

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 การสกัดสารจากแก่นมะหาดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

จากการสกัดสารจากแก่นมะหาดด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย (Maceration) เอทิลอะซิเตต และเมทานอล โดยการชั่งผงมะหาด 2.315 กิโลกรัม แช่ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตปริมาตร 8 ลิตร ทั้งหมด 5 ครั้ง จะได้สารละลายสีเหลือง เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต และนำกากพืชที่เหลือมาทำการสกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 8 ลิตร ทั้งหมด 5 ครั้ง จะได้สารละลายสีน้ำตาลเหลือง เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลาย จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละชั้นและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ (%) ของสารสกัดหยาบเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง ดังแสดงผลการสกัดสารในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการสกัดสารด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	สารสกัดหยาบ (g)	ลักษณะของสารสกัดหยาบ	เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ (% g / g พืชแห้ง)
เอทิลอะซิเตต	137.81	ของแข็งสีเหลือง	5.95
เมทานอล	250.20	ของแข็งสีน้ำตาลเหลือง	10.81

จากการศึกษาการสกัดสาร oxyresveratrol ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตต และเมทานอล พบว่า การสกัดด้วยเมทานอลจะได้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบได้มากกว่าการใช้สารเอทิลอะซิเตต แต่เนื่องจากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดสามารถเหลือตกค้างในการสกัดได้สูง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความเป็นพิษเกิดขึ้น ผู้วิจัยจึงสนใจทำการสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายเอทานอลซึ่งจะมีความเป็นพิษที่น้อยกว่าและสามารถนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ ได้ง่ายกว่า

### 4.2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร oxyresveratrol

#### 4.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัด

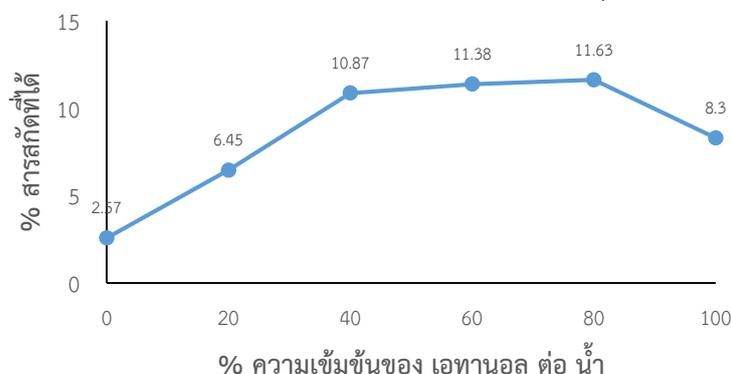
จากการศึกษาหาความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด ด้วยวิธีการแช่พืช (maceration) ที่อุณหภูมิห้อง ที่ใช้ความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100% เอทานอล โดยอัตราส่วนในการสกัดระหว่างพืชต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 10 ทำการแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาทำการกรองและระเหยตัวทำละลายออก

ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ และทำการตรวจสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC ดังแสดงภาพที่ 4.1 จากการศึกษาพบว่า กลุ่มสารหลักที่มีความเข้มของจุดสารมาก ที่มีการสกัดด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 80 % และ 100% เอทานอล จะให้ความเข้มของจุดสารมากที่สุดและมีความเข้มที่ใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 4.1 แสดงการตรวจสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC ด้วยระบบ 5 % MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

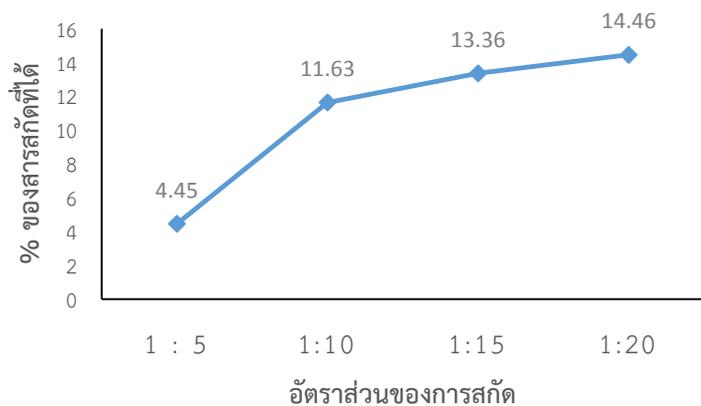
เมื่อนำสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 4.2 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลในสกัดเป็น 80 % จะให้เปอร์เซ็นต์การสกัดที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ 100 % ในการสกัด ประกอบจากการตรวจสอบกลุ่มสารพบว่า การสกัดด้วย 80 % เอทานอล จะให้ความเข้มของสารสำคัญใกล้เคียงกับการใช้ 100 % เอทานอลในการสกัด ดังนั้นความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมที่สุด คือ 80 %



ภาพที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอทานอลที่ใช้สกัด

#### 4.2.2 การศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัด

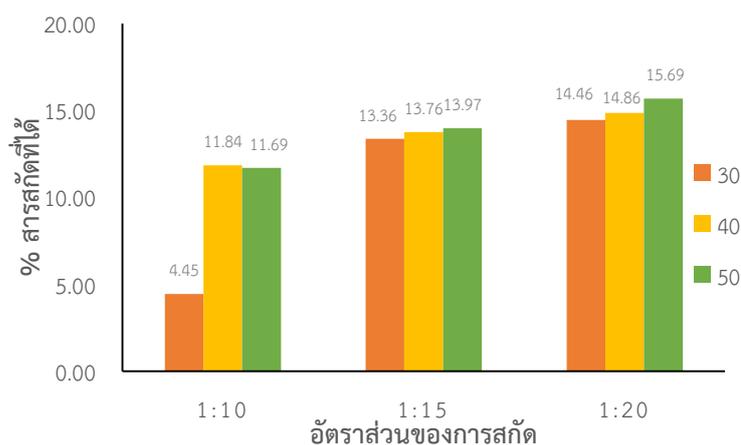
การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดด้วย 80 % เอทานอล โดยใช้อัตราส่วนระหว่างพืชต่อตัวทำละลายเป็น 1:5, 1:10, 1:15 และ 1:20 โดยทำการแช่ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงผลการวิจัยในภาพที่ 4.3 จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายมากขึ้นปริมาณสารสกัดที่จะได้จะเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อใช้อัตราส่วนเป็น 1:15 และ 1:20 พบว่า เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นอัตราส่วนในการสกัดสารที่เหมาะสมที่สุดคืออัตราส่วน 1:15



ภาพที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้โดยสกัดด้วย 80% เอทานอลในอัตราส่วนต่าง ๆ

#### 4.2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด

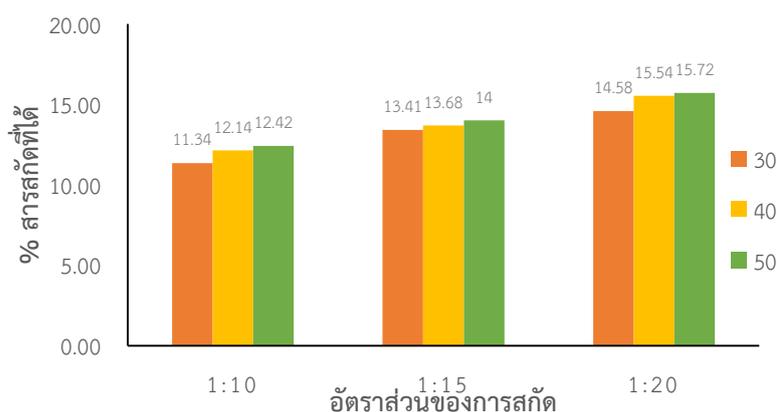
จากการศึกษาข้อ 4.2.1 และข้อ 4.2.2 พบว่า การสกัดสารด้วย 80 % เอทานอล เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิใช้ในการสกัดโดยศึกษาอุณหภูมิในการสกัดเป็น 30, 40 และ 50 °C โดยใช้อัตราส่วนในการสกัดเป็น 1:10, 1:15 และ 1:20 จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดที่สูงขึ้น ปริมาณสารสกัดที่ได้มี % สารสกัดที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อใช้อัตราส่วนเป็น 1:10, 1:15 และ 1:20 ตามลำดับ แต่เมื่อทำการสกัดด้วยอัตราส่วนในการสกัดที่ 1:10 พบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัด 30 °C จะได้เปอร์เซ็นต์สารสกัดที่น้อยแต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่า ปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 4.4 จากผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญ คือ อุณหภูมิ 40 °C



ภาพที่ 4.4 แสดงผลการสกัดที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 °C โดยใช้อัตราส่วนในการสกัดต่าง ๆ

#### 4.2.4 การศึกษาผลของการเขย่าต่อปริมาณสารสกัด

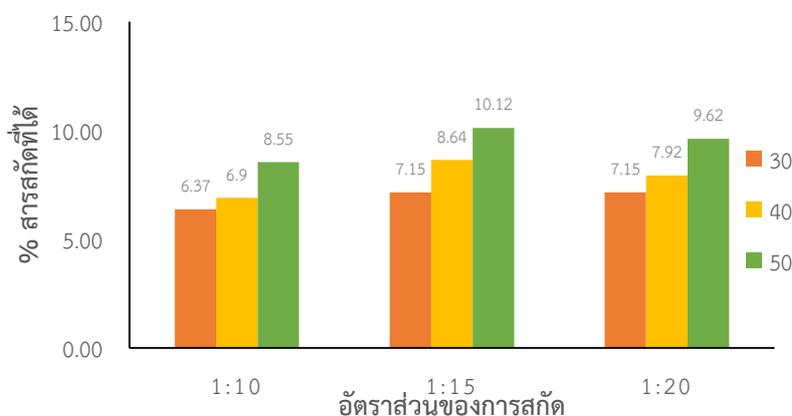
จากการศึกษาข้อ 4.2.1 เมื่อทำการสกัดสารสำคัญด้วย 80 % เอทานอล ใช้อัตราส่วนในการสกัดเป็น 1:10, 1:15 และ 1:20 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยวิธีการเขย่า โดยใช้ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 °C จากการศึกษพบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดที่สูงขึ้น ปริมาณสารสกัดที่ได้มี % สารสกัดที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก เมื่อใช้อัตราส่วนเป็น 1:10, 1:15 และ 1:20 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 แสดงผลการสกัดที่อุณหภูมิและอัตราส่วนในการสกัดต่าง ๆ ด้วยวิธีการเขย่า

#### 4.2.5 การศึกษาผลของการสกัดด้วยวิธีการสั่นสะเทือนด้วยเสียง

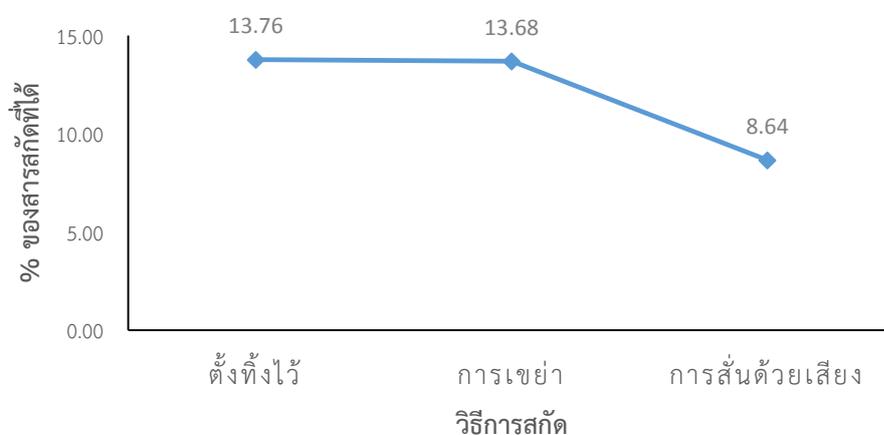
จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยวิธีการสั่นสะเทือนด้วยเสียง ทำการสกัดด้วย 80 % เอทานอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 °C โดยใช้ อัตราส่วนในการสกัดเป็น 1:10, 1:15 และ 1:20 จากการศึกษพบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัด สูงขึ้นเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้จะสูงขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบการสกัดที่อัตราส่วน 1:10, 1:15 และ 1:20 ตามลำดับปริมาณสารสกัดที่ได้มี % สารสกัดที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนักดังแสดงผลภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 แสดงผลการสกัดที่อุณหภูมิและอัตราส่วนในการสกัดต่าง ๆ ด้วยวิธีการสั่นสะเทือนด้วยเสียง

#### 4.2.5 การศึกษาเปรียบเทียบผลของการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ

จากการศึกษาการสกัดสารสำคัญข้อ 4.2.1 ถึง 4.2.3 พบว่า การสกัดด้วยเอทานอลที่เหมาะสมที่สุดคือที่ความเข้มข้น 80% โดยใช้อัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลายเป็น 1:15 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด คือ 40 °C โดยใช้เวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดคือ การตั้งทิ้งไว้ การเขย่า และการสั่นสะเทือนด้วยเสียงดังแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่า การสกัดด้วยวิธีการตั้งทิ้งไว้และการเขย่าจะให้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นว่าการเขย่าไม่มีผลต่อการละลายของสารสำคัญในตัวทำละลาย เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดที่ 40 °C แต่จะได้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่สูงกว่าการใช้วิธีการสั่นสะเทือนด้วยเสียง



ภาพที่ 4.7 แสดงผลการเปรียบเทียบการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ

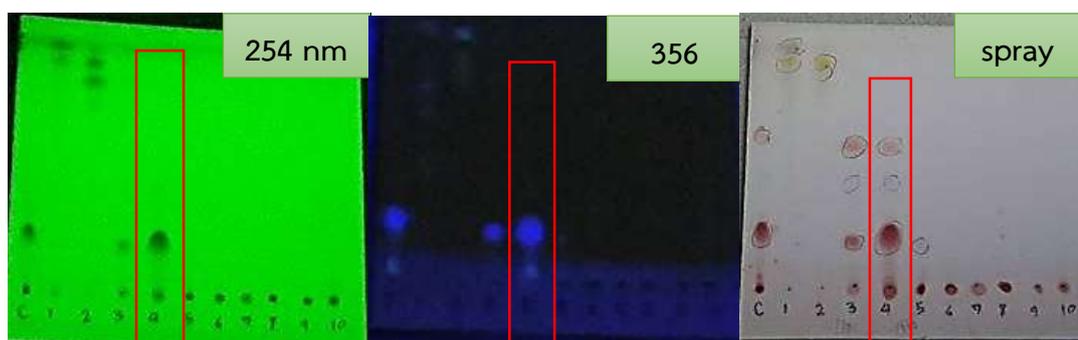
#### 4.3. การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column Chromatography

4.3.1 แบ่งสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต (45 กรัม) แยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี แบบคอลัมน์ชนิดเร็ว (Quick Column Chromatography) โดยใช้ระบบตัวทำละลายในการชะ 100 %  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ถึง 100 % methanol ทำการเพิ่มหัวที่ละ 10% เต็มครั้งละ 500 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 100 มิลลิลิตร เก็บรวมสารเป็นกลุ่ม ๆ โดยนำมาทำการทดสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV ที่ความยาวคลื่น 254, 365 nm) และ spray แผ่น TLC ด้วย *p*-anisaldehyde reagent นำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนจนเกิดสีและนำกลุ่มสารที่คล้ายกันมารวมกัน แบ่งได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงสารที่แยกได้จากส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซิเตตของแก่นมะหาด

กลุ่มที่	ระบบตัวชะ	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร	% yield
1	100% Dichloromethane	0.4381	ของแข็งสีเหลือง	0.97
2	10-40% acetone/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.5328	ของแข็งสีเหลือง	1.18
3	50-70% acetone/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.4291	ของแข็งสีน้ำตาลปนเหลือง	0.95
4	80-90% acetone/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	36.365	ของแข็งสีน้ำตาล	80.81
5	100% acetone	2.673	ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม	5.94
6	10-20% methanol/acetone	1.834	ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม	4.08
7	30-40% methanol/acetone	2.484	ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม	5.52
8	50-70% methanol/acetone	1.7415	ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม	3.87
9	80-90% methanol/acetone	0.0124	ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.027
10	100% methanol	129.8	ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม	0.28

เมื่อนำมาทำการตรวจสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบการชะที่ 5% methanol /CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> จะแสดงดังภาพที่ 4.8 โดยสารในกลุ่มที่ 4 จะให้สีชมพูที่มีดวงใหญ่ที่สุด นอกจากนี้ยังพบสารที่ให้สีเหลืองและส้ม กับ spray reagent อีกประมาณ 2 กลุ่ม โดยจากการคำนวณหาค่า R<sub>f</sub> จะมีค่าเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.5 ตามลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นสารจำพวกสตีวบิน ประกอบกับลักษณะของสารที่อยู่ในขวด มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ผสมอยู่ในของหนืดสีน้ำตาลที่มีน้ำหนักมากที่สุด ดังภาพที่ 4.9 จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี



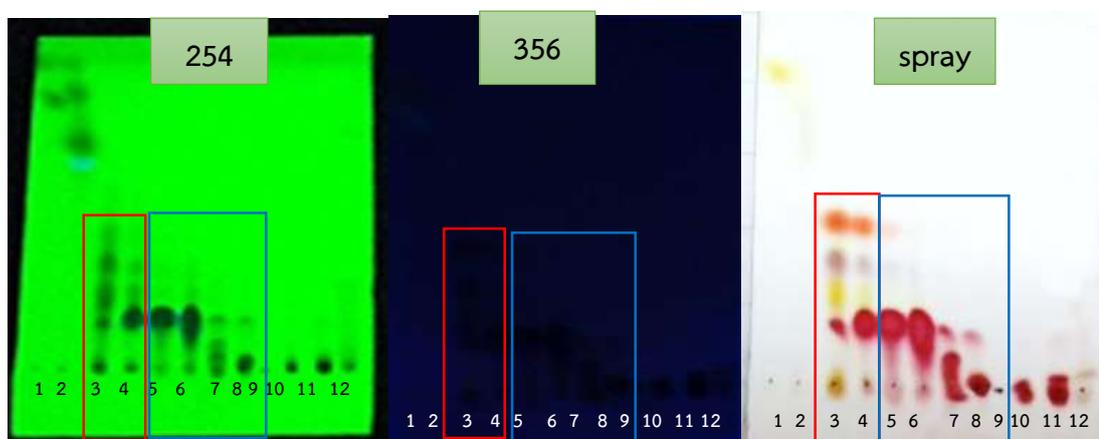
ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะที่ปรากฏบนแผ่น TLC เมื่อทำการส่องภายใต้แสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 254, 365 นาโนเมตร และหลังให้ความร้อนกับ spray reagent



ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะสาร fraction 4 ภายในขวดของสารที่แยกได้จากโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว

4.3.1.1 แบ่งสารกลุ่มที่ 4 มา 11.05 กรัม มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวปนกับของแข็งสีน้ำตาล ที่ได้จากการชะด้วยระบบ acetone-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:60) จากการตรวจสอบด้วย TLC พบว่า จะให้ดวงสารสีชมพูกับ *p*-anisaldehyde reagent เป็นดวงที่ใหญ่ที่สุด จึงนำมาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) จำนวน 100 กรัม ได้ความสูง 15.5 เซนติเมตร เลือกใช้ระบบตัวทำละลายในการชะ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ถึง 100% methanol การเพิ่มขี้ที่ละ 0.5% ปริมาตรที่ใช้ระบบละ 300 มิลลิลิตร เก็บรวมสารเป็นกลุ่ม ๆ โดยนำมาทำการทดสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิค TLC และนำกลุ่มสารที่คล้ายกันมารวมกันได้ทั้งหมด 12 กลุ่มสารย่อย (ภาคผนวกที่ ข-1)

จากการแยก เมื่อตั้งทิ้งไว้พบว่า มีของแข็งตกภายในภาชนะ แล้วนำมาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบการชะ 5 % methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> พบดวงสารสีส้มที่น่าสนใจ ในกลุ่มที่ 3 และ 4 เมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นพบว่า มีขี้น้อยกว่าดวงสารสีชมพูที่พบเหมือนกันในกลุ่มที่ 5-11 แสดงดังภาพที่ 4.10 จึงนำมาทำการแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี



ภาพที่ 4.10 แสดงการสปอตสารทั้ง 12 กลุ่ม ที่ได้จากการแบ่งกลุ่มที่ 4 มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

สารกลุ่มย่อยที่ 4.3 และ 4.4 มีน้ำหนักรวม 373.7 มิลลิกรัม เป็นของหนืดปนกับของแข็งสีน้ำตาล ได้จากการชะด้วยระบบ 1.5-4 % methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุ silica gel จำนวน 17 กรัม ได้ความสูง 8.5 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% hexane-100% acetone ทำการเพิ่มความมีขี้ผึ้ง 0.5% เติมระบบครั้งละ 100 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 5 มิลลิลิตร สารมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนน้ำตาล (75.8 มิลลิกรัม) นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร บรรจุ silica gel จำนวน 5 กรัม ได้ความสูง 9.5 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100 % hexane-30 % acetone ทำการเพิ่มความมีขี้ผึ้ง 0.5% เติมระบบครั้งละ 100 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 5 มิลลิลิตร silica gel 5-100% acetone/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) และนำกลุ่มสารที่คล้ายกันมารวมกัน แบ่งได้ทั้งหมด 18 กลุ่มย่อย (ภาคผนวกที่ ข-2)

หลังจากการแยกสารกลุ่มที่ 4.3 และ 4.4 พบว่าสารในกลุ่มย่อยที่ 6 ให้ดวงสารสีส้มเพียงดวงเดียว กับ spray reagent เมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ โดยทำการตรวจซ้ำหลาย ๆ รอบ จนพบว่ายังให้ดวงสารเพียงดวงเดียว แสดงในภาพที่ 4.11 จึงสนใจที่จะนำไปพิสูจน์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR พบว่า สามารถแยกสารที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มใส ไม่มีสี ประมาณ 70 มิลลิกรัม จึงนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR ได้สารประกอบ B



ภาพที่ 4.11 แสดงดวงสารกลุ่มที่ 7 หลังจากนำสารกลุ่มที่ 4.3-4.4 มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยระบบการชะที่ 40% acetone/hexane

กลุ่มย่อยที่ 4.5 และ 4.6 มีน้ำหนักรวม 3.1525 กรัม ของแข็งสีน้ำตาลปนเหลือง ได้จากการชะที่ระบบ 4-6% methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> แยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) จำนวน 35 กรัม ได้ความสูง 7 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% hexane – 30% acetone/hexane ทำการเพิ่มความมีขี้ผึ้ง 1% เติมระบบครั้งละ 250 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ข-3) สามารถแยกสารของแข็งสีเหลืองอ่อนได้ประมาณ 0.870 กรัม จึงนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR ได้สารประกอบ A

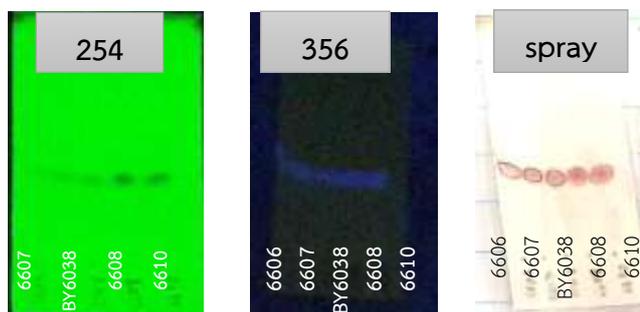
กลุ่มย่อยที่ 4.7 น้ำหนัก 2.0251 กรัม ของแข็งสีน้ำตาลปนเขียว ได้จากการชะที่ระบบ 6% methanol /CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) จำนวน 35 กรัม ได้ความสูง 9.5 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% hexane – 50% acetone/hexane ทำการเพิ่มความมีขี้ที่ละ 1% เติมระบบครั้งละ 200 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 100 มิลลิลิตร ได้ทั้งหมด 15 กลุ่มย่อย (ภาคผนวกที่ ข-4) สามารถแยกสารของแข็งสีเหลืองอ่อนได้ประมาณ 1.26 กรัม จึงนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR ได้สารประกอบ A

กลุ่มย่อยที่ 4.8 น้ำหนัก 3.1428 กรัม ของแข็งสีน้ำตาลปนเทา ได้จากการชะที่ระบบ 7% methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) จำนวน 50 กรัม ได้ความสูง 8.5 เซนติเมตร ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ถึง 10% methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ทำการเพิ่มความมีขี้ที่ละ 1% เติมระบบครั้งละ 300 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 50-100 มิลลิลิตร ได้ทั้งหมด 10 กลุ่มย่อย (ภาคผนวกที่ ข-5) สามารถแยกสารของแข็งสีเหลืองอ่อนได้ประมาณ 2.91 กรัม จึงนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR ได้สารประกอบ A

กลุ่มย่อยที่ 4.9 น้ำหนัก 539 มิลลิกรัม ของแข็งสีน้ำตาล ได้จากการชะที่ระบบ 7-9% methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เซนติเมตร บรรจุ silica gel (7729) ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ถึง 5% methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ทำการเพิ่มความมีขี้ที่ละ 0.1 % เติมระบบครั้งละ 300 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 5 มิลลิลิตร เมื่อทำการรวมกลุ่มจะได้ทั้งหมด 10 กลุ่มย่อย นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มสารที่ 3 ของแข็งสีเหลืองอ่อนประมาณ 16.3 มิลลิกรัม จึงนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR ได้สารประกอบ A (sss6611) (ภาคผนวกที่ ข-6)

กลุ่มย่อยที่ 4.10 และ 4.11 มีน้ำหนักรวม 1.0291 กรัม ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม ได้จากการชะที่ระบบ 10-30% methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> นำมาแยกด้วยต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี บรรจุ silica gel ชะด้วยระบบตัวทำละลาย 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - 100% methanol ทำการเพิ่มความมีขี้ที่ละ 1% เติมระบบครั้งละ 300 มิลลิลิตร เก็บครั้งละ 50-100 มิลลิลิตร และนำกลุ่มสารที่คล้ายกันมารวมกันได้ทั้งหมด 11 กลุ่ม (ภาคผนวกที่ ข-7)

เมื่อทำการรวมสารที่ได้ทั้งหมด พบว่าสารประกอบ A ที่ได้จากการแยกทั้งหมดมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วย TLC โดยระบบการชะ 5 % methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ทำการตรวจซ้ำ 5 รอบ พบว่าให้ดวงสารสีชมพูกับ spray reagent เพียงดวงเดียว ดังแสดงภาพที่ 4.12 นำสารประกอบ A ทั้งหมดรวมกัน ได้ 6.2503 กรัม นำไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี



ภาพที่ 4.12 แสดงดวงของสารประกอบ A ทั้งหมดที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

#### 4.4 การพิสูจน์โครงสร้างของสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

##### 1) สารประกอบ A

เป็นของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล น้ำหนัก 5.04 กรัม mp 194-195 °C ค่า  $R_f$  0.13 (5% methanol- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ; methanol; nm) 239, 219

IR ( $\nu$ ;  $\text{cm}^{-1}$ ) 3176 (OH-stretching), 1589 (C=C, aromatic), 1516 (C=C, Olefin), 974 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\delta$ ; ppm;  $\text{DMSO-}d_6$ ): แสดงในตารางที่ 4.3, 4.4

##### 2) สารประกอบ B

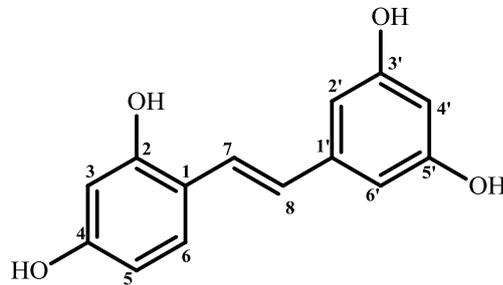
เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี น้ำหนัก 70 มิลลิกรัม ค่า  $R_f$  0.55 (5% MeOH- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ; methanol; nm) 283, 206

IR ( $\nu$ ;  $\text{cm}^{-1}$ ) 3207 (OH-stretching), 1589 (C=C, aromatic), 1608 (C-H, aromatic)

$^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\delta$ ; ppm;  $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-}d_6$ ): แสดงในตารางที่ 4.5, 4.6

## สารประกอบ A



สารประกอบ A เป็นของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล จากข้อมูล UV จะแสดงค่าการดูดกลืนสูงสุด ( $\lambda_{\max}$ ) ที่ 239 และ 219 นาโนเมตร ที่ใกล้เคียงกับข้อมูลที่เคยถูกรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ( $\lambda_{\max}$  327, 301, 239, 218 nm (Soekamto, et al.2005) ข้อมูล IR ให้แก่การสั่นแบบยืดของหมู่ hydroxyl ที่ 3176.76 หมู่ C=C aromatic ที่ 1589.34 หมู่ Olefinic ที่ 1516.05 และหมู่ C-O ที่ 974.05 ( $\text{C-O}$ )  $\text{cm}^{-1}$

ข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  พบสัญญาณ  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) ที่ 6-7.5 เป็นสัญญาณโปรตอนของหมู่ aromatic, olefin ที่  $\delta$  (ppm) 6.06 (1H, brt,  $J=2.0$  Hz, H-4'), 6.24 (1H, dd,  $J=8.4, 2.31$  Hz, H-5), 6.32 (1H, d,  $J=2.31$  Hz, H-3), 6.32 (2H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2'), 6.77 (1H, d,  $J=16.5$  Hz, H-8), 7.15 (1H, d,  $J=16.5$  Hz, H-7), 7.33 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-6) สัญญาณที่  $\delta$  (ppm) 9-10 เป็นสัญญาณโปรตอนของหมู่ hydroxy พบสัญญาณ brs ที่  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 9.15, 9.38, 9.58 จำนวน 4 โปรตอน จากค่า  $J$  ที่แสดงถึงโปรตอนที่เกี่ยวข้องกัน หากโปรตอนอยู่ใกล้กันค่า  $J$  จะเท่ากัน พบว่าที่  $\delta$  (ppm) 6.06, 6.32 มีค่า  $J$  เท่ากับเกิดการคู่ควบแบบ W coupling ที่แสดงค่า  $J$  น้อย ที่  $\delta$  6.77, 7.15 มีค่า  $J$  ที่ 16.5 Hz เท่ากันเกิดการคู่ควบของหมู่ olefin แบบ *trans* จึงแสดงค่า  $J$  ที่มาก และที่  $\delta$  6.24 มีค่า  $J$  เท่ากับ 8.4 Hz ที่เท่ากับ  $\delta_{\text{H}}$  7.33 จึงเกิดการคู่ควบที่อยู่บนวงแหวนมาติกเดียวกันแบบ *cis* ที่จัดแสดงในภาคผนวกที่ ค-1 จากข้อมูล  $^{13}\text{C-NMR}$  พบ 12 สัญญาณ แสดงเป็น 14 คาร์บอน เมื่อนำมาวิเคราะห์ประเภทคาร์บอน ด้วยเทคนิค Dept 135, Dept 90 โดยให้สัญญาณตรงกันที่  $\delta_{\text{C}}$  127.03 (C-6), 124.66 (C-8), 123.26 (C-7), 107.15 (C-5), 103.97 (C-2', C-6'), 102.64 (C-3), 101.35 (C-4') ซึ่งจัดเป็น methine carbon ทั้งหมด 8 คาร์บอน เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล  $^{13}\text{C-NMR}$  พบบางสัญญาณไม่ปรากฏใน Dept 135, Dept 90 เป็นการพิสูจน์ว่าคาร์บอนที่เหลือเป็น quaternary carbon ที่  $\delta_{\text{C}}$  115.31 (C-1), 139.93 (C-1'), 157.96 (C-4), 155.87 (C-2), 158.33 (C-5', C-3') ทั้งหมด 6 คาร์บอน โดยแสดงในภาคผนวกที่ ค-2

การยืนยันโครงสร้างของสารประกอบ A ที่ใช้เทคนิค 2D NMR (COSY, HMQC และ HMBC แสดงในตารางที่ 4.4 ข้อมูล COSY ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนที่ห่างกัน 3 พันธะ พบว่า H-5 สัมพันธ์กับ H-3, H-6 ในตำแหน่งที่ H-7 สัมพันธ์กับ H-8 ส่วนในตำแหน่งที่ H-2', H-4', H-6' มีความสัมพันธ์ระหว่างกันแสดงในภาพที่ 4.13 และภาคผนวกที่ ค-3 ข้อมูล HMQC ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่อยู่ติดกัน แสดงให้เห็นว่า H-4' มีความสัมพันธ์กับ C-4' เป็นการยืนยันว่า C อยู่ในตำแหน่งที่ 4' แล้วยังยืนยันว่า C ในตำแหน่งที่ C-5, C-3, C-7, C-8, C-6,

C-2', C-6' ตามลำดับ แสดงในภาคผนวกที่ ค-4 ข้อมูล HMBC ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่อยู่ห่างกันมากกว่า 1 พันธะ โดยพบความสัมพันธ์ของหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่ง H-3' กับ C-2', C-3', C-4'; H-5' กับ C-4', C-5', C-6'; H-2 กับ C-1, C-2, C-3; H-4 กับ C-3, C-4, C-5 และยังพบความสัมพันธ์ของโปรตอนในตำแหน่งที่ H-7 กับ C-1, C-2, C-7, C-8; H-8 กับ C-1', C-7, C-8 ตามลำดับแสดงดังภาพที่ 4.14 และ ค.5 จากข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารประกอบ A เมื่อทำการสืบค้นข้อมูล พบว่า สารประกอบ A จัดเป็น *trans*-oxyresveratrol ที่เปรียบเทียบกับข้อมูล  $^1\text{H}$ -NMR และ  $^{13}\text{C}$ -NMR ที่ได้เคยรายงานไว้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ที่ทำการบันทึกใน  $\text{DMSO}-d_6$  เดียวกัน โดยให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน

จากข้อมูลข้างต้นตลอดจนข้อมูล UV และ IR ของสารประกอบ A ใกล้เคียงกับ *trans*-oxyresveratrol (Likhitwitayawuid, et al., 2001) จึงสรุปได้ว่า สารประกอบ A มีโครงสร้างเป็น *trans*-oxyresveratrol หรือ *trans*-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene

ตารางที่ 4.3 ข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ oxyresveratrol และสารประกอบ A

ตำแหน่ง	oxyresveratrol		สารประกอบ A	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	115.4		115.3	
2	156.1		155.8	9.15 (brs, OH)
3	102.7	6.33 (d, $J=2.4$ Hz)	102.6	6.32 (d, $J=2.31$ Hz)
4	158.2		157.9	9.58 (brs, OH)
5	107.4	6.25 (dd, $J=8.4, 2.4$ Hz)	107.2	6.24 (dd, $J=8.4, 2.31$ Hz)
6	127.3	7.34 (d, $J= 8.4$ Hz)	127.0	7.33 (d, $J=8.4$ Hz)
7	123.3	7.15 (d, $J= 16.5$ Hz)	123.2	7.15 (d, $J=16.5$ Hz)
8	124.7	6.77 (d, $J= 16.5$ Hz)	124.6	6.77 (d, $J=16.5$ Hz)
1'	140.1		139.9	
2'	104.2	6.32 (d, $J=1.8$ Hz)	103.9	6.32 (d, $J= 2.0$ Hz)
3'	158.5		158.3	9.15 (brs, OH)
4'	101.5	6.08 (br,s)	101.3	6.06 (dt, $J=2.0$ Hz)
5'	158.5	6.35 (d, $J=1.8$ Hz)	158.3	9.38 (brs, OH)
6'	104.2		104.0	6.32 (d, $J= 2.0$ Hz)

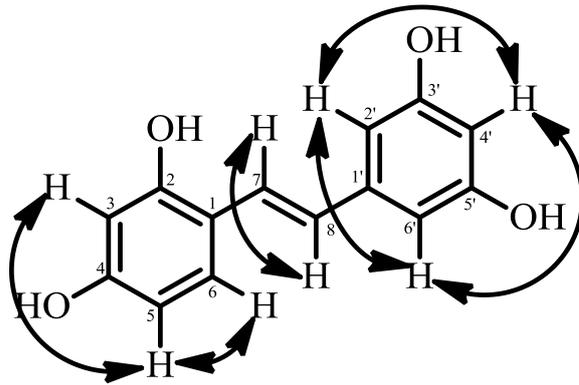
ตารางที่ 4.4 ข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ A

ตำแหน่ง	$\delta$ $^1\text{H}$ -NMR	COSY <sup>a</sup>	HMQC <sup>b</sup>	HMBC <sup>c</sup>
1				
2	9.15 (brs,OH)			C-1, C-2, C-3
3	6.32 (d, $J=2.31$ Hz)	H-5	C-3	
4	9.58 (brs,OH)			C-3, C-4, C-5
5	6.24 (dd, $J=8.4,2.31$ Hz)	H-3, H-6	C-5	
6	7.33 (d, $J=8.4$ Hz)	H-5	C-6	
7	7.15 (d, $J=16.5$ Hz)	H-7	C-7	C-1, C-2, C-7, C-8
8	6.77 (d, $J=16.5$ Hz)	H-8	C-8	C-1', C-7, C-8
1'				
2'	6.32 (d, $J= 2.0$ Hz)	H-4', H-6'	C-2'	
3'	9.15 (brs,OH)			
4'	6.06 (drt, $J=2.0$ Hz)	H-2', H-6'	C-4'	C-2', C-3', C-4'
5'	9.38 (brs,OH)			
6'	6.32 (d, $J= 2.0$ Hz)	H-2', H-4'	C-6'	C-4', C-5', C-6'

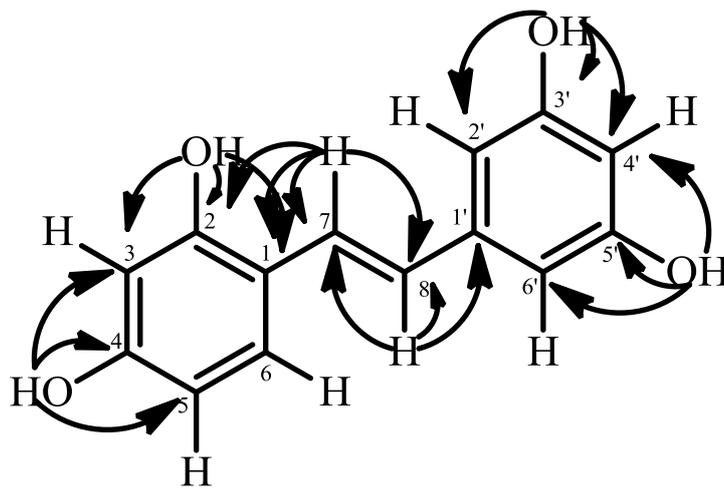
<sup>a</sup>proton-proton correlation

<sup>b</sup>1-bond heteronuclear  $^1\text{H}$  - $^{13}\text{C}$  correlation

<sup>c</sup>long range heteronuclear  $^1\text{H}$  - $^{13}\text{C}$  correlation

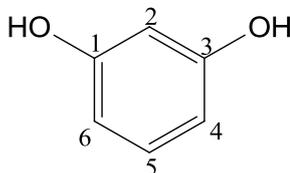


ภาพที่ 4.13 แสดงความสัมพันธ์ COSY ของสารประกอบ A



ภาพที่ 4.14 แสดงความสัมพันธ์ HMBC ของสารประกอบ A

## สารประกอบ B



สารประกอบ B เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี จากข้อมูล UV จะแสดงค่าการดูดกลืนสูงสุด ( $\lambda_{\max}$ ) ที่ 283 และ 206 นาโนเมตร ข้อมูล IR ให้แถบการสั่นแบบยืดของหมู่ hydroxyl ที่ 3207 หมู่ C=C aromatic ที่ 1589 หมู่ Olefinic ที่ 1608 และหมู่ C-H ของ aromatic  $\text{cm}^{-1}$

ข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  พบสัญญาณ  $\delta$  (ppm) ที่ 6-7 เป็นสัญญาณโปรตอนของหมู่ aromatic ที่  $\delta$  (ppm) 6.21 (1H, dd,  $J=2$  Hz, H-2), 6.27 (2H, d,  $J=2$  Hz, H-4, H-6), 6.86 (1H, t,  $J=2$  Hz, H-5) สัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 8-9 เป็นสัญญาณโปรตอนของหมู่ hydroxy พบสัญญาณ brs ที่  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 8.54 จำนวน 2 โปรตอน จากค่า  $J$  ที่แสดงถึงโปรตอนที่ใกล้เคียงกัน หากโปรตอนอยู่ใกล้กัน ค่า  $J$  จะเท่ากัน พบว่าที่  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) 6.21, 6.27 มีค่า  $J$  เท่ากับเกิดการคู่ควบแบบ W coupling ที่แสดงค่า  $J$  น้อย จากข้อมูล  $^{13}\text{C NMR}$  พบ 4 สัญญาณ แสดงเป็น 6 คาร์บอน เมื่อนำมาวิเคราะห์ประเภทคาร์บอน ด้วยเทคนิค Dept 135, Dept 90 โดยให้สัญญาณตรงกันที่  $\delta_{\text{C}}$  129.20 (C-5), 106.26 (C-4, C-6), 102.49 (C-2) ซึ่งจัดเป็น methine carbon ทั้งหมด 4 คาร์บอน เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล  $^{13}\text{C NMR}$  พบบางสัญญาณไม่ปรากฏใน Dept 135, Dept 90 เป็นการพิสูจน์ว่าคาร์บอนที่เหลือเป็น quaternary carbon ที่  $\delta_{\text{C}}$  157.83 (C-1, C-3) จำนวน 1 คาร์บอน

การยืนยันโครงสร้างของสารประกอบ B ที่ใช้เทคนิค 2D NMR (COSY, HMQC และ HMBC แสดงในตารางที่ 4.6) ข้อมูล COSY ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนที่ห่างกัน 3 พันธะ พบว่า H-5 สัมพันธ์กับ H-4 ข้อมูล HMQC ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่อยู่ติดกัน แสดงให้เห็นว่า H-5 มีความสัมพันธ์กับ C-5 เป็นการยืนยันว่า C อยู่ในตำแหน่งที่ 5 แล้วยังยืนยันว่า C ในตำแหน่งที่ C-2, C-4, C-6 ตามลำดับ ข้อมูล HMBC ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนที่อยู่ห่างกันมากกว่า 1 พันธะ โดยพบความสัมพันธ์ของหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่ง H-1 กับ C-1, C-2 และ C-6 ตามลำดับ จากข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C NMR}$  ของสารประกอบ B เมื่อทำการสืบค้นข้อมูล พบว่า สารประกอบ B จัดเป็น resorcinol ที่เปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  ที่ (Rej, et al., 2005) ได้เคยรายงานไว้ดังแสดงตารางที่ 4.5 โดยให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน

จากข้อมูลข้างต้นตลอดจนข้อมูล UV และ IR สารประกอบ B ใกล้เคียงกับของ resorcinol (Rej, et al., 2005) จึงสรุปได้ว่า สารประกอบ B มีโครงสร้างเป็น resorcinol หรือ 1,3-Benzenediol ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ resorcinol และสารประกอบ B

ตำแหน่ง	resorcinol		สารประกอบ B	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	157.73	9.15	129.20	8.54 (1H, brs )
2	131.65	6.92	106.26	6.21 (1H, dd, $J=2$ Hz)
3	157.73	9.15	129.20	8.54 (1H, brs )
4	108.52	6.22	102.49	6.27 (1H, d, $J=2$ Hz)
5	103.55	6.21	157.83	6.86 (1H, t, $J=2$ Hz)
6	108.52	6.22	102.49	6.27 (1H, d, $J=2$ Hz)

ตารางที่ 4.6 ข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ B

ตำแหน่ง	$\delta^1\text{H}$ NMR	COSY <sup>a</sup>	HMQC <sup>b</sup>	HMBC <sup>c</sup>
1	8.54 (1H, brs )			C-1, C-2, C-6
2	6.21 (1H, dd, $J=2$ Hz)		C-2	
3	8.54 (1H, brs )		C-3	
4	6.27 (1H, d, $J=2$ Hz)	H-5	C-4	
5	6.86 (1H, t, $J=2$ Hz)	H-4	C-5	
6	6.27 (1H, d, $J=2$ Hz)		C-6	

<sup>a</sup>proton-proton correlation

<sup>b</sup>1-bond heteronuclear  $^1\text{H}$  - $^{13}\text{C}$  correlation

<sup>c</sup>long range heteronuclear  $^1\text{H}$  - $^{13}\text{C}$  correlation

#### 4.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยใช้สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตตและเมทานอล ที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาทำการคำนวณ % Radical scavenging activity จากสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = \frac{\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100$$

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ 50% (IC<sub>50</sub>) ของสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาด เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกันจะแสดงผลดังตารางที่ 4.7

**ตารางที่ 4.7** ตารางเปรียบเทียบค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ 50% (IC<sub>50</sub>) ของสารสกัดหยาบเทียบกับสารลายมาตรฐานวิตามินซี

สาร	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g extract)
สารละลายมาตรฐานวิตามินซี	2.39	-
สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต	53.71	210.16 ± 2.30
สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล	61.70	153.85 ± 1.51
สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล	60.71	175.96 ± 1.18

จากตารางเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซีและสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาดชั้นต่าง ๆ พบว่า วิตามินซีจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาดประมาณ 25 เท่า เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละชั้นมีฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตจะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ ซึ่งผลของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด จะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดชั้นเมทานอล (Singhatong et al., 2010)

เมื่อนำสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตตมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดเร็ว โดยบรรจุด้วยซิลิกาเจลและชะด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 8 กลุ่มสาร (F1-F8) เมื่อนำกลุ่มสารทั้ง 8 กลุ่มทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH และ ABTS ดังแสดงผลในตารางที่ 4.8

**ตารางที่ 4.8** แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกลุ่มสารที่แยกสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตตด้วยวิธี DPPH และ ABTS

กลุ่มสาร	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ABTS IC <sub>50</sub> (µg/mL)
F1	> 1000	> 1000
F2	> 1000	884.80 ± 18.05
F3	46.87 ± 0.35	26.31 ± 0.28
F4	41.28 ± 0.19	23.86 ± 0.27
F5	81.38 ± 1.45	31.46 ± 0.80
F6	89.53 ± 0.19	37.05 ± 0.45
F7	77.34 ± 1.25	41.17 ± 0.63
F8	142.48 ± 0.58	129.67 ± 2.79

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตตพบว่า กลุ่มสาร F3 และ F4 จะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน และดีที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มสารอื่น ๆ โดยจะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มีค่าเท่ากับ  $46.87 \pm 0.35$  และ  $41.28 \pm 0.19$  µg/mL ตามลำดับและวิธี ABTS จะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีค่าเท่ากับ  $26.31 \pm 0.28$  และ  $23.86 \pm 0.27$  µg/mL ตามลำดับ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะพบว่า กลุ่มสาร F4 จะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดจึงนำมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำการพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ สาร resorcinol และ oxyresveratrol เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดังแสดงผลในตารางที่ 4.9

**ตารางที่ 4.9** แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS

สาร	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ABTS IC <sub>50</sub> (µg/mL)
กลุ่ม F4	41.28 ± 0.19	23.86 ± 0.27
สารประกอบ B (resorcinol)	11.16 ± 0.15	10.93 ± 0.23
สารประกอบ A (oxyresveratrol)	20.18 ± 0.10	22.13 ± 0.34
trolox	5.83 ± 0.26	10.10 ± 0.29

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกลุ่มสาร F4 และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้คือ resorcinol และ oxyresveratrol จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay พบว่า สาร resorcinol จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสาร

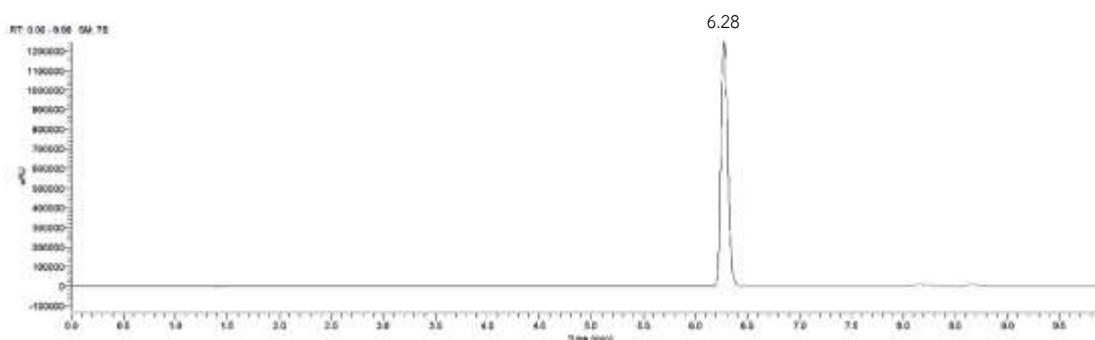
oxyresveratrol เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH จะแสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $11.16 \pm 0.15$  และ  $20.18 \pm 0.10$   $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี ABTS จะแสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $10.93 \pm 0.23$  และ  $22.13 \pm 0.34$   $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่า สาร resorcinol จะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาร oxyresveratrol ประมาณ 2 เท่า ทั้งการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS นอกจากนี้สาร resorcinol จะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ากลุ่มสาร F4 ประมาณ 4 เท่า ส่วนสาร oxyresveratrol จะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ากลุ่มสาร F4 ประมาณ 2 เท่า โดยผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มเดียวกันทั้ง 2 วิธีการทดสอบ เมื่อเปรียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน trolox จะพบว่าเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH สาร resorcinol และ oxyresveratrol จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า ประมาณ 2 และ 4 เท่าตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS พบว่าประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสาร resorcinol กับ trolox จะมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $10.93 \pm 0.23$  และ  $10.10 \pm 0.29$   $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ส่วนสาร oxyresveratrol จะมีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน trolox แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $22.13 \pm 0.34$   $\mu\text{g/mL}$

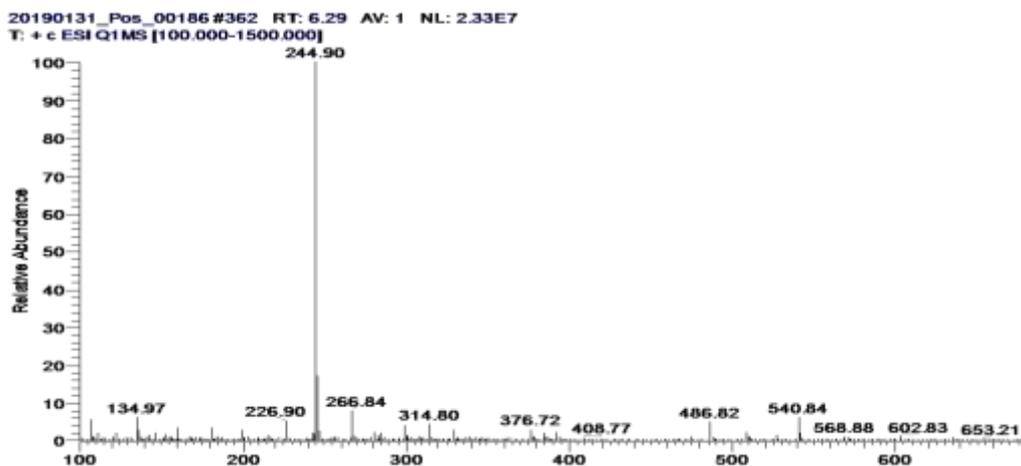
#### 4.6 การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัดจากแก่นมะหาด

##### 4.6.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร oxyresveratrol ที่แยกได้จากแก่นมะหาด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณของสาร oxyresveratrol ที่แยกได้จากแก่นมะหาด ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เทียบกับสารมาตรฐาน พบว่า สาร oxyresveratrol สามารถแยกออกมาได้ที่เวลา 6.28 นาที และเป็นสารองค์ประกอบหลัก แต่ยังมีสารอื่นปนเปื้อนอยู่เล็กน้อย ดังแสดงโครมาโทแกรมในภาพที่ 4.15 เมื่อนำไปวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารที่แยกได้ ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทสโกปี (MS) ดังแสดงโครมาโทแกรมในภาพที่ 4.16 จะพบพีคสูงสุดโดยมีค่ามวลต่อประจุ ( $m/z$ ) เท่ากับ 244.90  $[M-H]^+$  ซึ่งตรงกับมวลโมเลกุลของสาร oxyresveratrol จากข้อมูลของ NMR และ MS ยืนยันว่าสารที่แยกได้เป็นสาร oxyresveratrol



ภาพที่ 4.15 แสดงโครมาโทแกรมของสาร oxyresveratrol ที่แยกได้จากแก่นมะหาด

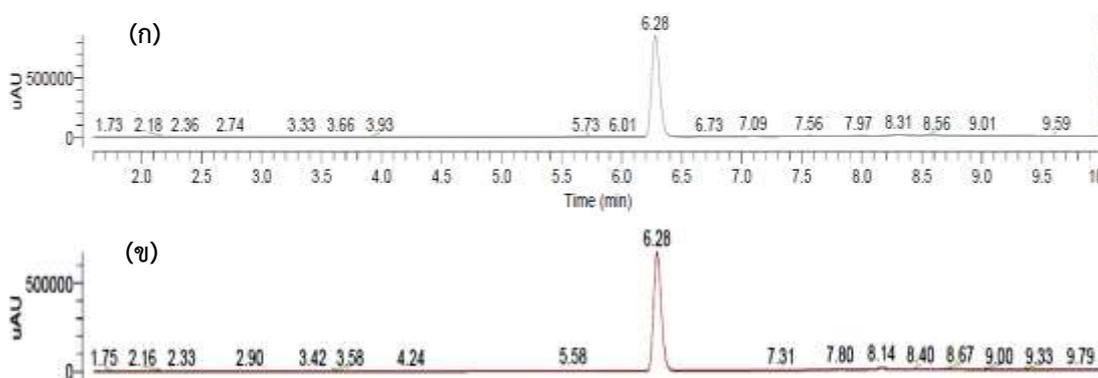


ภาพที่ 4.16 แสดงมวลโมเลกุลของสาร oxyresveratrol ที่แยกได้จากแก่นมะหาด

#### 4.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร oxyresveratrol

##### 4.6.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

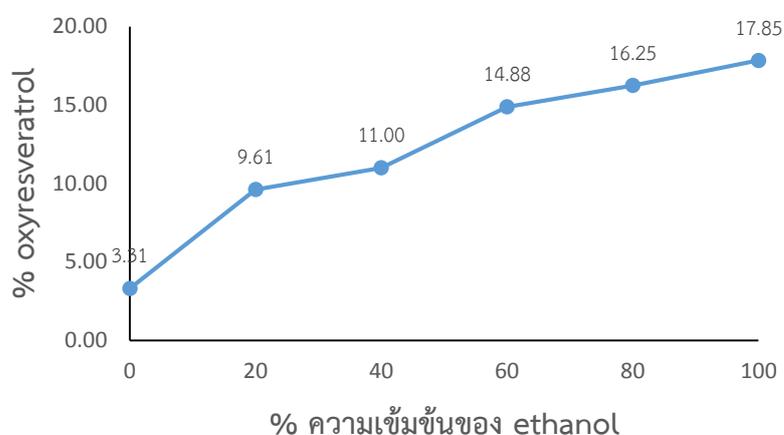
จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นมะหาดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 4.17 พบว่าสารที่แยกได้มีโครมาโทแกรมที่มีลักษณะใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน โดยจะพบสารที่แยกออกมาได้ที่เวลา 6.28 นาที และเป็นสารองค์ประกอบหลัก เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณกับสารมาตรฐานพบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีปริมาณของสาร oxyresveratrol เท่ากับ 741.09  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งคิดเป็นความบริสุทธิ์ของสาร เท่ากับ 74.11 % ดังนั้นจึงมีนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทำการตกผลึกซ้ำเพื่อให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งจะสามารถพัฒนาสารบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นสารมาตรฐานต่อไป



ภาพที่ 4.17 แสดงโครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างสารมาตรฐาน (ก) และสาร oxyresveratrol ที่แยกได้ (ข)

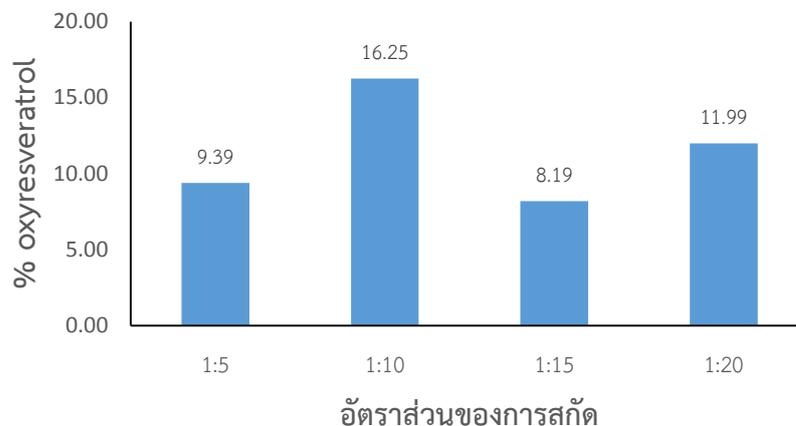
#### 4.6.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัด

1) จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 % ถึง 100 % เมื่อนำปริมาณที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสาร oxyresveratrol ในสารสกัดจะได้ดังภาพที่ 4.18 พบว่า สาร oxyresveratrol จะละลายออกมาได้มาเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยการใช้ 80 % กับ 100 % เอทานอลในการสกัด จะมีประสิทธิภาพในการสกัดสารได้ไม่แตกต่างกันมากนัก เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและการนำสารสกัดที่ได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ การสกัดด้วย 80 % จะให้สารสกัดที่มีความปลอดภัยมากกว่า



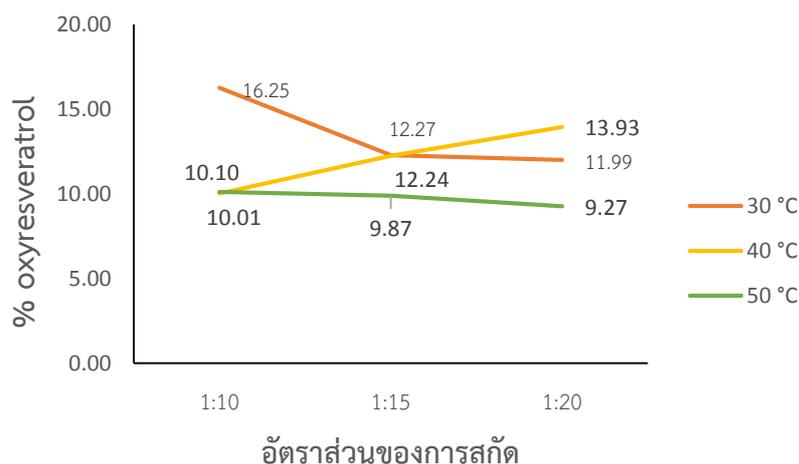
ภาพที่ 4.18 แสดงเปอร์เซ็นต์ของสาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่เอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ

2) จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่สกัดด้วย 80 % เอทานอล ที่อัตราส่วนระหว่างพืชต่อตัวทำละลายในการเป็น 1:5 1:10 1:15 และ 1:20 เมื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสาร oxyresveratrol ในสารสกัดจะได้ดังภาพที่ 4.19 พบว่า อัตราส่วนของการสกัดเป็น 1: 10 สามารถสกัดสาร oxyresveratrol ออกมาได้มากที่สุดคิดเป็น 16.25 %



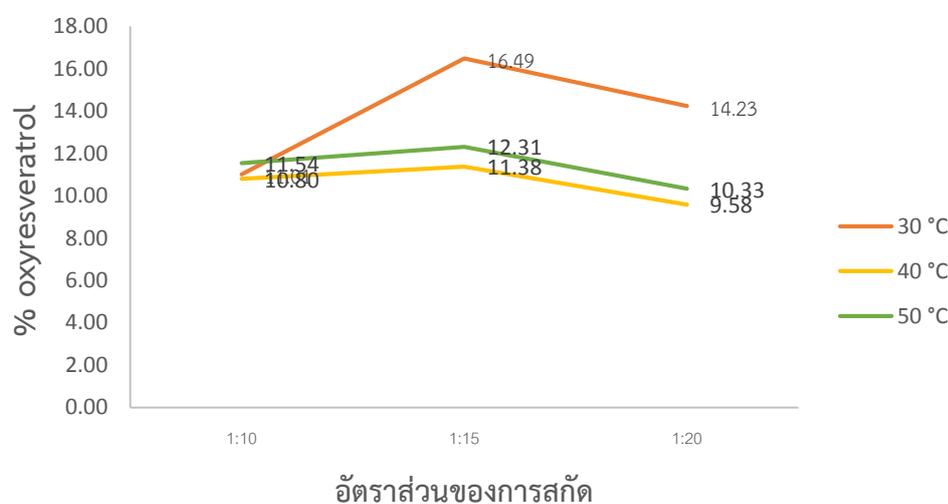
ภาพที่ 4.19 แสดงเปอร์เซ็นต์สาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่ได้โดยสกัดด้วย 80 % เอทานอลที่อัตราส่วนต่าง ๆ

3) จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่สกัดด้วย 80 % เอทานอล อัตราส่วนในการสกัดเป็น 1:10 1:15 และ 1:20 ด้วยวิธีการแช่ โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในการสกัดที่ 30 40 และ 50 °C จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสาร oxyresveratrol ในสารสกัดจะได้ดังภาพที่ 4.20 พบว่า เมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิ 30 °C สามารถสกัดสาร oxyresveratrol ออกมาได้มากที่สุด เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น พบว่า ปริมาณของสาร oxyresveratrol มีปริมาณที่น้อยลง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการเสถียรภาพของสารที่อุณหภูมิสูง เมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิเดียวกัน โดยอัตราส่วนในการสกัดที่สูงขึ้น พบว่า ปริมาณสาร oxyresveratrol ที่ไม่มีเปอร์เซ็นต์ไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นอุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสมคือที่ 30 °C



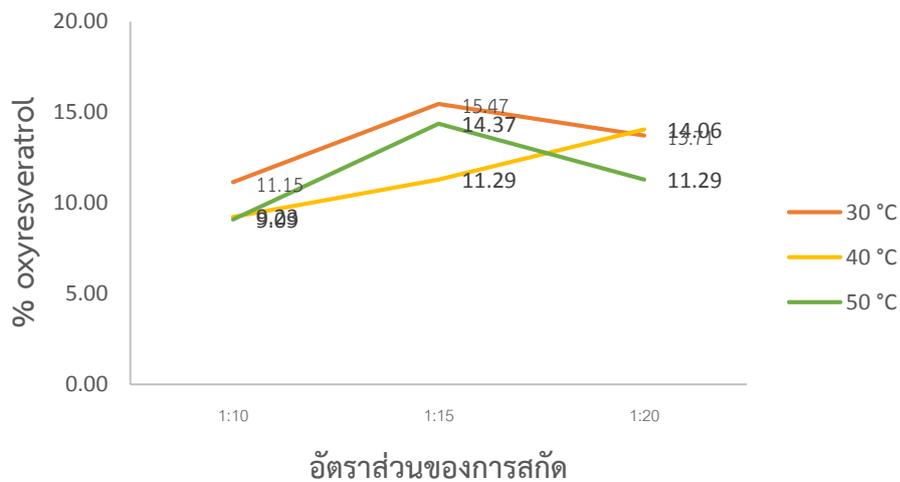
ภาพที่ 4.20 แสดงเปอร์เซ็นต์สาร oxyresveratrol ในสารสกัด ที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 °C โดยใช้อัตราส่วนในการสกัดต่าง ๆ

4) จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่สกัดด้วย 80 % เอทานอล อัตราส่วนในการสกัดเป็น 1:10 1:15 และ 1:20 ด้วยวิธีการเขย่า โดยเปรียบเทียบ อุณหภูมิในการสกัดที่ 30 40 และ 50 °C จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสาร oxyresveratrol ในสารสกัดจะได้ดังภาพที่ 4.21 พบว่า เมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิ 30 °C โดยการเขย่าสามารถสกัด สาร oxyresveratrol ออกมาได้มากที่สุด เมื่อใช้อัตราส่วนในการสกัดเป็น 1:15 ได้เปอร์เซ็นต์สาร เท่ากับ 16.49 % เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่าปริมาณของสาร oxyresveratrol มีปริมาณที่น้อยลง เมื่อ เทียบเปอร์เซ็นต์สาร oxyresveratrol ที่สกัดด้วยอัตราส่วน 1:10 ที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยวิธีการแช่ มีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 16.25 % จากการศึกษาพบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นการสกัดด้วย วิธีการเขย่าไม่มีผลต่อปริมาณสาร oxyresveratrol ที่ละลายออกมาในตัวทำละลาย



ภาพที่ 4.21 แสดงเปอร์เซ็นต์สาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 °C โดยใช้อัตราส่วนในการสกัดต่าง ๆ ด้วยวิธีการเขย่า

5) จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่สกัดด้วย 80 % เอทานอล อัตราส่วนในการสกัดเป็น 1:10 1:15 และ 1:20 ด้วยวิธีการการสั่นสะเทือนด้วยเสียงโดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในการสกัดที่ 30 40 และ 50 °C จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสาร oxyresveratrol ในสารสกัดจะได้ดังภาพที่ 4.22 พบว่า เมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิ 30 °C โดยการสั่นสะเทือนด้วยเสียงสามารถสกัดสาร oxyresveratrol ออกมาได้มากที่สุดในทุกอัตราส่วนเมื่อกับอุณหภูมิอื่น ๆ แต่ปริมาณที่สกัดจะได้น้อยกว่าวิธีการแช่ และวิธีการเขย่า



ภาพที่ 4.22 แสดงเปอร์เซ็นต์สาร oxyresveratrol ในสารสกัดที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 °C โดยใช้อัตราส่วนในการสกัดต่าง ๆ ด้วยวิธีการสันสเทือนด้วยเสียง

จากการศึกษาหาปริมาณสาร oxyresveratrol ในสารสกัด พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร oxyresveratrol จากแก่นมะหาด สภาวะที่สกัดสารออกมาได้ดีที่สุด คือ การสกัดด้วย 80 % เอทานอล ใช้อัตราส่วนในการสกัดเป็น 1:10 โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยวิธีการแช่ (maceration) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสกัดสารได้สูงที่สุดคิดเป็น 16.25 %