{-1}) : 3422, 2918, 2849, 1638, 1465, 1367, 1243, 1074

ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ แสดงในตารางที่ 22

SJ-6

ลักษณะสาร : ของแข็งสีขาว ตกผลึกใน acetone

mp. : 128-130 °C

IR (acetone film) V_{\max} (cm⁻¹) : 2958, 2869, 1752, 1368, 1229, 1041

ข้อมูล ¹H-NMR แสดงในตารางที่ 23

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH TLC screening assay

Spot สารที่แยกได้จากโสม (SJ-1-SJ-6) เทียบกับสารมาตรฐาน 4 สาร คือ gallic acid, catechin, catechol และ trolox (ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแต่ละสารเท่ากับ 0.01 %w/v) บนแผ่นTLC (หนา 0.2 มม.) แผ่นเดียวกัน และนำแผ่น TLC มาแช่ใน EtOAc : MeOH : H₂O (40:3:1) หลังจากแผ่น TLC แห้ง จึงย้อมสีด้วยสารละลาย 0.008 %w/v ของ 1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ใน ethanol ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จะปรากฏเป็น spot สีเหลืองอ่อนบนพื้น TLC สีม่วง (Takao, T. *et al.*, 1994)

ตารางที่ 18 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ SJ-1

ตำแหน่ง	SJ-1 (CDCl_3)	β -sitosterol (CDCl_3)
	$^1\text{H-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$
3	3.55 (1H, m)	3.56 (1H, m)
6	5.37 (1H, brs)	5.39 (1H, m)
18-Me	0.72 (3H, s)	0.72 (3H, s)
19-Me	1.03 (3H, s)	1.05 (3H, s)
21-Me	1.04 (3H, d, $J = 6.3$ Hz)	0.96 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)
26-Me	0.83 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.87 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)
27-Me	0.81 (3H, d, $J = 6.3$ Hz)	0.85 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)
29-Me	0.85 (3H, t, $J = 6.6$ Hz)	0.89 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)

ตารางที่ 19 แสดง ^1H และ ^{13}C -NMR ของ SJ-2

ตำแหน่ง	SJ-2 (acetone- d_6 + CDCl_3)		Prunetin (DMSO- d_6)	
	^1H -NMR	^{13}C -NMR	^1H -NMR	^{13}C -NMR
2	8.04 (s)	152.7	8.35 (s)	154.3
3	-	127.8	-	122.9
4	-	176.2	-	180.1
4a	-	102.6	-	104.4
5	-	167.0	-	164.4
6	6.35 (d, $J = 2.1$ Hz)	97.6	6.22 (d, $J = 2.0$ Hz)	99.0
7	-	162.0	-	162.0
8	6.48 (d, $J = 2.1$ Hz)	91.7	6.38 (d, $J = 2.0$ Hz)	93.7
8a	-	157.0	-	157.6
1'	-	121.4	-	121.9
2'	7.41 (d, $J = 8.7$ Hz)	129.7	7.49 (d, $J = 8.7$ Hz)	130.1
3'	6.91 (d, $J = 8.7$ Hz)	114.9	6.99 (d, $J = 8.7$ Hz)	113.7
4'	-	157.6	-	159.1
5'	6.91 (d, $J = 8.7$ Hz)	114.9	6.99 (d, $J = 8.7$ Hz)	113.7
6'	7.41 (d, $J = 8.7$ Hz)	129.7	7.49 (d, $J = 8.7$ Hz)	130.1
7-OMe	3.91 (s)	55.3	3.78 (s)	55.1

ตารางที่ 20 แสดง ^1H และ ^{13}C -NMR ของ SJ-3

ตำแหน่ง	SJ-3 (acetone- d_6 + CDCl_3)		Genistein (CD_3OD)	
	^1H -NMR	^{13}C -NMR	^1H -NMR	^{13}C -NMR
2	8.03 (s)	153.6	8.17 (s)	153.5
3	-	124.0	-	122.2
4	-	176.3	-	180.0
4a	-	106.4	-	104.5
5	-	163.2	-	162.0
6	6.29 (d, $J = 2.1$ Hz)	99.7	6.29 (d, $J = 2.3$ Hz)	98.5
7	-	164.8	-	164.0
8	6.40 (d, $J = 2.1$ Hz)	94.4	6.42 (d, $J = 2.3$ Hz)	94.1
8a	-	158.9	-	157.8
1'	-	122.5	-	121.5
2'	7.41 (d, $J = 8.7$ Hz)	130.8	7.46 (d, $J = 8.9$ Hz)	130.0
3'	6.90 (d, $J = 8.7$ Hz)	115.8	6.90 (d, $J = 8.9$ Hz)	115.2
4'	-	158.1	-	158.0
5'	6.90 (d, $J = 8.7$ Hz)	115.8	6.90 (d, $J = 8.9$ Hz)	115.2
6'	7.41 (d, $J = 8.7$ Hz)	130.8	7.46 (d, $J = 8.9$ Hz)	130.0
5-OH	-	-	13.03 (s)	-

ตารางที่ 21 แสดง ^1H และ ^{13}C -NMR ของ SJ-4

ตำแหน่ง	SJ-4 ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)		4-hydroxycinnamic acid	
	^1H -NMR	^{13}C -NMR	^1H -NMR	^{13}C -NMR
1	-	126.1	-	125.8
2	6.81 (d, $J = 8.4$ Hz)	130.0	6.78 (d, $J = 8.0$ Hz)	130.7
3	7.38 (d, $J = 8.4$ Hz)	115.8	7.52 (d, $J = 8.0$ Hz)	116.3
4	-	159.2	-	160.1
5	7.38 (d, $J = 8.4$, Hz)	115.8	7.52 (d, $J = 8.0$ Hz)	116.3
6	6.81 (d, $J = 8.4$ Hz)	130.0	6.78 (d, $J = 8.0$ Hz)	130.7
7	7.60 (d, $J = 15.9$ Hz)	145.7	7.49 (d, $J = 16.0$ Hz)	144.7
8	6.22 (d, $J = 15.9$ Hz)	114.6	6.29 (d, $J = 16.0$ Hz)	115.9
9	-	169.8	-	168.5

ตารางที่ 22 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ **SJ-5**

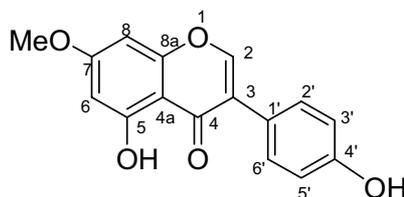
ตำแหน่ง	SJ-5 ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)
	$^1\text{H-NMR}$
3	3.29 (1H, m)
6	5.37 (1H, brs)
18-Me	0.69 (3H, s)
19-Me	1.00 (3H, s)
21-Me	1.02 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
26-Me	0.81 (3H, d, $J = 6.3$ Hz)
27-Me	0.79 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)
29-Me	0.84 (3H, t, $J = 9.9$ Hz)
1'	4.42 (d, $J = 7.5$ Hz)
2'	3.32 (m)
3'	3.42 (t, $J = 5.1$ Hz)
4'	3.41 (t, $J = 5.1$ Hz)
5'	3.82 (1H, m)
6'	3.51 (2H, m)

ตารางที่ 23 แสดง $^1\text{H-NMR}$ ของ SJ-6

ตำแหน่ง	SJ-6 (CDCl_3)
	$^1\text{H-NMR}$
3	3.50 (1H, m)
6	5.38 (1H, brs)
18-Me	0.71 (3H, s)
19-Me	1.00 (3H, s)
21-Me	1.03 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
26-Me	0.83 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)
27-Me	0.81 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)
29-Me	0.85 (3H, t, $J = 6.3$ Hz)
1'	4.61 (d, $J = 7.8$ Hz)
2'	4.97 (dd, $J = 7.8, 9.6$ Hz)
3'	5.22 (t, $J = 9.6$ Hz)
4'	5.12 (t, $J = 9.6$ Hz)
5'	3.69 (ddd, $J = 2.4, 4.8, 9.6$ Hz)
6 a'	4.12 (dd, $J = 2.4, 12.3$ Hz)
6 b'	4.27 (dd, $J = 4.8, 12.3$ Hz)
2', 3', 4', 6'-OAc	2.09, 2.06, 2.03, 2.02 (s, 4xOAc)

SJ-2

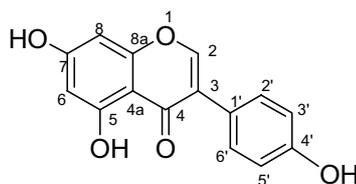
จากข้อมูล IR พบสัญญาณ broad ที่ 3384 cm^{-1} ของหมู่ hydroxyl (OH) และยังพบสัญญาณที่ 1614 cm^{-1} ของหมู่คาร์บอนิล จาก $^1\text{H-NMR}$ พบ singlet ที่ δ 8.04 ppm เป็นสัญญาณลักษณะเฉพาะของ H-2 ของสารในกลุ่ม isoflavone เห็นสัญญาณเป็น doublet ที่ δ 7.41 ppm ($J = 8.7\text{ Hz}$) ของ H-2' และ H-6' พบ doublet ที่ δ 6.91 ppm ($J = 8.7\text{ Hz}$) ของ H-3' และ H-5' พบสัญญาณเป็น doublet ที่ δ 6.48 และ 6.35 ppm ($J = 2.1\text{ Hz}$) ของ H-8 และ H-6 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ singlet ที่ δ 3.91 ppm ของหมู่ methoxy (OMe) จากการเปรียบเทียบจุดหลอมเหลวและ $^1\text{H-NMR}$ ของ SJ-2 กับ prunetin (Talukdar, A.C., *et al.*, 2000 และ Vitor, R.F., *et al.*, 2004) พบว่า SJ-2 คือ prunetin (5,4'-dihydroxy-7-methoxy- isoflavone)



prunetin (5,4'-dihydroxy-7-methoxyisoflavone)

SJ-3

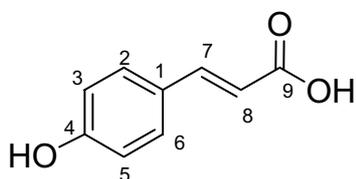
จากข้อมูล IR เห็นสัญญาณลักษณะ broad ที่ 3347 cm^{-1} ของหมู่ hydroxyl (OH) และพบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิลที่ 1622 cm^{-1} และจากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณ singlet เป็นลักษณะเฉพาะของ H-2 ของสารในกลุ่ม isoflavone ที่ δ 8.03 ppm เห็นสัญญาณเป็น doublet ที่ δ 7.41 และ 6.90 ppm ($J = 8.7\text{ Hz}$) ของ H-2', H-6' และ H-3', 5' ตามลำดับ นอกจากนี้พบสัญญาณ doublet ที่ δ 6.40 ppm และ 6.29 ppm ($J = 2.1\text{ Hz}$) ของ H-8 และ H-6 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบจุดหลอมเหลวและ $^1\text{H-NMR}$ ของ SJ-3 กับ genistein (Durango, D. *et al.*, 2002 และ O'Neil, M.J. 2006) พบว่า SJ-3 คือ genistein (5,7,4'-trihydroxy isoflavone)



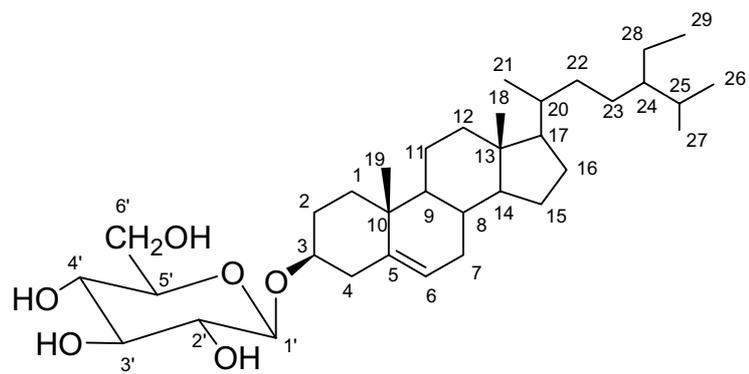
genistein (5,7,4'-trihydroxyisoflavone)

SJ-4

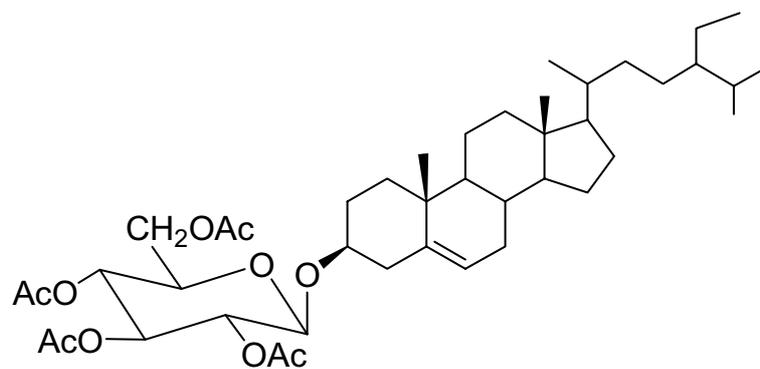
จากข้อมูล IR พบสัญญาณ broad ที่ 3356 cm^{-1} ของหมู่ hydroxyl (OH) และยังพบสัญญาณของหมู่คาร์บอนิล ที่ 1673 cm^{-1} จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ พบสัญญาณ doublet ที่ δ 7.60 และ 6.22 ppm ($J = 15.9\text{ Hz}$) น่าจะเป็นลักษณะของ *trans*-olefinic proton เห็นสัญญาณเป็น doublet ที่ δ 7.38 และ 6.81 ppm ($J = 8.4\text{ Hz}$) ซึ่งเป็นสัญญาณของ 4 โปรตอนบนวงแหวน aromatic 1 วง ที่มีการแทนที่ที่ตำแหน่ง 1, 4 จากการเปรียบเทียบจุดหลอมเหลว และ $^1\text{H-NMR}$ ของ SJ-4 กับ 4-hydroxycinnamic acid (O'Neil, M.J. 2006 และ Mikhaeil, B.R. *et al.*, 2004) พบว่า SJ-4 เป็น 4-hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid)

4-hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid)**SJ-5**

จากข้อมูล IR พบสัญญาณ broad ที่ 3422 cm^{-1} ของหมู่ hydroxyl (OH) และยังพบสัญญาณของคาร์บอนอิ่มตัว (C-H) ที่ 2918 และ 2849 cm^{-1} ซึ่งสาร SJ-5 มีลักษณะเป็นผงสีขาว จุดหลอมเหลว $259\text{ }^{\circ}\text{C}$ และเป็นสารที่มีขั้วสูง จึงได้นำสาร SJ-5 ทำปฏิกิริยา acetylation ได้เป็น SJ-6 จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร SJ-6 พบ broad singlet ที่ δ 5.38 ppm น่าจะเป็นสัญญาณของ olefinic proton ส่วน triplet ที่ δ 5.22 ppm ($J = 9.6\text{ Hz}$) และ δ 5.12 ppm ($J = 9.6\text{ Hz}$) รวมทั้ง doublet of doublet ที่ δ 4.97 ppm ($J = 7.8, 9.6\text{ Hz}$) doublet ที่ δ 4.61 ppm ($J = 7.8\text{ Hz}$) doublet of doublet ที่ δ 4.27 ppm ($J = 4.8, 12.3\text{ Hz}$) doublet of doublet ที่ δ 4.12 ppm ($J = 2.4, 12.3\text{ Hz}$) และ doublet of doublet of doublet ที่ δ 3.69 ppm ($J = 2.4, 4.8, 9.6\text{ Hz}$) เป็นสัญญาณโปรตอนของน้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้ยังพบสัญญาณ singlet ที่ δ 2.09, 2.06, 2.03 และ 2.02 ppm ซึ่งเป็นหมู่ Me ของ acetate 4 หมู่ เมื่อพิจารณาจากจุดหลอมเหลว ข้อมูล IR ของ SJ-5 และ ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของ acetylated product SJ-6 ทำให้สรุปได้ว่า สาร SJ-5 เป็น sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (Yayli, N. *et al.*, 2003)



sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside



β -sitosterol glucoside tetraacetate

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

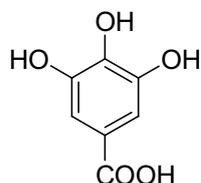
การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้นำส่วนสกัดหยาบของดอกและใบโสนด้วย hexane, ethyl acetate และ methanol ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 24 แสดงชนิดของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

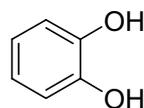
ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ชนิดของเชื้อรา
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Candida albicans</i> NCPF3153
methicillin-resistant <i>S. aureus</i> SK1(MRSA)	<i>Cryptococcus neoformans</i> clinical isolate
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC90112 flucytosine-sensitive
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC90113 flucytosine-resistant
	<i>Microsporium gypseum</i>

ผลการทดสอบพบว่า มีเพียงส่วนสกัดใบโสนด้วย hexane ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 1,280 µg/mL ซึ่งแสดงว่ามีฤทธิ์อ่อนมาก ดังนั้นจึงไม่ได้นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 5 สารไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและรา

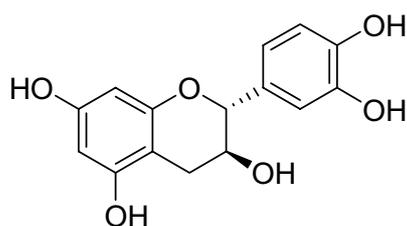
ได้นำสาร **SJ-1-SJ-6** มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH TLC screening assay (Takao, T. *et al.*, 1994) พบว่า prunetin (**SJ-2**), genistein (**SJ-3**) และ 4-hydroxy cinnamic acid (**SJ-4**) แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยปรากฏเป็น spot สีเหลืองอ่อนบนพื้นสีม่วง (ดังภาพที่ 2) ในการทดสอบได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 4 ชนิด คือ gallic acid, catechin, catechol และ trolox ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



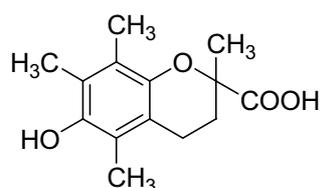
gallic acid



catechol



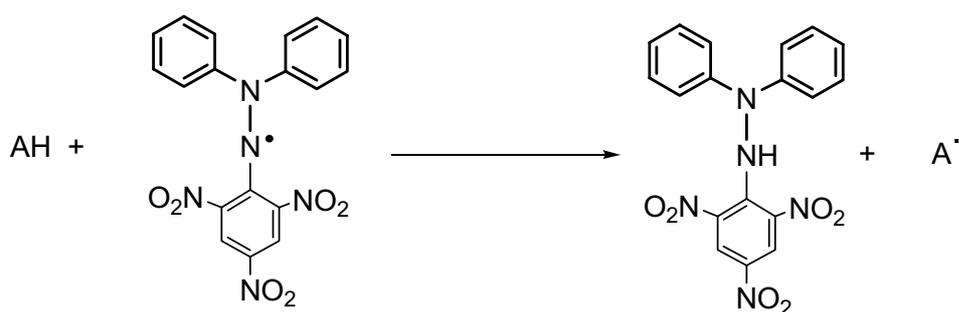
catechin



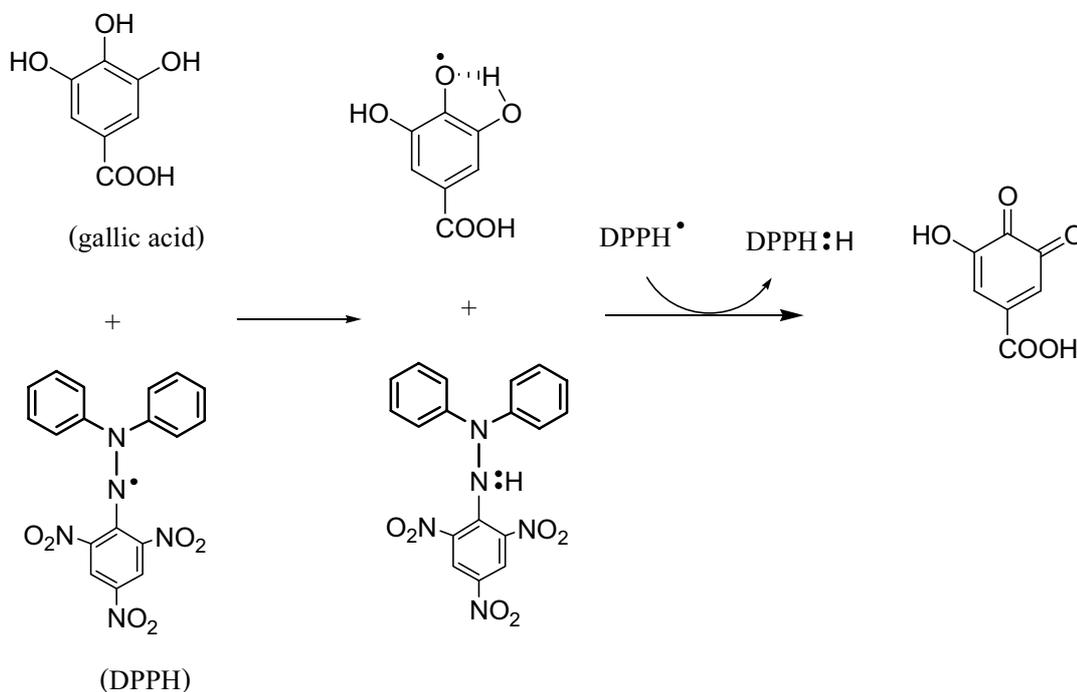
trolox

(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ โดย DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร สารละลายของ DPPH นั้นจะมีสีม่วงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อ DPPH radical ได้รับอิเล็กตรอนหรือ hydrogen radical จากสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) ก็จะได้เป็นสารที่เสถียรมากๆ สารต้านอนุมูลอิสระ (AH) จะทำให้สีของ DPPH นั้นจางลง ทำให้ DPPH สูญเสียลักษณะเฉพาะของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรไป (Blois, M.S., 1958) ดังสมการ

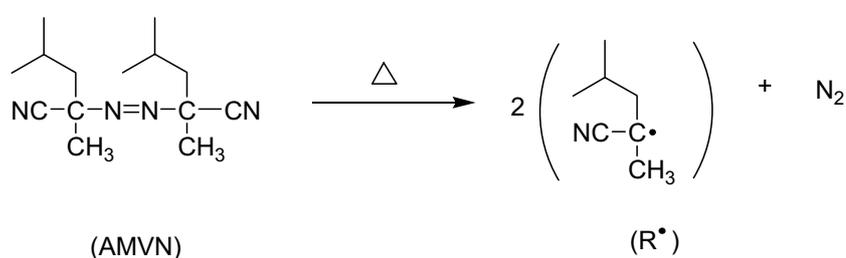


กลไกของการ trapping radical ของสารประกอบในกลุ่ม phenolic compounds นั้นได้ถูกเสนอไว้ว่าจะเกิดการเคลื่อนย้าย hydrogen radical จาก phenolic compounds ไปยัง DPPH ก่อน หลังจากนั้น phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะถูก stabilized โดยเกิดเป็น intramolecular hydrogen bonding ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยากับ DPPH ได้อีกครั้ง (Shahidi, F. *et al.*, 1992 และ Keawpradub, N. *et al.*, 2001) ดังรูป



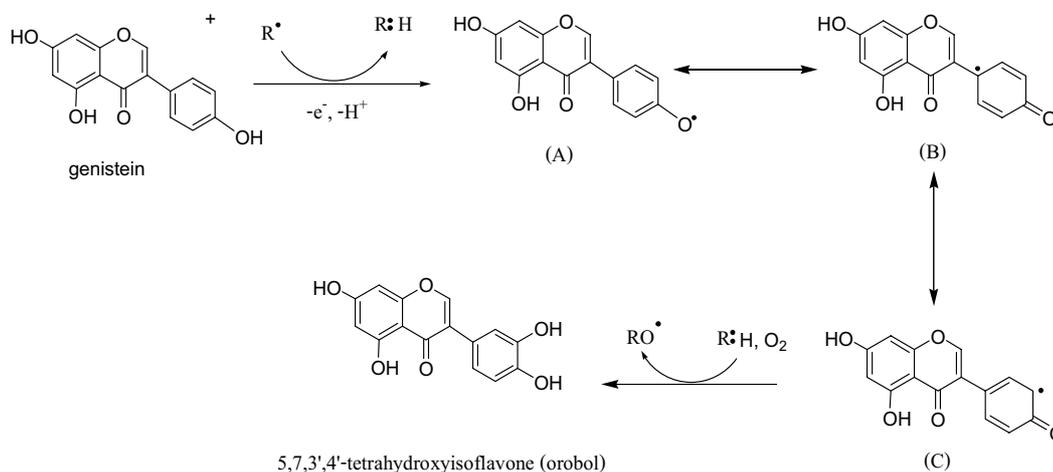
เมื่อพิจารณาจากสูตรโครงสร้าง พบว่าสารในกลุ่ม flavanoids เช่น genistein และ prunetin ไม่มีหมู่ hydroxyl ที่อยู่ในลักษณะเป็น ortho กันเหมือนกับพวก phenolic compounds ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานแต่สามารถแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน

Arora และคณะได้รายงานการศึกษากลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารในกลุ่ม flavanoids โดยนำ genistein ทำปฏิกิริยา oxidation กับ 2-2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) และ atmospheric oxygen เกิดเป็น 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone (orobol) (Arora, A. *et al.*, 2000) กลไกขั้นต้นแรกจะเกิดการสร้าง alkyl radical (R^\bullet) มาจากการให้ความร้อนแก่ AMVN ดังสมการ



หลังจากนั้น alkyl radical (R^\bullet) ที่เกิดขึ้นจะไปรับ hydrogen radical ของหมู่ hydroxyl บนวงแหวน B ของ genistein เกิดเป็น radical (A, B และ C) R : H ที่ได้ และ atmospheric oxygen จะ

เข้าทำปฏิกิริยากับ radical ใน from C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone (orobol)
ดังสมการ

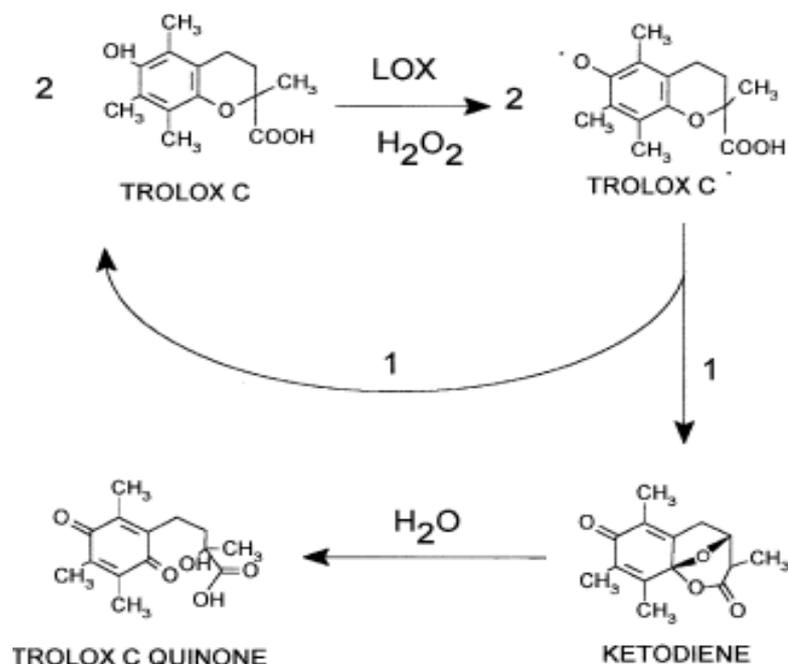


Proposed mechanism for the formation of orobol

ในงานองเดียวกัน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ genistein โดยใช้ DPPH TLC screening assay genistein จะถูก oxidize ด้วย DPPH radical ได้ orobol และ orobol ที่เกิดขึ้นจะสามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน คือ gallic acid, catechol และ catechin ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม phenolic compounds ที่มีหมู่ hydroxyl ในตำแหน่ง ortho ดังสมการข้างต้น (Shahid, F. *et al.*, 1992 และ Keawpradub, N. *et al.*, 2001) ส่วน prunetin และ 4-hydroxycinnamic acid ก็จะมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระในลักษณะเดียวกับ genistein เช่นกัน

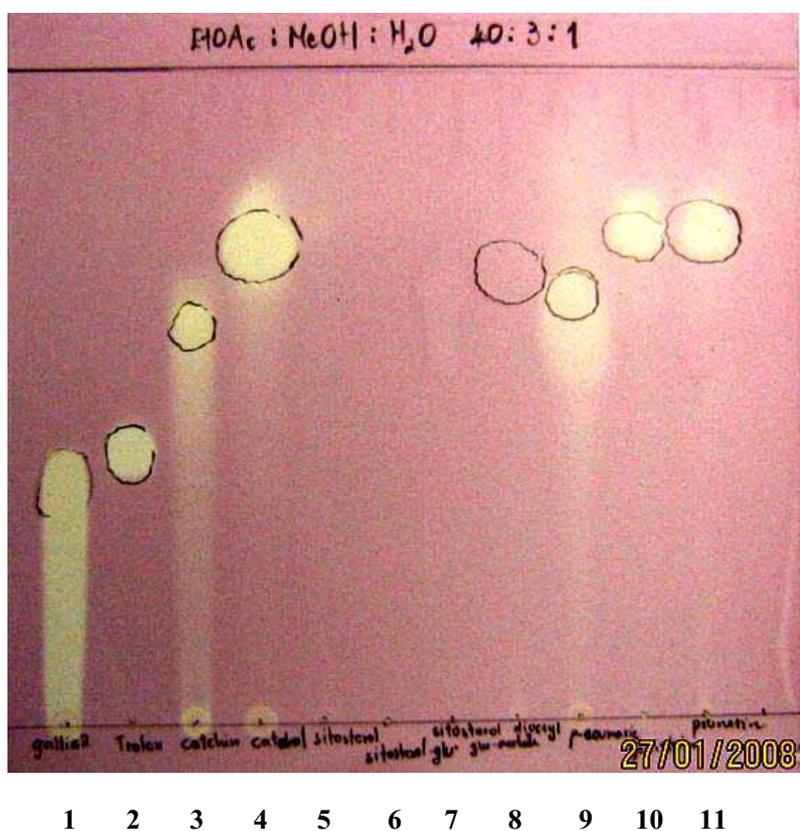
นอกจาก gallic acid, catechol และ catechin ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีสารมาตรฐานอีกชนิดหนึ่งที่ใช้คือ trolox แม้ว่า trolox จะไม่มีหมู่ hydroxyl ในตำแหน่ง ortho เช่นเดียวกับสารในกลุ่ม phenolic compounds แต่สามารถแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน

Delicado และคณะได้ศึกษาปฏิกิริยา oxidation ของ trolox โดยอาศัยเอนไซม์ lipoxygenase hydrogenperoxide เกิดเป็น trolox radical หลังจากนั้นจะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น ketodiene เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น trolox quinone กลไกการเกิดปฏิกิริยาแสดงดังสมการ (Delicado, E.N. *et al.*, 1997)



TOH = trolox C, TO^\bullet = trolox radical, TKD = trolox ketodiene, TQ = trolox quinone

ในทำนองเดียวกัน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ trolox โดยใช้ DPPH TLC screening assay trolox จะถูก oxidize ด้วย DPPH radical เกิดเป็น trolox ketodiene และเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น trolox quinone ดังสมการข้างต้นเช่นกัน



หมายเลข 1 คือ gallic acid

หมายเลข 2 คือ trolox

หมายเลข 3 คือ catechin

หมายเลข 4 คือ catechol

หมายเลข 5 คือ β -sitosterol

หมายเลข 6 คือ sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside

หมายเลข 7 คือ β -sitosterol glucoside acetate

หมายเลข 8 คือ dioctyl pathalate

หมายเลข 9 คือ 4-hydroxycinnamic acid

หมายเลข 10 คือ genistein

หมายเลข 11 คือ prunetin

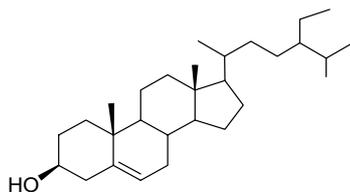
ภาพที่ 2 แสดงการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH TLC screening assay ของสารที่แยกได้จากโสน (*Sesbania javanica* Miq.)

หมายเหตุ

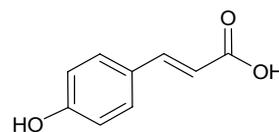
dioctyl pathalate ไม่ใช่สารที่แยกได้จากโสน แต่เป็น artifact ที่ปนเปื้อนมากับ solvent อันเนื่องมาจากการใช้อุปกรณ์ที่ทำจากพลาสติก เช่น สายยาง (Sarker, S.D. *et al.*, 2006)

สรุปผลการทดลอง

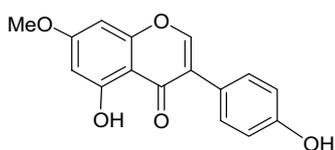
จากการทดลองสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีของดอกและใบ โสนที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ hexane, ethyl acetate และ methol ได้สารบริสุทธิ์ 5 สาร ดังนี้



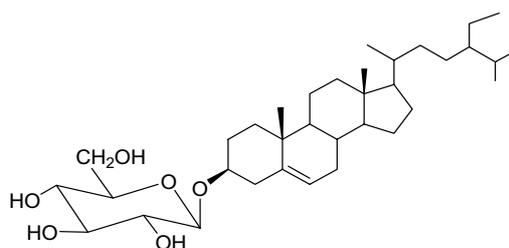
β -sitosterol (SJ-1 59.8mg)



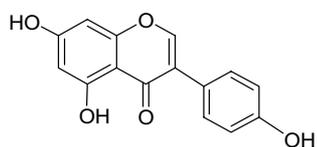
4-hydroxycinnamic acid (SJ-4 9.8mg)



prunetin (SJ-2 8.0mg)



sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (SJ-5 56.9 mg)



genistein (SJ-3 2.6mg)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH TLC screening assay โดยใช้ gallic acid, catechol, catechin และ trolox เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคือ genistein, prunetin และ 4-hydroxycinnamic acid

genistein, prunetin และ 4-hydroxycinnamic acid นอกจากจะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยังแสดงฤทธิ์ที่ดีในด้านอื่น ๆ ซึ่งมีการศึกษาและรายงานไว้ดังนี้

genistein พบในถั่วเหลือง, ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง, ใบแปะก๊วย, หนุ่ยแปรง เป็นต้น ในปี 2007 Fengqin ได้สกัดสาร genistein จากใบแปะก๊วย พบว่ามีฤทธิ์เกี่ยวกับ hormonal activities, anticarcinogenic effect, and antifungal properties. (Fengqin, W. *et al.*, 2007)

prunetin พบในกวาวเครือแดง และพืชอื่น ๆ ในปี 2000 มีรายงานฤทธิ์ของ prunetin ที่สกัดได้จากกวาวเครือแดงว่าสามารถยับยั้ง KB cell line และ BC cell line ที่ IC_{50} 71.1 ± 0.8 และ $47.3 \pm 0.3 \mu M$ ตามลำดับ (Ngamrojanavanich, N. *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (Carola, K. *et al.*, 2000)

4-hydroxycinnamic acid พบในพืชทั่วไป เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอื่น ๆ เช่น coumarin เป็นต้น ในปี 2004 มีรายงานฤทธิ์ของ 4-hydroxycinnamic acid ว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในเห็ด (*Agaricus bisporus*) ที่ IC_{50} 0.50 mM (Shi, Y. *et al.*, 2004)

บรรณานุกรม

- สุชาดา ศรีเพ็ญ (2543) “พรรณไม้น้ำในประเทศไทย” บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน) กรุงเทพฯ หน้า 198.
- Arora, A.; Valcic, S.; Cornejo, S.; Nair, M.G.; Timmermann, B.N. and Liebler, D.C. (2000)
“Reaction of genistein with alkylperoxyl radicals” *Chem.Res.Toxicol.*, **13**, 638-645.
- Blios, M.S. (1958) “Antioxidant determination by the use of a stable free radical” *Nature*, **181**,
1199-1200.
- Boonmee, A.; Reynolds, C.D. and Sangvanich, P. (2007) “2- α -Glucosidase inhibitor proteins
from *S. grandiflora* flowers: SGF60 and SGF90” *Planta Med.*, **73**(11), 1197-1201.
- Carola, K.; Kristina, J.; Karsten, S.; Mahabir, P.G.; Ulrich, B. and Eckart, E. (2000)
“Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*.” *Journal of
Ethnopharmacology*, **73**, 131-135
- Delicado, E.N.; Ferrer, A.S. and Carmona, F.G. (1997) “A kinetic study of the one-electron
oxidation of Trolox C by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase” *Biochimica
et Biophysica Acta*, **1335**, 127-134
- Dorsaz, A.C.; Hostettmann, M. and Hostettmann, K. (1987) “Molluscicidal saponins from
S. sesban” *Planta Med.*, **54**(3), 225-227.
- Durango, D.; Quinones, W.; Torres, F.; Rosero, Y.; Gil, J. and Echeverri, F. (2002) “Phytoalexin
accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors” *Molecules*, **7**,
817-832.

- Fengqin, W.; Kezhi, J. and Zuguang, L. (2007) "Purification and identification of genistein in *Ginkgo biloba* leaf extract" *Chinese Journal of chromatography*, **25**(4), 509-513
- Hossain, Md.A.; Rahman, M.S.; Chowdhury, A.M.S. and Rashid, M.A. (2007) "Bioactivities of *Sesbania sesban* extractives" *Dhaka Univ J. Pharm. Sci.*, **6**(1), 61-63.
- Keawpradub, N.; Salach, S. and Muangwong, S. (2001) "Free radical scavenging activity of star anise (*Illicium verum*)" *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, **23**(4), 527-536.
- Krasaekoopt, W. and Kongkarnchanatip, A. (2005) "Antimicrobial properties of Thai traditional flower vegetable extracts" *Aussumption J. of Technology*, **9**(2), 71-74.
- Lorian, V. (1996) "Antibiotics in Laboratory Medicine" 4th ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mikhaeil, B.R.; Badria, F.A.; Maatooq, G.T. and Amer, M.M.A. (2004) "Antioxidant and immunomodulatory constituents of henna leaves" *Z. Naturforsch.*, **59c**, 468-476.
- Misra, L.N. and Siddiqi, S.A. (2004) "Dhaincha (*Sesbania bispinosa*) leaves: A good source of antidiabetic (+)-pinitol" *Current Science*, **87**(11), 1507.
- Moghaddam, F.M.; Farimani, M.M.; Salahvarzi, S. and Amin, G. (2007) "Chemical constituents of dichloromethane extract of cultivated *Satureja khuzistanica*" *Evid Based Complement Alternat Med*, **4**(1), 95-98.
- Ngamrojanavanich, N.; Loontaisong, A.; Pengpreecha, S.; Cherdshewasart, W.; Pornpakakul, S.; Pudhom, K.; Roengsumran, S. and Petsom, A. (2007) "Cytotoxic constituents from *Butea superba* Roxb." *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 354-358
- O'Neil, M.J. (2006) "The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals" 14th ed., Merck & Co. Inc., New Jersey.

- Sarker, S.D.; Latif, Z. and Gray, A.I. (2006) "Natural Products Isolation" 2nd ed., Humana Press, Totowa, 338-339.
- Shahidi, F. and Wandasundara, P.K. (1992) "Phenolic antioxidant" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**(1), 62-103.
- Shi, Y.; Chen, Q-X.; Wang, Q.; Song, K-K. and Qiu, L. (2005) "Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase." *Food Chemistry*, **92**, 707-712
- Smitinand, T. (2001) "Thai Plant Names" revised edition, The Forest Herbarium, Royal Foreset Department, Bangkok, 480.
- Takao, T.; Kitatani, F.; Watanabe, N.; Yagi, N. and Sakata, K. (1994) "A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish" *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(10), 1780-1783.
- Talukdar, A.C.; Jain, N.; De, S. and Krishnamurty, H.G. (2000) "An isoflavone from *Myristica malabarica*" *Phytochemistry*, **53**, 155-157.
- Tangvarasittichai, S.; Sriprang, N.; Harnroongroj, T. and Changbumrung, S. (2005) "Antimutagenic activity of *Sesbania javanica* Miq. flower DMSO extract and its major flavonoid glycoside" *Southeast Asian J. Trop Med Public Health*, **36**(6), 1543-1551.
- Vitor, R.F.; Mota-Filipe, H.; Teixeira, G.; Borges, C.; Rodrigues, A.I.; Teixeira, A. and Paulo, A. (2004) "Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury" *Journal of Ethnopharmacology*, **93**, 363-370.
- Yayli, N.; Yildirim, N.; Usta, A.; Ozkurt, S. and Akgun, V. (2003) "Chemical constituents of *Campanula lactiflora*", *Turk J. Chem.*, **27**, 749-755.

ภาคผนวก

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อหาค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ใช้วิธี agar microdilution (Lorian, 1996) ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC25923, methicillin-resistant *S. aureus* SK1(MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 และ *Escherichia coli* ATCC25922 และรา คือ *Candida albicans* NCPF3153, *Cryptococcus neoformans* clinical isolate, *Cryptococcus neoformans* ATCC90112 flucytosine-sensitive, *Cryptococcus neoformans* ATCC90113 flucytosine-resistant และ *Microsporium gypseum* นำส่วนสกัดหยาบของดอกและใบโสนด้วย hexane, ethyl acetate และ methanol ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) นำสารสกัดหยาบนั้นมาทำ serial 2-fold dilutions และผสมกับ melted Mueller-Hinton agars หรือ Sabouraud's dextrose agar ในอัตราส่วน 1:100 ใน microtiter plates ที่เป็น flat-bottomed well ความเข้มข้นของสารที่ทดสอบใน agar อยู่ในช่วง 0.03-128 $\mu\text{g/mL}$ ใส่ inoculum suspensions ($10 \mu\text{L}, 10^4 \text{ CFU}$) ลงใน agar-filled wells นำ plates ที่ inoculated แล้วไป incubate ที่ 35°C นาน 18 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และนาน 48 ชั่วโมงสำหรับ *C. albicans* และ *C. neoformans* อ่านค่า MICs ที่ได้โดยบันทึกความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตที่เห็นด้วยตาเปล่า ใช้ DMSO เป็น negative control ใช้ vancomycin และ gentamycin เป็นยาด้านแบคทีเรียมาตรฐานและใช้ amphotericin B เป็นยาด้านเชื้อรามาตรฐาน



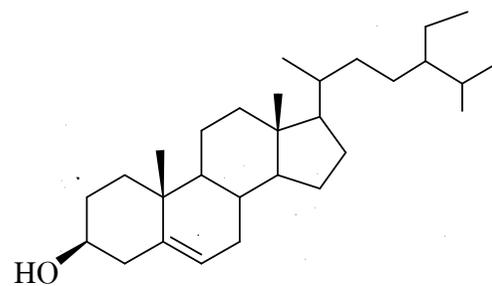
Department of Chemistry

Current Data Parameters
NAME OPUT0108003
EXPNO 1
PROCNO 1

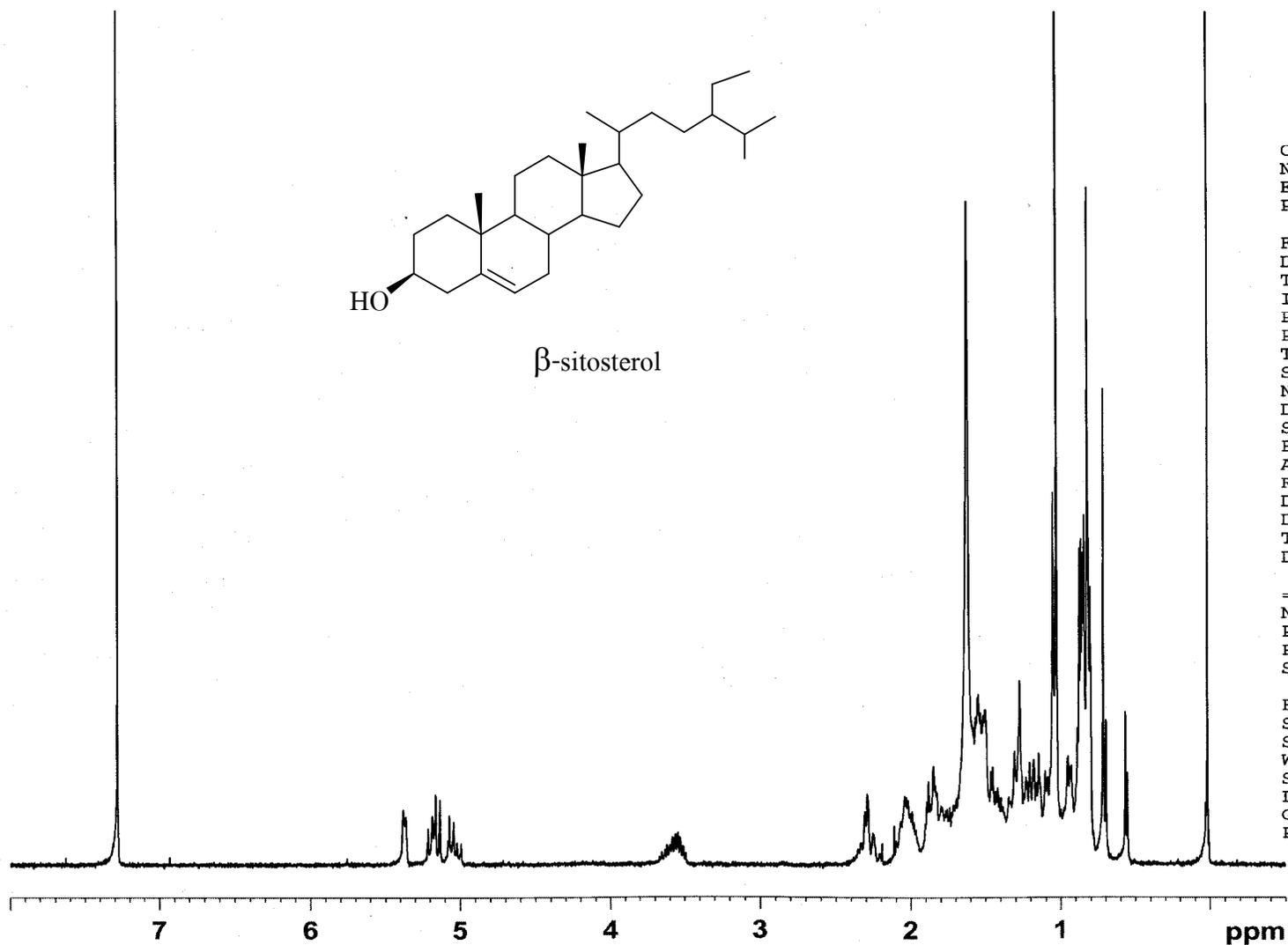
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080105
Time_ 15.07
INSTRUM av300
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 32
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 456.1
DW 81.000 usec
DE 20.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 11.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.40

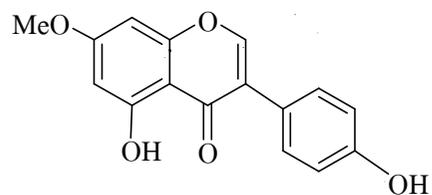


β -sitosterol

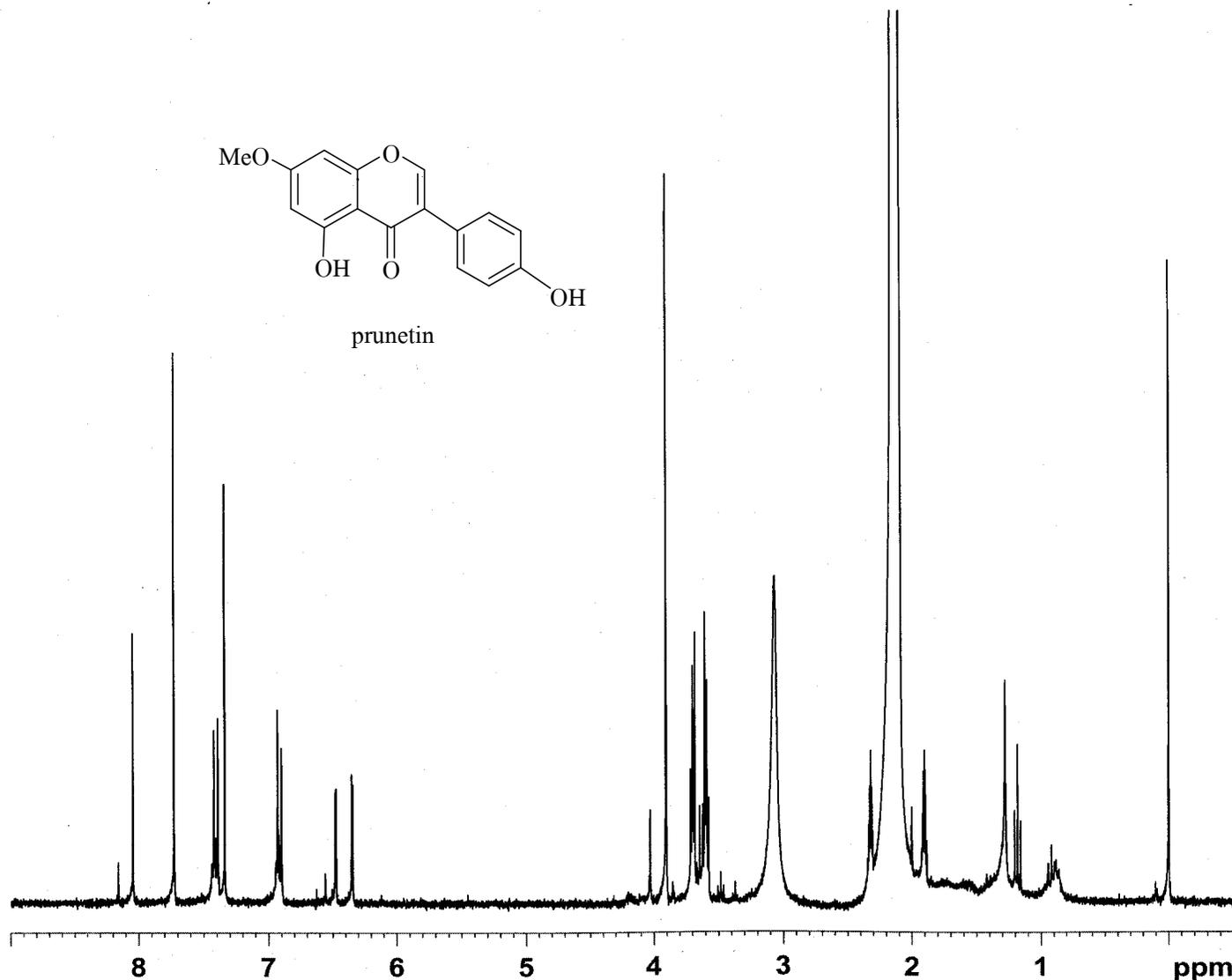




Department of Chemistry



prunetin

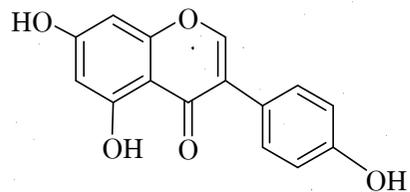


Current Data Parameters
NAME OPUT0108001
EXPNO 1
PROCNO 1

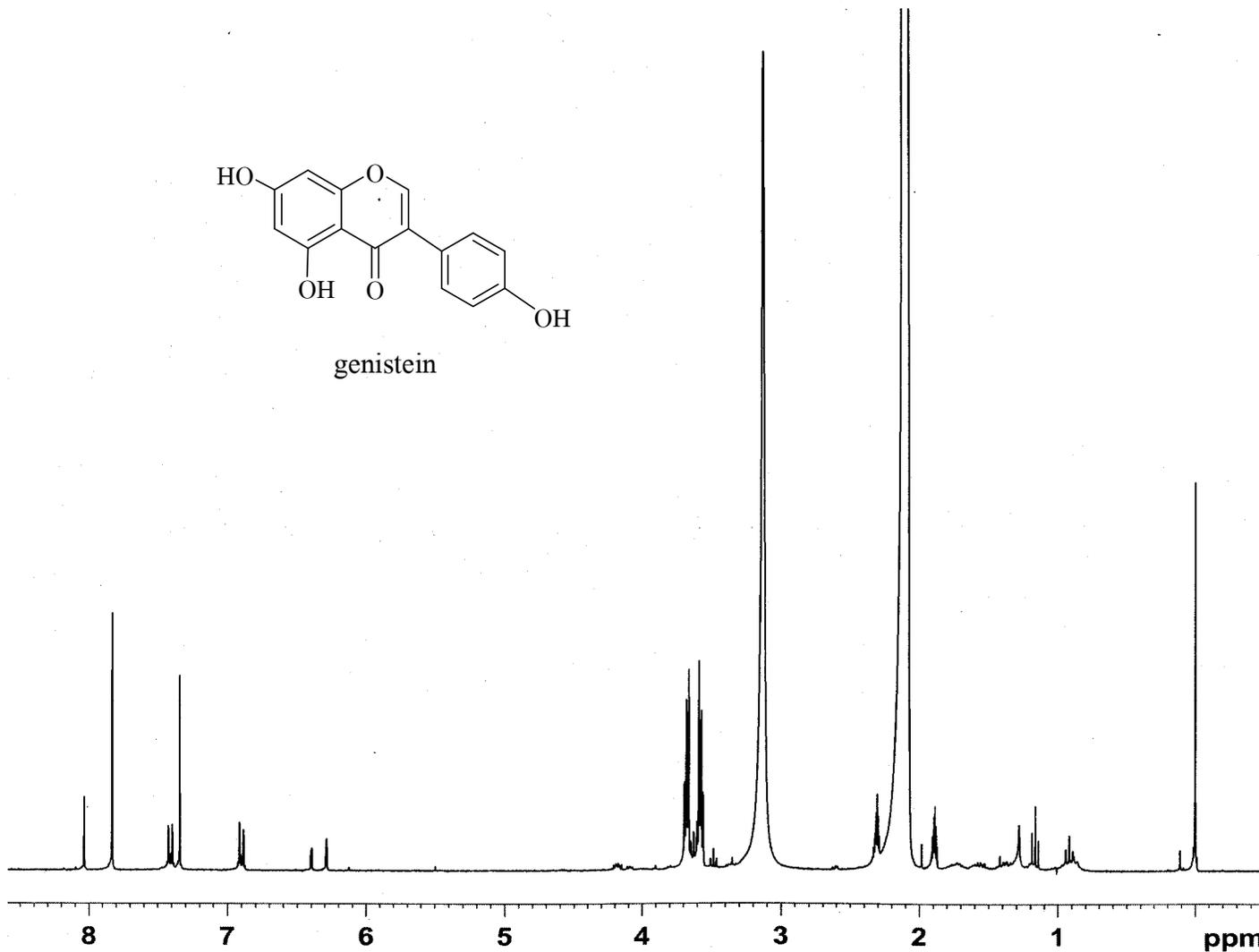
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080111
Time 16.23
INSTRUM av300
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 6172.839 Hz
FIDRES 0.094190 Hz
AQ 5.3084660 sec
RG 203.2
DW 81.000 usec
DE 20.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 11.40 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 300.1298649 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00



genistein

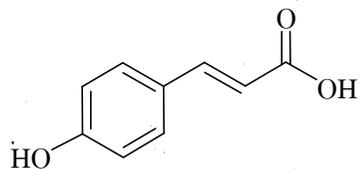


Current Data Parameters
 NAME OPUT0108002
 EXPNO 1
 PROCNO 1

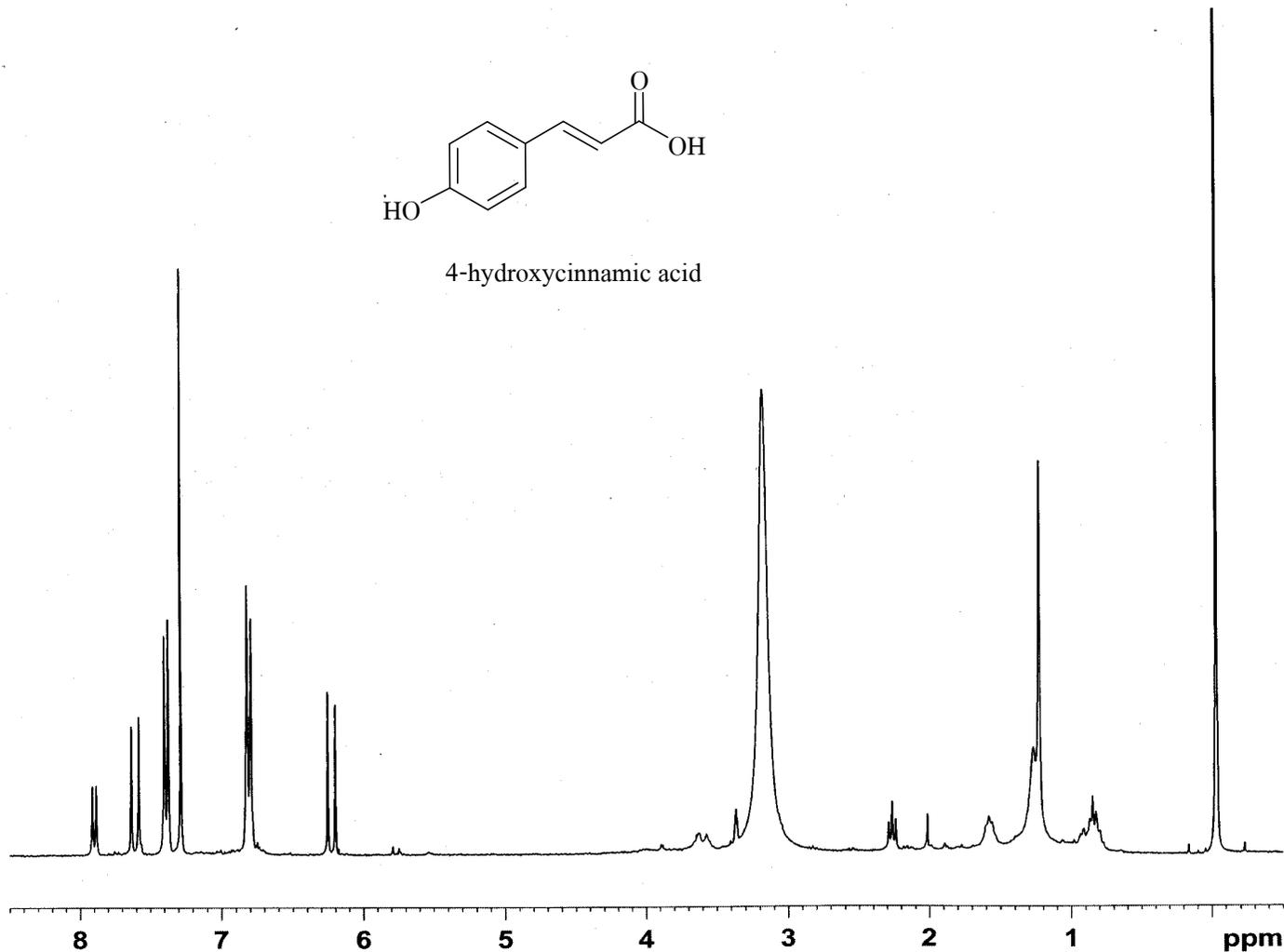
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20080105
 Time 16.38
 INSTRUM av300
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 64
 DS 2
 SWH 6172.839 Hz
 FIDRES 0.188380 Hz
 AQ 2.6542580 sec
 RG 322.5
 DW 81.000 usec
 DE 20.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 11.40 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1315507 MHz
 WDW no
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00



4-hydroxycinnamic acid



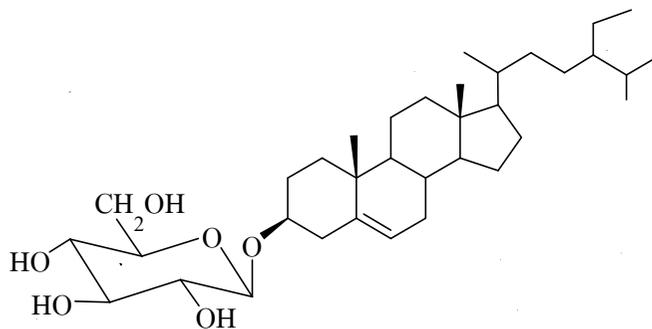
Department of Chemistry

Current Data Parameters
 NAME OP-801
 EXPNO 1
 PROCNO 1

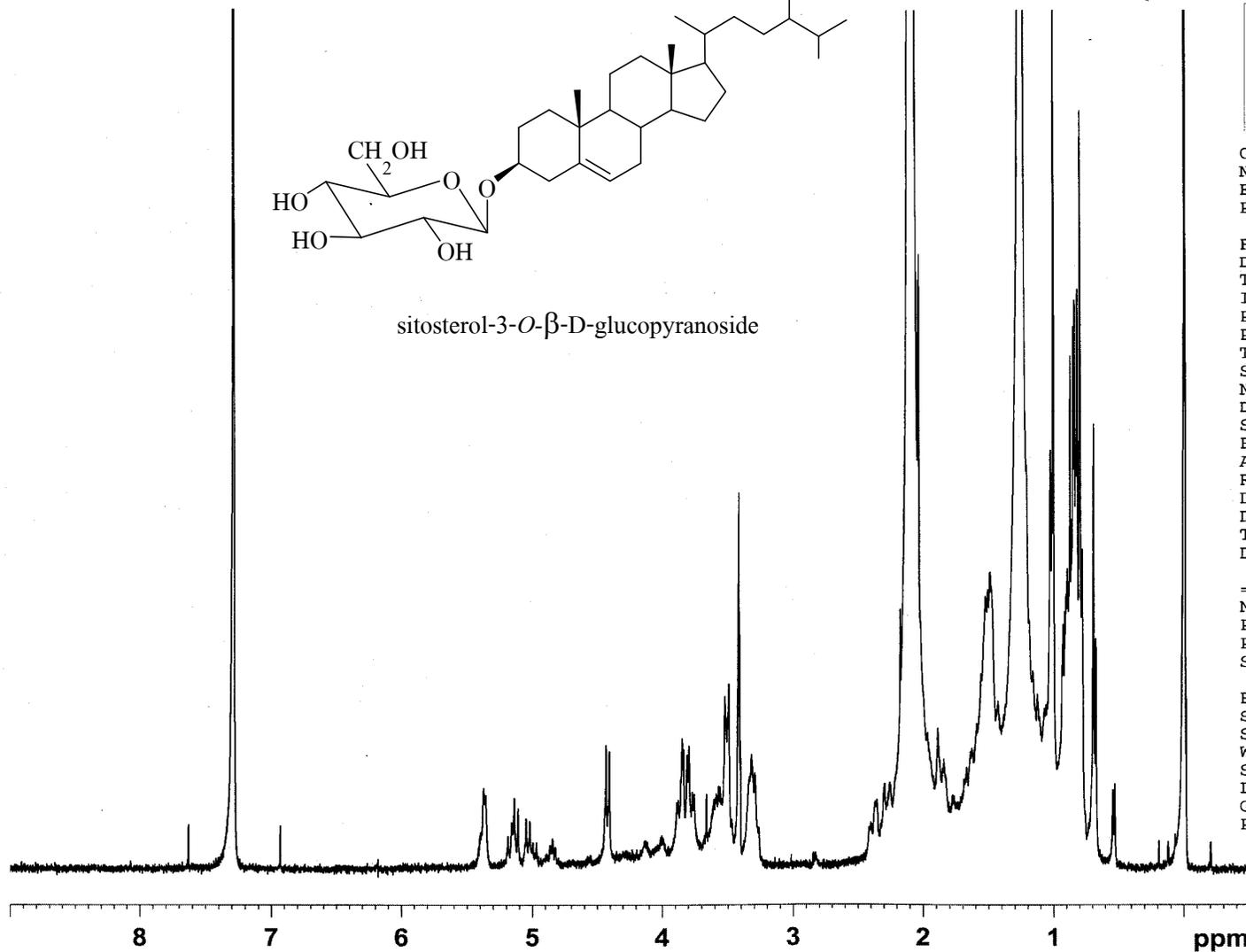
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20070410
 Time 15.16
 INSTRUM av300
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 32
 DS 2
 SWH 6172.839 Hz
 FIDRES 0.188380 Hz
 AQ 2.6542580 sec
 RG 645.1
 DW 81.000 usec
 DE 20.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 10.50 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00



sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside



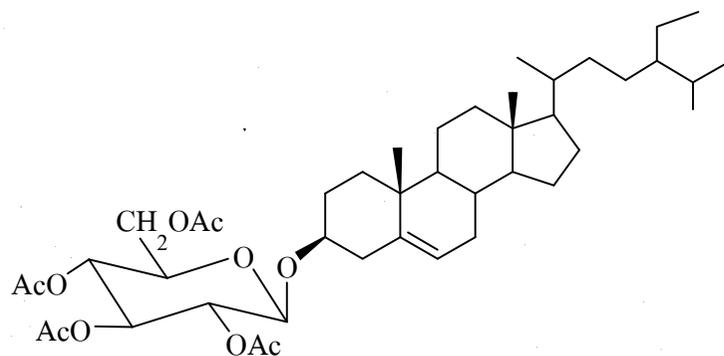
Department of Chemistry

Current Data Parameters
 NAME OPUT0108004
 EXPNO 1
 PROCNO 1

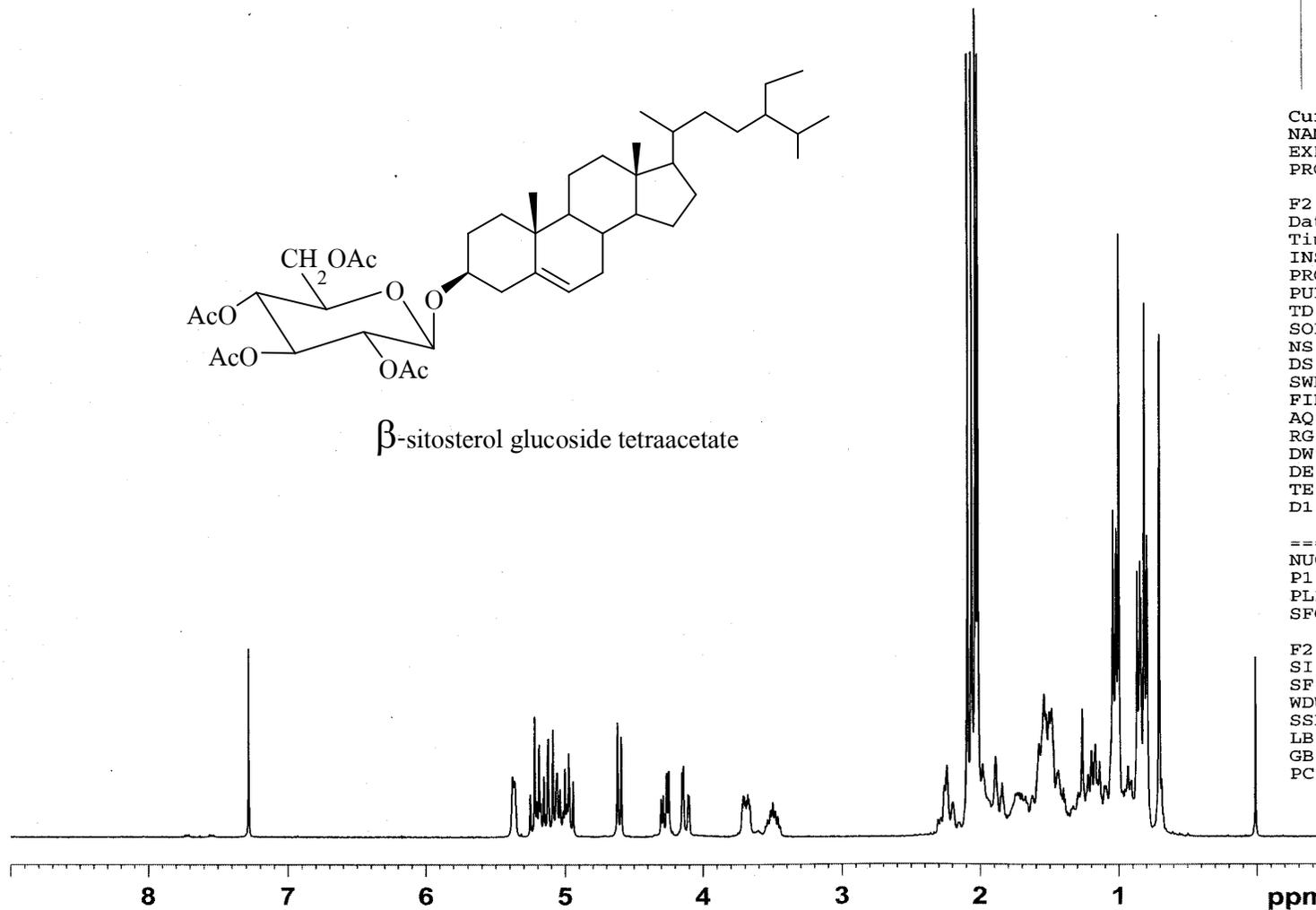
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20080105
 Time 16.10
 INSTRUM av300
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 512
 DS 2
 SWH 6172.839 Hz
 FIDRES 0.188380 Hz
 AQ 2.6542580 sec
 RG 574.7
 DW 81.000 usec
 DE 20.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 11.40 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300000 MHz
 WDW no
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00



β -sitosterol glucoside tetraacetate



Current Data Parameters
 NAME OPUT0108005
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20080107
 Time_ 13.10
 INSTRUM av300
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 2
 SWH 6172.839 Hz
 FIDRES 0.188380 Hz
 AQ 2.6542580 sec
 RG 203.2
 DW 81.000 usec
 DE 20.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 11.40 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 300.1318534 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.1300000 MHz
 WDW no
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล ที่อยู่	นางสาวอุทัยวรรณ เลิศศักดิ์ศรีสกุล 62 หมู่ 5 ตำบลหนองสองห้อง อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร 74120
ที่ทำงาน	โรงเรียนสมุทรสาครบูรณะ 919 ถนนนรสิงห์ ตำบลมหาชัย อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร โทรศัพท์ (034) 411787 ต่อ 630
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2539	สำเร็จการศึกษาปริญญาครุศาสตรบัณฑิต วิชาเอกเคมี จากสถาบันราชภัฏนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์
พ.ศ. 2546	ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเคมีศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2539 -ปัจจุบัน	ครูสอนวิทยาศาสตร์ โรงเรียนสมุทรสาครบูรณะ