



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชพื้นเมืองภาคกลาง  
และภาคใต้ของประเทศไทย

**Investigation of bioactive compounds of indigenous plants from the  
central and southern of Thailand**

โดย ดร. ณัฏฐินี อนันตโชค

ตุลาคม พ.ศ. 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชพื้นเมืองภาคกลาง  
และภาคใต้ของประเทศไทย

Investigation of bioactive compounds of indigenous plants from the  
central and southern of Thailand

ผู้วิจัย

สังกัด

ณัฐฉิณี อนันตโชค

ภาควิชาเภสัชวินิฉัย คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหิดล และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายเกษตร และสำเร็จลุล่วงได้โดยความช่วยเหลือจาก ศาสตราจารย์ ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ อาจารย์ ดร.วรวรรณ กิจผาติ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มัลลิกา ชมนาวัง สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ใช้ประกอบในการทำวิจัยครั้งนี้

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโท นางสาว พรสิริ รอดเสียงล้ำ และผู้ช่วยวิจัย นางสาว รวิภัทร์ หละวรรณ ที่ช่วยดำเนินการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บุคลากรหน่วยวิจัยกลาง และ ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือที่จำเป็นต่อการวิจัย ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ณัฐฉิณี อนันตโชค

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญ	ii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญรูป	viii
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ	xv
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	xvi
บทคัดย่อภาษาไทย	xvii
Abstract	xviii
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
บทที่ 2 วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 ตัวอย่างพืช	4
2.2 วัสดุและสารเคมี	4
2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	4
2.4 วิธีดำเนินการวิจัย	4
บทที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักพื้นบ้าน	
3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบด้วย 80% เมทานอล	9
3.2 การหาระบบการแยกสารที่เหมาะสมด้วยวิธี TLC	10
3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ	17
3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH เบื้องต้นด้วย TLC	17
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ด้วยวิธี Ellman's method	19
3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH assay	20
3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร และเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารฮีสตามีน	21
3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	23

บทที่ 4 การสกัดและแยกสารออกฤทธิ์จากยอดเสม็ดชัน (Syzygium gratum)	
4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ	24
4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ	24
4.3 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี	26
4.3.1 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอทิลอะซิเตต	26
4.3.2 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอล	45
4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	84
บทที่ 5 ผลการสกัดและแยกสารออกฤทธิ์จากใบสมเส็ด (Glochidion hypoleucum)	
5.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ	97
5.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ	97
5.3 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี	99
5.3.1 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอทิลอะซิเตต	99
5.3.2 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลครั้งที่ 1	107
5.3.3 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลครั้งที่ 2	151
5.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	166
บทที่ 6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	
6.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	171
6.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetyltransferase	171
บทที่ 7 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	173
เอกสารอ้างอิง	175
ภาคผนวก	177

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พืชพื้นเมืองภาคกลางและภาคใต้ที่ทำการศึกษา	5
2	ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักพืชแห้ง และลักษณะของสารสกัดที่ได้ผลการ	9
3	ทดสอบฤทธิ์ anti-AChE ของสารสกัดด้วย 80% เมทานอลในน้ำของผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ	19
4	FRAP value ของสารสกัดด้วย 80% เมทานอลในน้ำของผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ	20
5	ค่า MIC และ MBC (mg/mL) ของสารสกัดผักพื้นบ้าน ต่อเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Sh. Flexneri</i> , <i>B. cereus</i> และ <i>S. aureus</i>	21
6	ค่า MIC และ MBC (mg/mL) ของสารสกัดผักพื้นบ้าน ต่อเชื้อแบคทีเรีย <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. paratyphi B</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>P. vulgaris</i> และ <i>S. typhi</i>	22
7	MIC และ MBC (mg/mL) ของสารสกัดผักพื้นบ้านต่อเชื้อแบคทีเรีย <i>M. morganii</i> , <i>P. arenosus</i> , <i>A. junii</i> , และ <i>Myroides sp.</i>	22
8	ผลการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide, TNF- $\alpha$ และ IL-6 ของสารสกัดผักพื้นบ้าน	23
9	ปริมาณและลักษณะสารสกัดผักเสม็ดชุน และมันปูที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	24
10	ค่าร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์ acetylcholinesterase และอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดยอดเสม็ดชุน	25
11	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EA1-EA6	26
12	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EB1-EB8	29
13	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EC1-EC6	30
14	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction ED1-ED7	32
15	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EE1-EE7	33
16	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EF1-EF10	34
17	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EG1-EG8	36
18	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EH1-EH8	37
19	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EI1-EI8	38
20	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EJ1-EJ8	39
21	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EK1-EK6	40
22	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EL1-EL5	41
23	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EM1-EM6	42
24	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EN1-EN10	44
25	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MA1-MA8	45
26	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MB1-MB10	47
27	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MC1-MC5	48
28	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MD1-MD7	49
29	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction ME1-ME5	51
30	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MF1-MF7	52

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
31	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MG1-MG6	53
32	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MH1-MH5	54
33	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MI1-MI8	55
34	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MJ1-MJ3	57
35	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MK1-MK4	58
36	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction ML1-ML5	59
37	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MM1-MM6	60
38	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MN1-MN7	62
39	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MO1-MO8	63
40	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MP1-MP9	64
41	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MQ1-MQ5	65
42	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MR1-MR6	66
43	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MS1-MS5	67
44	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MT1-MT8	68
45	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MU1-MU6	70
46	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MV1-MV6	71
47	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MW1-MW4	72
48	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MX1-MX7	73
49	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MY1-MY6	74
50	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MZ1-MZ5	75
51	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MAA1-MAA4	76
52	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MAB1-MAB5	77
53	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MAC1-MAC4	78
54	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MAD1-MAD5	79
55	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 1 และ betulinic acid	85
56	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 2 และ ursolic acid	86
57	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 3 และ Jacoumaric acid	88
58	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 4 and 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid	90
59	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 5 and stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside	92
60	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 6 และ gallic acid	93
61	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 7 และ myricitrin	94
62	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 8 และ quercitrin	95
63	ปริมาณและลักษณะสารสกัดใบสมเส็ดที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	97
64	ค่าร้อยละการยับยั้งของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบสมเส็ด	98

## สารบัญตาราง (ต่อ)

[illegible]



## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
100	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AD1-M1AD10	139
101	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AE1-M1AE5	140
102	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AF1-M1AF7	141
103	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AG1-M1AG9	143
104	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก M1AH1-M1AH6	144
105	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AI1-M1AI8	145
106	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AJ1-M1AJ3	146
107	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AK1-M1AK6	148
108	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AL1-M1AL5	149
109	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AM1-M1AM4	150
110	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AN1-M1AN3	151
111	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2A1-M2A6	152
112	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2B1-M2B7	154
113	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2C1-M2C8	155
114	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2D1-M2D7	156
115	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2E1-M2E6	157
116	ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2F1-M2F5	158
117	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 9 และ methyl gallate	166
118	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 10 และ vitexin	167
119	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 11 และ orientin	168
120	<sup>1</sup> H-NMR และ <sup>13</sup> C-NMR spectroscopic data of compound 12 และ isoorientin	170
121	ผลการทดสอบต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารบริสุทธิ์	171
122	ผลการทดสอบฤทธิ์ anti-AChE ของสารบริสุทธิ์	171

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	TLC chromatogram ของ 1 = ลูกเหรี๋ยง, 2 = มันปู, 3 = ดอกดาหลา, 4 = แฉง, 5 = ผักกูด	11
2	TLC chromatogram ของ 1 = ผักก้านจอง, 2 = กระถิน, 3 = ผักคราดหัวแหวน, 4 = ดอกขจร, 5 = กระโดนบก	12
3	TLC chromatogram ของ 1 = เสม็ดชุน, 2 = มะมุด, 3 = ผักพุม, 4 = ดอกโสน, 5 = ผักแมะ	13
4	TLC chromatogram ของ 1 = กระโดนน้ำ, 2 = ชำมะเรี๋ยง, 3 = ผักเหลียง, 4 = พลองเหมือด, 5 = เมาไขปลา	15
5	TLC chromatogram ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ	17
6	ขั้นตอนการสกัดยอดเสม็ดชุนด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล	24
7	TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดยอดเสม็ดชุน	25
8	การแยกสารของ EtOAc extract ของยอดเสม็ดชุน ด้วย quick column chromatography	26
9	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EA1-EA6	27
10	TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด EA1-EA6	27
11	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-A4 ด้วย column chromatography	28
12	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EB1-EB8	29
13	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EB4 และ EB5 ด้วย column chromatography	30
14	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EC1-EC6	31
15	TLC chromatograms ของ EB3p และ EC3c	31
16	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-C3 ด้วย column chromatography	31
17	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด ED1-ED7	32
18	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-D4 ด้วย column chromatography	33
19	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EE1-EE7	33
20	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-B6 และ B6p ด้วย column chromatography	34
21	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EF1-EF10	35
22	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-F3, F4 และ F5 ด้วย column chromatography	35
23	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EG1-EG8	36
24	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-G4 ด้วย column chromatography	37
25	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EH1-EH8	37
26	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-G7 และ G8 ด้วย column chromatography	38
27	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EI1-EI8	38
28	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-A5 ด้วย column chromatography	39
29	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EJ1-EJ8	40
30	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-J3 และ J4 ด้วย column chromatography	40

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
31	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EK1-EK6	41
32	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-K6 ด้วย column chromatography	41
33	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EL1-EL5	42
34	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-F5 ด้วย column chromatography	42
35	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EM1-EM6	43
36	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-J6 ด้วย column chromatography	43
37	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EN1-EN10	44
38	การแยกสารของ MeOH extract ของยอดเสม็ดชัน ด้วย quick column chromatography	45
39	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MA1-MA8	46
40	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-A4 ด้วย column chromatography	46
41	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MB1-MB10	47
42	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-B5 และ B6 ด้วย column chromatography	48
43	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MC1-MC5	48
44	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-C2 ด้วย column chromatography	49
45	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MD1-MD7	50
46	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-D3, D4 และ D5 ด้วย column chromatography	50
47	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด ME1-ME5	51
48	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-C3, C4 และ C5 ด้วย column chromatography	52
49	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MF1-MF7	52
50	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-B7, B8 และ B9 ด้วย column chromatography	53
51	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MG1-MG6	53
52	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-G5 ด้วย column chromatography	54
53	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MH1-MH5	54
54	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-A5 และ A6 ด้วย column chromatography	55
55	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MI1-MI8	56
56	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-I4 ด้วย column chromatography	56
57	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MJ1-MJ3	57
58	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-I5 ด้วย column chromatography	57
59	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MK1-MK4	58
60	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-I6 ด้วย column chromatography	58
61	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด ML1-ML5	59
62	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-A7 ด้วย column chromatography	59
63	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MM1-MM6	60
64	TLC chromatograms ฤทธิ์ต้าน DPPH ของส่วนของสารสกัด MM1-MM6	61
65	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-M4 ด้วย column chromatography	61

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
66	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MN1-MN7	62
67	TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด MN1-MN7	62
68	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-N3, N4 และ N5 ด้วย column chromatography	63
69	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MO1-MO8	63
70	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-M5 ด้วย column chromatography	64
71	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MP1-MP9	65
72	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P2 ด้วย column chromatography	65
73	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MQ1-MQ5	66
74	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P3 ด้วย column chromatography	66
75	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MR1-MR6	67
76	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P3c ด้วย column chromatography	67
77	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MS1-MS5	68
78	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P4 ด้วย column chromatography	68
79	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MT1-MT8	69
80	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-T6 และ T7 ด้วย column chromatography	69
81	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MU1-MU6	70
82	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P5 ด้วย column chromatography	70
83	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MV1-MV6	71
84	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P6 ด้วย column chromatography	71
85	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MV1-MV4	72
86	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-M6 ด้วย column chromatography	73
87	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MX1-MX7	73
88	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-X3 ด้วย column chromatography	74
89	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MY1-MY6	74
90	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-X4 ด้วย column chromatography	75
91	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MZ1-MZ5	75
92	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-Z3 ด้วย column chromatography	76
93	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MAA1-MAA4	76
94	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-Z4 ด้วย column chromatography	77
95	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MAB1-MAB5	77
96	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-Y3, Y4 และ Y4c ด้วย column chromatography	78
97	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MAC1-MAC4	78
98	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-AB4 ด้วย column chromatography	79
99	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MAD1-MAD5	79
100	แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของยอดเสม็ดชุน	80

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
101	แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลของยอดเสม็ดชุน	82
102	โครงสร้าง betulinic acid	84
103	โครงสร้าง ursolic acid	86
104	โครงสร้าง Jacoumaric acid	88
105	โครงสร้าง 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid	90
106	โครงสร้าง stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside	91
107	โครงสร้าง gallic acid	93
108	โครงสร้าง myricitrin	94
109	โครงสร้าง quercitrin	95
110	ขั้นตอนการสกัดใบสมเล็ดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล	97
111	TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบสมเล็ด	98
112	การแยกสารของ EtOAc extract ของใบสมเล็ดด้วย quick column chromatography	99
113	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EA1-EA6	100
114	TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสาร EA1-EA6 ของใบสมเล็ด	100
115	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-A5 ด้วย column chromatography	101
116	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัดที่ EB1-EB7	102
117	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-B7 ด้วย column chromatography	102
118	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EC1-EC8	103
119	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-C5 และ C6 ด้วย column chromatography	104
120	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด ED1-ED6	104
121	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-D4, D5 และ D6 ด้วย column chromatography	105
122	TLC chromatograms และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด EE1-EE7	106
123	การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-E4, E5 และ E6 ด้วย column chromatography	106
124	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EF1-EF5	107
125	การแยกสาร MeOH extract ของใบสมเล็ด ด้วย quick column chromatography	107
126	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1A1-M1A7	108
127	TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M1A1-M1A7 ของใบสมเล็ด	109
128	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-A3 และ A4 ด้วย column chromatography	110
129	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1B1-M1B9	110
130	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-B4 ด้วย column chromatography	111
131	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1C1-M1C8	111
132	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-B5 ด้วย column chromatography	112

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
133	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัดที่ M1D1- M1D5	112
134	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-B6 และ B7 ด้วย column chromatography	113
135	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1E1-M1E6	113
136	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-E5 ด้วย column chromatography	114
137	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1F1-M1F9	115
138	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-B8 และ B9 ด้วย column chromatography	115
139	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1G1-M1G6	116
140	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-A5 ด้วย column chromatography	116
141	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1H1- M1H9	117
142	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-H7 ด้วย column chromatography	117
143	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1I-M1I7	118
144	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-H8 ด้วย column chromatography	118
145	TLC chromatograms และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M1J1-M1J8	119
146	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-J5, J6 และ J7 ด้วย column chromatography	120
147	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1K1- M1K5	120
148	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-H9 ด้วย column chromatography	121
149	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1L1- M1L6	121
150	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L4 ด้วย column chromatography	122
151	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1M1-M1M5	122
152	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-M2, M3 และ M4 ด้วย column chromatography	123
153	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1N1-M1N4	123
154	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L5 ด้วย column chromatography	124
155	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1O1-M1O6	124
156	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-O2 และ O3 ด้วย column chromatography	125
157	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1P1-M1P5	125
158	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-O4 และ O5 ด้วย column chromatography	126
159	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1Q1-M1Q5	126
160	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-AE4 ด้วย column chromatography	127
161	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1R1-M1R5	127
162	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L5c ด้วย column chromatography	128
163	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัดที่ M1S1-M1S5	128
164	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L6 ด้วย column chromatography	129
165	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1T1-M1T6	129
166	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-T4 ด้วย column chromatography	130
167	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1U1-M1U7	130

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
168	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-T5 ด้วย column chromatography	131
169	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1V1-M1V5การแยกสารของส่วนของสารสกัด	131
170	MeOH-AA3+AA4 ด้วย column chromatography	132
171	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1W1-M1W2	132
172	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-W1 ด้วย column chromatography	133
173	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1X1-M1X4	133
174	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-X2 ด้วย column chromatography	134
175	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1Y1-M1Y2	134
176	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-A6 ด้วย column chromatography	134
177	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1Z1-M1Z6	135
178	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-A6 ด้วย column chromatography	135
179	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AA1-M1AA9	136
180	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AA6 ด้วย column chromatography	137
181	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AB1-M1AB6	137
182	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AA7 และ AA8 ด้วย column chromatography	138
183	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AC1-M1AC8	138
184	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC6 ด้วย column chromatography	139
185	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AD1- M1AD10	140
186	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AD3 ด้วย column chromatography	140
187	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AE1-M1AE5	141
188	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC7 ด้วย column chromatography	141
189	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AF1-M1AF7	142
190	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AF6 ด้วย column chromatography	142
191	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AG1-M1AG9	143
192	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC8 และ AA9 ด้วย column chromatography	143
193	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AH1-M1AH6	144
194	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-A7 ด้วย column chromatography	145
195	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AI1-M1AI8	145
196	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AI3 และ AI4 ด้วย column chromatography	146
197	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AJ1-M1AJ3	147
198	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L5 ด้วย column chromatography	147
199	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AK1-M1AK6	148
200	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AK3 และ AK4 ด้วย column chromatography	149
201	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AL1-M1AL5	149

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
202	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AK5 ด้วย column chromatography	150
203	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AM1-M1AM4	150
204	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AI6 ด้วย column chromatography	150
205	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AN1-M1AN3	151
206	การแยกสาร MeOH2 extract ด้วย column chromatography	151
207	TLC chromatograms และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M2A1-M2A6	152
208	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-A4 ด้วย column chromatography	153
209	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M2B1-M2B7	154
210	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-B3 และ B4 ด้วย column chromatography	154
211	TLC chromatograms และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M2C1-M2C8	155
212	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-B5 ด้วย column chromatography	156
213	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M2D1-M2D7	156
214	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-D4 ด้วย column chromatography	157
215	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M2E1-M2E6	157
216	การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-D4 ด้วย column chromatography	158
217	TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M2F1-M2F5	158
218	แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของใบสมเล็ด	159
219	แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลครั้งที่ 1 ของใบสมเล็ด	160
220	แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลครั้งที่ 2 ของใบสมเล็ด	165
221	โครงสร้าง methyl gallate	166
222	โครงสร้าง vitexin	167
223	โครงสร้าง orientin	168
224	โครงสร้าง isoorientin	169



## คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

$\alpha$	=	Alpha
$\beta$	=	Beta
br	=	Broad (for NMR spectra)
$^{\circ}\text{C}$	=	Degree Celsius
$\text{CDCl}_3$	=	Deuterated chloroform
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	=	Dichloromethane
$^{13}\text{C}$ NMR	=	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
$\text{DMSO-d}_6$	=	Deuterated dimethyl sulfoxide
$\delta$	=	Chemical shift
EtOAc	=	Ethyl acetate
g	=	Gram
hr	=	Hour
$^1\text{H}$ NMR	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
Hz	=	Hertz
$\text{IC}_{50}$	=	Median Inhibitory Concentration
IR	=	Infrared
$J$	=	Coupling constant
$\lambda$	=	Wavelength
L	=	Liter
MeOH	=	Methanol
$\mu\text{g}$	=	Microgram
MeOH	=	Methanol
mg	=	Milligram
MHz	=	Megahertz
MIC	=	Minimum inhibition concentration
min	=	Minute
mL	=	Milliliter
MW	=	Molecular weight
$m/z$	=	Mass to charge ratio
MS	=	Mass Spectrometry
nm	=	nanometer
ppm	=	Part-per-million
TLC	=	Thin Layer Chromatography
UV	=	Ultraviolet

โครงการ “การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชพื้นเมือง  
ภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย”

Investigations of Bioactive Compounds of Indigenous Plants from  
the Central and Southern of Thailand

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ชุมชนในแต่ละท้องถิ่นมีการนำพืชพื้นเมืองมาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันในรูปแบบต่างๆ กัน โดยอาศัยภูมิปัญญาพื้นบ้านที่สืบทอดกันมาจากรุ่นสู่รุ่น โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์ในด้านอาหาร และสมุนไพรรักษาโรค ปัจจุบันนี้มีความตื่นตัวเรื่องสุขภาพมากขึ้น จึงมีการนำพืชพื้นเมืองมาบริโภคมากขึ้นในทุกภาคของประเทศทั้งในชุมชนชนบทและชุมชนเมือง เนื่องจากพืชพื้นเมืองส่วนใหญ่จะปลูกแบบธรรมชาติ ไม่มีการใช้สารเคมีสังเคราะห์หรือยาฆ่าแมลง จึงไม่มีอันตรายจากสารพิษตกค้าง

พืชพื้นเมืองในประเทศไทยที่นำมาบริโภคเป็นอาหารหรือใช้เป็นยาสมุนไพรส่วนใหญ่ยังขาดข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ หลายชนิดไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์เนื่องจากไม่มีการศึกษาวิจัยถึงประโยชน์และวิธีการนำไปใช้ของพืชดังกล่าว จึงน่าที่จะมีการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์ของพืชพื้นเมืองในประเทศไทย เพื่อนำไปใช้ส่งเสริมสุขภาพและป้องกันโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ ตลอดจนศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และหาสารออกฤทธิ์เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุน และส่งเสริมการนำพืชดังกล่าวใช้เป็นอาหาร สมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่างๆ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืช พัฒนาให้เป็นพืชเศรษฐกิจ เพิ่มรายได้ให้กับชุมชนมากขึ้น

การศึกษาหาสารที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นองค์ประกอบในพืชพื้นเมืองที่ใช้เป็นสมุนไพรนั้นมีความสำคัญและจำเป็นในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพร การพัฒนาการปลูก ศึกษาเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีสารสำคัญในการออกฤทธิ์มากที่สุด นอกจากนี้ยังทำให้รู้ถึงวิธีการเตรียมหรือการสกัดสารสกัดหยาบที่เหมาะสม เพื่อนำไปพัฒนาเป็นตำรับยาสมุนไพรที่มีคุณภาพ และมีประสิทธิภาพดี ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค และบุคลากรทางการแพทย์ เพื่อลดการใช้ยาแผนปัจจุบัน

## บทคัดย่อ

การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านเชื้อแบคทีเรียของพืชพื้นเมืองภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วย 80% เมทานอล ของผักพื้นบ้านทั้ง 21 ชนิด ได้แก่ ลูกเหรี้ง มัณฑุ สมเล็ด ดอกดาหลา แจง ผักกูด ผักก้านจอบ กระถิน ผักคราดหัวแหวน ดอกขจร กระโดนบก เสม็ดชุน มะมุด ผักพุ่ม ดอกโสน ผักมะเฒ่า ไม้ไขปลา กระโดนน้ำ ผักเหลียง ผลขามะเรียง และพลองเหมือด พบว่าผักพื้นบ้านที่มีศักยภาพที่จะนำมาศึกษาต่อคือ เสม็ดชุน และสมเล็ด เนื่องจากสารสกัดด้วย 80% เมทานอล ของผักทั้ง 2 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านออกซิเดชันได้ดี และยังมีรายงานการศึกษาสารสำคัญมาก่อน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอลของยอดเสม็ดชุน และสมเล็ด พบว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และเมทานอลของยอดเสม็ดชุน และสมเล็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี นอกจากนี้สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้งสองชนิดยังมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ดังนั้นจึงนำสารสกัดชั้น เอทิลอะซิเตต และเมทานอลของพืชทั้งสองชนิดมาแยกหาสารออกฤทธิ์ต่อด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี

การสกัดแยกสารจากยอดเสม็ดชุนได้สารบริสุทธิ์ 8 ชนิด โดยสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต สามารถแยกได้สารในกลุ่ม terpenoid 5 ชนิด คือ betulinic acid (1), ursolic acid (2), jacoumaric acid (3), 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid (4) และ stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (5) และสารสกัดชั้นเมทานอลสามารถแยกได้สารในกลุ่ม polyphenol อีก 3 ชนิด คือ gallic acid (6), myricetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (myricitrin) (7) และ quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) (8)

การสกัดแยกสารจากใบสมเล็ดได้สารบริสุทธิ์ 6 ชนิด โดยสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต สามารถแยกได้สารในกลุ่ม terpenoid 1 ชนิด คือ stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (5) และสารสกัดชั้นเมทานอลสามารถแยกได้สารในกลุ่ม polyphenol อีก 3 ชนิด คือ methyl gallate (9), gallic acid (6), apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) (10), luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) (11) และ luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin) (12)

สารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้จากยอดเสม็ดชุนและสมเล็ดนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase พบว่าสารในกลุ่ม polyphenol ได้แก่ gallic acid (6), methyl gallate (9), myricetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (myricitrin) (7), quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) (8), apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) (10), luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) (11) และ luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin) (12) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นอกจากนี้สาร gallic acid (6) ยังมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase

## Abstract

The studies of antioxidant, anti-acetylcholinesterase and anti-bacterial activities of the indigenous plants from the Central and Southern of Thailand were investigated in 80% methanol extracts of 21 plants, including, *Parkia timoriana*, *Glochidion wallichianum*, *Glochidion hypoleucum*, *Niolaia elatior* (*Etlingera elatior*), *Maerua siamensis*, *Diplazium esculentum*, *Limnocharis flava*, *Leucaena glauca* (*Leucaena leucocephala*), *Spilanthes acmella*, *Telosma minor*, *Careya sphaerica*, *Syzygium gratum*, *Mangifera foetida*, *Champereia manillana*, *Sesbania aculeate*, *Momordica subangulata*, *Antidesma ghaesembilla*, *Barringtonia acutangula*, *Gnetum gnemon*, *Lepisanthes fruticosa* and *Memecylon edule*. The results of the biological studies of the plant extracts showed that two plants, *Syzygium gratum* and *Glochidion hypoleucum* are potential for further investigation because they exhibited anti-acetylcholinesterase anti-oxidant activities, as well as there are no report on the chemical constituents of the two plants.

The shoots of *Syzygium gratum* and the leaves of *Glochidion hypoleucum* were extracted by maceration led to hexane, ethyl acetate and methanol extracts. The ethyl acetate and methanol extracts of the both plants were chosen for further purification because they exhibited potent anti-DPPH and anti-acetylcholinesterase activities.

Bioassay guided fractionation of the extracts of the shoots of *Syzygium gratum* to give eight pure compounds. Five terpenoids, betulinic acid (**1**), ursolic acid (**2**), jacoumaric acid (**3**), 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid (**4**) and stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (**5**) were isolated from the ethyl acetate extract. Moreover, three polyphenols gallic acid (**6**), myricetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (myricitrin) (**7**) and quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) (**8**) were found in the methanol extract of this plants.

The chemical investigation of the extracts of the leaves of *Glochidion hypoleucum* resulted in the isolation of one triterpene glycoside, stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside from ethyl acetate extract, together with five polyphenols, methyl gallate (**9**), gallic acid (**6**), apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) (**10**), luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) (**11**) and luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin) (**12**) from the methanol extract.

The isolated polyphenols, gallic acid (**6**), methyl gallate (**9**), myricetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (myricitrin) (**7**), quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) (**8**), apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) (**10**), luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) (**11**) and luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin) (**12**), showed anti-DPPH activity. Gallic acid (**6**) also showed potent anti-acetylcholinesterase.

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

พืชพื้นเมือง หมายความว่าพืชที่มีการกระจายพันธุ์ในแต่ละท้องถิ่น ซึ่งมีสภาพป่า สภาพแวดล้อม ภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่แตกต่างกัน พืชบางชนิดมีการเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้นจนถึงสภาพอากาศเย็นและมีปริมาณน้ำฝนที่แตกต่างกันในแต่ละฤดู การกระจายพันธุ์จะพบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย แต่มีพืชหลายชนิดที่เจริญเติบโตได้ในสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่ค่อนข้างเฉพาะ เช่น พืชพื้นเมืองภาคเหนือต้องการสภาพอากาศที่เย็น บนภูเขาสูง ปริมาณน้ำฝนจำกัดในบางฤดู หรือพืชพื้นเมืองภาคใต้ที่ชอบสภาพอากาศชื้น ต้องการปริมาณน้ำฝนค่อนข้างมาก พืชเหล่านี้จะพบการกระจายพันธุ์จำกัดในแต่ละท้องถิ่น จึงเป็นพืชพื้นเมืองที่มีความแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่นหรือแต่ละภาค

พบว่าชุมชนในแต่ละท้องถิ่นนำพืชพื้นเมืองเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันในรูปแบบต่างๆ กัน โดยอาศัยภูมิปัญญาพื้นบ้านที่สืบทอดกันมาจากรุ่นสู่รุ่น เช่น ใช้เป็นอาหาร เป็นยา ทำสีย้อม ทำเครื่องเรือน เครื่องมือของใช้ต่างๆ เป็นต้น ภูมิปัญญาเหล่านี้มีความสำคัญและมีคุณค่าต่อท้องถิ่นและประเทศชาติ ทั้งในด้านสังคม เศรษฐกิจ และการพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยเฉพาะด้านโภชนาการ สุขภาพ และการแพทย์ ปัจจุบันมีความตื่นตัวที่จะอนุรักษ์และสืบทอดภูมิปัญญาพื้นบ้านเหล่านี้ รวมถึงนำความรู้จากภูมิปัญญาพื้นบ้านไปศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาใช้ประโยชน์พืชพื้นเมืองดังกล่าวให้เกิดประโยชน์สูงสุดและยั่งยืน โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์พืชพื้นเมืองในด้านอาหารบำรุงสุขภาพ และสมุนไพรรักษาโรค

ปัจจุบันนี้มีความตื่นตัวเรื่องการใช้สารเคมีจากธรรมชาติในด้านต่างๆ ความสนใจในพืชพื้นเมืองจึงมีมากขึ้นในทุกภาคของประเทศไทยและทั่วโลก ข้อมูลงานวิจัยจากนักวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศ แสดงให้เห็นประโยชน์ของพืชที่เคยมองข้ามไป มีความสนใจใช้พืชพื้นเมืองเป็นยารักษาโรค และส่งเสริมให้บริโภคพืชพื้นเมืองเป็นอาหาร โดยเฉพาะพืชพื้นเมืองส่วนใหญ่จะปลูกแบบธรรมชาติ ไม่มีการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ไม่มีอันตรายจากสารพิษตกค้าง ที่สำคัญเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถหาได้ในท้องถิ่น ไม่ต้องซื้อหา สามารถจัดการให้ใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืนภายใต้การจัดการที่เหมาะสม เป็นการดำเนินเศรษฐกิจแบบพอเพียง

พบว่าภูมิปัญญาท้องถิ่นเกี่ยวกับการใช้พืชพื้นเมืองเป็นอาหารและยารักษาโรคในหลายท้องถิ่นภาคกลางและภาคใต้ได้ขาดหายไป ไม่มีผู้สืบทอด ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุจากเทคโนโลยีตะวันตกเข้าสู่ชุมชน และพบว่าในภาคใต้มีการบริโภคพืชพื้นเมืองเป็นอาหาร แต่ใช้เป็นยารักษาโรคน้อย ยกเว้นในภาคใต้ตอนล่าง เช่น ในชุมชนมุสลิมที่เทคโนโลยีตะวันตกเข้าไม่ถึงหรือเข้าถึงน้อยกว่า ยังคงมีการใช้ประโยชน์จากพืชพื้นเมืองในด้านยารักษาโรคอยู่พอสมควร เช่นเดียวกับภาคกลางซึ่งมีการใช้พืชพื้นเมืองเป็นอาหารบ้าง แต่ใช้เป็นยารักษาโรคเฉพาะในชุมชนที่อยู่ห่างไกล

พืชพื้นเมืองในภาคกลาง และภาคใต้ที่นำมาบริโภคเป็นอาหาร และ/หรือใช้เป็นยาสมุนไพร ส่วนใหญ่ยังขาดข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ หลายชนิดไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์เนื่องจากไม่มีการศึกษาวิจัยถึงประโยชน์และวิธีการนำไปใช้ของพืชดังกล่าว จึงน่าที่จะมีการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์ของพืชพื้นเมืองในภาคกลางและภาคใต้เพื่อนำไปใช้ส่งเสริมสุขภาพและป้องกันโรค โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ เช่น โรคอัลไซเมอร์ ใช้รักษาหรือบรรเทาอาการแพ้ที่เกิดจากการกระตุ้นโดยแบคทีเรียบางชนิด รวมถึงใช้ป้องกันและรักษาโรคในสัตว์ ตลอดจนศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและหาสารออกฤทธิ์เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุน และส่งเสริมการนำพืชดังกล่าวใช้เป็นอาหาร สมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์

เสริมสุขภาพต่างๆ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืช พัฒนาให้เป็นพืชเศรษฐกิจ เพิ่มรายได้ให้กับชุมชน และทำให้คนในชุมชนสามารถพึ่งตนเองได้

การศึกษาหาสารที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นองค์ประกอบในพืชพื้นเมืองที่ใช้เป็นสมุนไพรนั้นมีความสำคัญและจำเป็นในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพร การพัฒนาการปลูก ศึกษาเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีสารสำคัญในการออกฤทธิ์มากที่สุด นอกจากนี้ยังทำให้รู้ถึงวิธีการเตรียมหรือการสกัดสารสกัดหยาบที่เหมาะสม เพื่อนำไปพัฒนาเป็นตำรับยาสมุนไพรที่มีคุณภาพ และมีประสิทธิภาพดี ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค และบุคลากรทางการแพทย์ เพื่อลดการใช้ยาแผนปัจจุบัน

รายงานที่เกี่ยวข้องกับพืชพื้นเมืองที่ผ่านมาส่วใหญ่จะเป็นรายงานด้านโภชนาการ<sup>1</sup> เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ของพืชที่ใช้เป็นอาหารเช่น ผักพื้นบ้าน หรือผลไม้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานด้านการนำมาใช้เป็นสมุนไพรจากภูมิปัญญาท้องถิ่น ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น โดยยังขาดข้อมูลทางด้านองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นสารทุติยภูมิ ซึ่งส่วนใหญ่พืชสร้างขึ้นเพื่อใช้เพื่อความอยู่รอด เช่น สืบพันธุ์ และป้องกันศัตรูพืช ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ แมลง และ วัชพืช ทำให้สารทุติยภูมิส่วนใหญ่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

พืชผักและสมุนไพรประจำภาคกลาง<sup>2,3</sup> และภาคใต้<sup>3,5</sup> ที่น่าสนใจในการศึกษาทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ลูกเหริ่ง (*Parkia timoriana*) มันปู (*Glochidion wallichianum*) สมเล็ด (*Glochidion hypoleucum*) ดอกดาหลา (*Niolaia elatior/ Etlingera elatior*) แจง (*Maerua siamensis*) ผักกูด (*Diplazium esculentum*) ผักก้านจอบ (*Limnocharis flava*) กระถิน (*Leucaena glauca/Leucaena leucocephala*) ผักคราดหัวแหวน (*Spilanthes acmella*) ดอกขจร (*Telosma minor*) กระโดนบก (*Careya sphaerica*) เสม็ดขุ่น (*Syzygium gratum*) มะมุด (*Mangifera foetida*) ผักพุ่ม (*Champereia manillana*) ดอกโสน (*Sesbania aculeata*) ผักมะ (*Momordica subangulata*) เม่าไขปลาวา (*Antidesma ghaesembilla*) กระโดนน้ำ (*Barringtonia acutangula*) ผักเหลียง (*Gnetum gnemon*) ผลขามะเรียง (*Lepisanthes fruticosa*) และพลองเหมือด (*Memecylon edule*)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase เบื้องต้น พบว่าต้นไม้ที่มีศักยภาพที่นำมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์คือ ต้นเสม็ดขุ่น และสมเล็ด เนื่องจากสารสกัดของพืชทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้านการต้านอนุมูลอิสระ และต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้ดี และยังไม่มียารายงานด้านสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบมาก่อน จึงน่าจะมีการศึกษาแยกสารทุติยภูมิจากพืชดังกล่าว รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และเภสัชวิทยา เพื่อนำใช้ส่งเสริมสุขภาพและป้องกันโรคโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ เช่น โรคอัลไซเมอร์ต่อไป

เสม็ดขุ่น (*Syzygium gratum* (Wight) S.N. Mitra)<sup>6</sup> มีชื่ออื่นๆ ว่า ไคร้เม็ด ยี่มือแล เสม็ด เม็ก เสม็ดขาว เสม็ดแดง เม็ดขุ่น อยู่วงศ์ Myrtaceae พบกระจายพันธุ์ พบในอินเดีย พม่า มาเลเซียจนถึงฟิลิปปินส์ ในประเทศไทยพบในป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง ป่าดิบแล้ง ตามที่โล่งแจ้ง และบริเวณหลังป่าชายเลน ยอดเสม็ดขุ่นมีรสฝาดนิยมรับประทานทั่วทุกภาค โดยกินเป็นผักสด หรือลวกกินกับน้ำพริก<sup>3</sup> มีรายงานว่าสารสกัดผักเม็กสามารถลดภาวะออกซิเดชันในหนูทดลองจากฮิโมลิตคอะนีเมีย<sup>7</sup> และพบว่าการดื่มน้ำต้มผักเม็กในผู้ป่วยธาลัสซีเมียในระยะสั้นนี้มีผลเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระในพลาสมา<sup>8</sup> ยังมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และป้องกันเส้นเลือดทั้งในหลอดทดลอง และสัตว์ทดลอง<sup>9</sup> นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเป็นแผ่นฟิล์มสมุนไพรเม็กเพื่ออนามัยในช่องปาก<sup>10</sup>

สมเล็ด (*Glochidion hypoleucum* (Miq.) Boerl.) เป็นพืชพื้นเมืองทางภาคใต้ของประเทศไทย อยู่ในตระกูลเดียวกับกับต้นมันปู (*Glochidion perakense, Glochidion wallichianum*)<sup>6</sup> จัดเป็นผักพื้นบ้านภาคใต้ โดยนำยอดมารับประทานเป็นผักเหนาะกับน้ำพริก หรือขนมจีนน้ำยา เช่นเดียวกับยอดมันปู นอกจากเป็นอาหารแล้วมันปูยังมี

ประโยชน์ด้านสมุนไพร โดยรากและลำต้น ใช้แก้ร้อนใน และเป็นยาบำรุง ปัจจุบันยังไม่มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในต้นสมเส็ด แต่มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของต้นมันปูโดยเฉพาะฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) และความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing capacity)<sup>11-13</sup> และมีรายงานว่ามันปูมีสารประกอบฟีนอลิกสูง (total phenolic content) โดยคำนวณในรูป gallic acid equivalent (GAE) พบว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ของใบมันปูพันธุ์ *Glochidion perakense* และ *Glochidion wallichianum* มีค่า  $183.3 \pm 6.4$  mg GAE/g น้ำหนักพืชแห้ง<sup>11</sup> และ  $49.06 \pm 7.32$  mg GAE/g น้ำหนักพืชสด<sup>13</sup> ตามลำดับ

## 1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อหาพืชพื้นเมืองที่มีประโยชน์ในการป้องกันรักษาโรคอัลไซเมอร์ อาการแพ้เนื่องจากกระตุ้นโดยแบคทีเรีย รวมทั้งพืชที่เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์
- 1.2.2 เพื่อหาสารที่เป็นองค์ประกอบ (สารทุติยภูมิ) จากพืชพื้นเมือง ที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการรักษา และป้องกันโรคอัลไซเมอร์ อาการแพ้เนื่องจากกระตุ้นโดยแบคทีเรีย รวมทั้งพืชที่เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันและรักษาโรคในสัตว์
- 1.2.3 เพื่อเพิ่มเติมข้อมูลวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์ของพืชพื้นเมือง และนำพืชดังกล่าวไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางเศรษฐกิจต่อไป

## บทที่ 2 วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

### 2.1 ตัวอย่างพืช

- 2.1.1 ยอดเสม็ดขุน (*Syzygium gratum* (Wight) S.N. Mitra) เก็บจาก อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี (BKF No 183766) ตรวจสอบเอกลักษณ์โดย นายสุจิต เรืองเรือ ตำแหน่ง นักวิชาการป่าไม้ชำนาญการ สำนักงานหอพรรณไม้
- 2.1.2 ใบสมเส็ด เก็บจาก อำเภอควนเนียง จังหวัดสงขลา (BKF No 168401) ตรวจสอบเอกลักษณ์โดย นางสาว รัมภ์รดา มีบุญญา ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัย สำนักงานหอพรรณไม้

### 2.2 วัสดุและสารเคมี

- 2.2.1 TLC plate silica gel 60 F254 (Merck, layer thickness 0.2 mm)
- 2.2.2 Silica gel (Merck Grade 7734, pore size 60 Å, 70-230 mesh)
- 2.2.3 Silica gel (SilviaFlash®, P60 pore size 60 Å, 40-63 µm (230-400 mesh))
- 2.2.4 Distillated hexane (Commercial grade)
- 2.2.5 Distillated acetone (Commercial grade)
- 2.2.6 Distillated methylene chloride (Commercial grade)
- 2.2.7 Distillated ethylacetate (Commercial grade)
- 2.2.8 Distillated methanol (Commercial grade)
- 2.2.9 Methanol (Analytical grade)
- 2.2.10 Pyridine (Analytical grade)
- 2.2.11 Chloroform-D1 (Merck)
- 2.2.12 Dimethyl sulfoxide-D6 (Merck)
- 2.2.13 Pyridine-D5 (Merck)
- 2.2.14 Methanol-D4 (Merck)
- 2.2.15 Sulfuric acid
- 2.2.16 Formic acid

### 2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 2.3.1 Melting points (m.p., °C) ( Electrothermal 9100)
- 2.3.2 IR spectroscopy (NICOLET 6700)
- 2.3.3 UV-Vis spectrophotometer (SHIMADZU UV-2600)
- 2.3.4 Polarimeter (JASCO DIP-370)
- 2.3.5 NMR spectroscopy (Bruker AV 400)
- 2.3.6 ESI-MS spectrometer (Bruker micro TOF spectrometer)
- 2.3.7 EI-MS spectrometer (Thermo Finnigan Polaris Q)
- 2.3.8 UV detector (CAMAG TLC Visualizer)
- 2.3.9 Sample applicator for TLC (CAMAG Linomat 5)
- 2.3.10 Rotary evaporator (Buchi)








### 2.4 วิธีดำเนินการวิจัย

- 2.4.1 การคัดเลือกพืชพื้นเมืองภาคกลางและภาคใต้ที่น่าสนใจ








การเลือกพืชพื้นเมืองจะเลือกพืชที่นำมาเป็นอาหาร โดยเฉพาะผักพื้นบ้าน เพื่อนำมาศึกษาหาคุณประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพ และหาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยพืชที่นำมาศึกษาเป็นผักพื้นบ้านของภาคกลางและภาคใต้ ดังตารางที่ 1










ตารางที่ 1. พืชพื้นเมืองภาคกลางและภาคใต้ที่ทำการศึกษา

ลำดับ	ชื่อไทย/ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	รูป	ส่วนที่ใช้
1	เหรีียง <i>Parkia timoriana</i> (Mimosaceae)		ต้นอ่อน
2	มันปู <i>Glochidion wallichianum</i> (Euphorbiaceae)		ยอดอ่อน/ใบ
3	ดาหลา <i>Niolaia elatior/ Etlingera elatior</i> (Zingiberaceae)		ดอก
4	แจง <i>Maerua siamensis</i> (Capparaceae)		ยอด/ใบ/กิ่ง
5	ผักกูด <i>Diplazium esculentum</i> (Athyriaceae)		ยอดอ่อน/ใบ
6	ผักก้านจอง <i>Limnocharis flava</i> (Alismataceae)		ยอดอ่อน/ใบ
7	กระถิน <i>Leucaena glauca/</i> <i>Leucaena leucocephala</i> (Leguminosae)		ยอดอ่อน/ใบ

ตารางที่ 1. (ต่อ) พืชพื้นเมืองภาคกลางและภาคใต้ที่ทำการศึกษา

ลำดับ	ชื่อไทย/ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	รูป	ส่วนที่ใช้
8	ผักคราดหัวแหวน <i>Spilanthis acmella</i> (Compositae)		ยอดอ่อน/ใบ/ดอก
9	ขจร <i>Telosma minor</i> (Asclepiadaceae)		ดอก
10	กระโดนบก <i>Careya sphaerica</i> (Lecythidaceae)		ยอดอ่อน/ใบ
11	เสมีตขุน <i>Eugenia grata/Syzygium gratum</i> (Myrtaceae)		ยอดอ่อน/ใบ
12	มะมุด <i>Mangifera foetida</i> (Anacardiaceae)		เนื้อผลสุก
13	ผักพุ่ม <i>Champereia manillana</i> (Opiliaceae)		ยอดอ่อน/ใบ
14	ดอกโสน <i>Sesbania aculeata</i> (Leguminosae)		ดอก

ตารางที่ 1. (ต่อ) พืชพื้นเมืองภาคกลางและภาคใต้ที่ทำการศึกษา

ลำดับ	ชื่อไทย/ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	รูป	ส่วนที่ใช้
15	ผักแมะ <i>Momordica subangulata</i> (Cucurbitaceae)		เถายอดอ่อน/ใบ
16	กระโดนน้ำ <i>Barringtonia acutangula</i> (Barringtoniaceae)		ยอดอ่อน/ใบ
17	ชำมะเรียง <i>Lepisanthes fruticosa</i> (Sapindaceae)		ผลสุก
18	ผักเหลียง <i>Gnetum gnemon</i> (Gnetaceae)		ยอดอ่อน/ใบ
19	พลองเหมือด <i>Memecylon edule</i> (Melastomataceae)		ยอดอ่อน/ใบ
20	เม่าไข่ปลา <i>Antidesma ghaesembilla</i> (Euphorbiaceae)		ยอดอ่อน/ใบ
21	สมเล็ด <i>Glochidion hypoleucum</i> (Euphorbiaceae)		ยอดอ่อน/ใบ

#### 2.4.2 การเตรียมสารสกัดหยาบโดย

2.4.2.1 เตรียมตัวอย่างผักพื้นบ้านภาคกลางและภาคใต้จำนวน 21 ชนิด ได้แก่ ลูกเหริยง ใบมันปู ดอกดาหลา ใบแจง ผักกูด ผักก้านจอบ ยอดกระถิน ผักคราดหัวแหวน ดอกขจร ใบกระโดนบก ผักเสม็ดขุ่น ผักพุ่ม ดอกโสน ผักแมะ กระโดนน้ำ พลองเหมือด เมาไขปลา และสมเล็ด โดยการอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C และบดให้เป็นผง ส่วนผลมะมุด และขำมะเรียง ทำการสกัดสดโดยใช้เนื้อผลสุกปั่นให้ละเอียด

2.4.2.2 นำตัวอย่างผักพื้นบ้านที่ผ่านการบดแล้ว ซึ่งอย่างละประมาณ 50 หรือ 100 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% เมทานอลในน้ำ โดยวิธีการหมัก (maceration) ประมาณ 3 ถึง 7 วัน แล้วกรองสารสกัดที่ได้ และนำไปทำให้แห้งโดยการระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator

2.4.2.3 สกัดตัวอย่างซ้ำตามข้อ 3.2.2 จำนวน 10 ครั้ง หรือจนกว่าจะสามารถสกัดจนหมดจด

2.4.2.4 กำจัดตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยการระเหย ด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำให้แห้งมากขึ้นด้วยเครื่อง Freeze dryer

2.4.2.5 ชั่งสารสกัดหยาบแห้งที่ได้และคำนวณหา %yield

#### 2.4.3 การหาระบบชีวภาคเคลื่อนที่ในการแยกสารที่เหมาะสมด้วย TLC โดย

2.4.3.1 เตรียมสารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 30 mg/mL

2.4.3.2 นำสารละลายที่ได้ขีดบนแผ่น TLC ปริมาตร 10 µL

2.4.3.3 นำแผ่น TLC ไปใส่ใน TLC tank ที่บรรจุชีวภาคเคลื่อนที่ชนิดและอัตราส่วนต่างๆ

2.4.3.4 ตรวจสอบลักษณะการแยกของสารภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และพ่นด้วยสารละลาย 30% sulfuric acid

2.4.4 ส่งสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเลือกผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวน 2 ชนิด เพื่อศึกษาหาสารออกฤทธิ์

#### 2.4.5 การสกัดผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด โดย

2.4.5.1 นำผักพื้นบ้านแห้งที่บดเป็นผงแล้วไปสกัดโดยวิธีการหมัก ทำการสกัดซ้ำหลายๆ ครั้งแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 2-3 วัน จนหมดจด ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอลตามลำดับ

2.4.5.2 นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไปโดยการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำให้แห้งมากขึ้นด้วยเครื่อง Freeze dryer

2.4.5.3 ชั่งสารสกัดแห้งได้ และคำนวณหา % yield ของสารสกัดแต่ละชนิด

#### 2.4.6 การหาระบบชีวภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกสารของสารสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ได้ด้วยวิธี TLC

2.4.7 ส่งสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น เพื่อเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ไปทำการแยกต่อ

2.4.8 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชทั้งสองชนิดด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี ได้แก่ column chromatography, preparative TLC

2.4.9 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่ IR spectroscopy, UV-Vis spectroscopy, NMR spectroscopy, MS spectrometry

2.4.10 ส่งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase

### บทที่ 3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักพื้นบ้าน

#### 3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบด้วย 80% เมทานอล

การเตรียมสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้านทั้ง 21 ชนิด โดยการหมักด้วย 80% เมทานอลในน้ำ ได้ปริมาณสารสกัดคิดเป็น % yield ดังในตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดจากผักต่างๆ มี % yield ต่างๆ กัน คือประมาณตั้งแต่ 7% ถึง 40% และสารสกัดส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นสารหนืดสีน้ำตาล หรือสีเขียว ยกเว้นสารสกัดจากยอดกระโดนบกมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล

ตารางที่ 2. ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักพืชแห้ง และลักษณะของสารสกัดที่ได้

ลำดับที่	พืช	น้ำหนักพืชแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)	% yield	ลักษณะสารสกัดหยาบ
1	ลูกเหริยง	100.5	33.53	33.36	สารหนืดสีน้ำตาล
2	ใบมันปู	100.7	15.39	15.28	สารหนืดสีน้ำตาล
3	ดอกดาหลา	100.4	5.84	5.82	สารหนืดสีน้ำตาลแดง
4	ใบแจง	101.9	25.55	25.07	สารหนืดสีน้ำตาล
5	ผักกูด	100.1	7.91	7.90	สารหนืดสีเขียว
6	ผักก้านจอก	100.1	34.85	34.82	สารหนืดสีน้ำตาล
7	ผักกระถิน	100.2	24.48	24.43	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล
8	ผักคราดหัวแหวน	100.8	23.99	23.80	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล
9	ดอกขจร	100.3	33.46	33.36	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล
10	ผักกระโดนบก	100.9	41.93	41.56	ของแข็งสีน้ำตาล
11	ผักเสี้ยนดิน	100.5	13.69	13.62	สารหนืดสีน้ำตาล
12	ผลมะมุด	3,000.0*	265.08	8.84**	สารหนืดสีเหลืองน้ำตาล
13	ผักพุ่ม	100.4	17.50	17.43	สารหนืดสีเขียวเข้ม
14	ดอกโสน	100.3	19.10	19.04	สารหนืดสีน้ำตาล
15	ผักแมะ	100.0	22.74	22.74	สารหนืดสีน้ำตาล
16	เฒ่าไขปลา	50.0	10.64	21.28	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
17	กระโดนน้ำ	100.0	24.44	24.44	สารหนืดสีน้ำตาล
18	ผักเหลียง	100.2	27.12	27.19	สารหนืดสีน้ำตาล
19	ชำมะเรียง	987.3*	96.47	9.77**	สารหนืดสีม่วง
20	พลองเหมือด	50.0	9.60	19.20	ของแข็งสีน้ำตาล
21	สมเส็ด	49.66	13.16	26.50	ของแข็งสีน้ำตาล

\*น้ำหนักสดของเนื้อผลสุก, \*\*% yield คำนวณน้ำหนักสดของตัวอย่าง

#### 3.2 การหาระบบการแยกสารที่เหมาะสมด้วยวิธี TLC

การทดลองหาระบบตัวนำพาที่เหมาะสมด้วยวิธี TLC เพื่อใช้สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ที่ใช้ TLC ในการทดสอบเช่นฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และใช้เป็นระบบในการแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไป การทดลองโดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น Silica gel 60 F<sub>254</sub> พบว่าสารสกัดพืชด้วย 80% เมทานอลในน้ำ มีความเป็นขั้วสูง จึงต้องใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ค่อนข้างมีขั้วคือ ส่วนผสมของเมทานอล เมทิลลีนคลอไรด์ และน้ำ และส่วนผสมของเมทานอล และคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วนต่างๆ ตามวัสดุภาคเคลื่อนที่ ระบบที่ 1-9 โดยสารสกัดของพืช 15 ชนิด ได้แก่ ลูกเหริยง มันปู ดาหลา แจง ผักกูด ผักก้านจอก กระถิน ผักคราดหัวแหวน ดอกขจร กระโดนบก เสี้ยนดิน



มะมุด ผักพุ่ม ดอกโสน และผักมะ ทดสอบด้วยระบบที่ 1-6 ส่วนสารสกัดพืช 5 ชนิด ได้แก่ เม้าไข่ปลา กระโดนน้ำ ผักเหลียง ชำมะเรียง และพลองเหมือด ทดสอบด้วยระบบที่ 1-3 และ 7-9

ระบบที่ 1 Methanol:Methylene Chloride 1:4

ระบบที่ 7 Methanol:Chloroform 1:4

ระบบที่ 2 Methanol:Methylene Chloride 1:1

ระบบที่ 8 Methanol:Chloroform 1:1

ระบบที่ 3 Methanol:Methylene Chloride 4:1

ระบบที่ 9 Methanol:Chloroform 4:1

ระบบที่ 4 Methanol:Methylene Chloride:Water 1:4:0.05

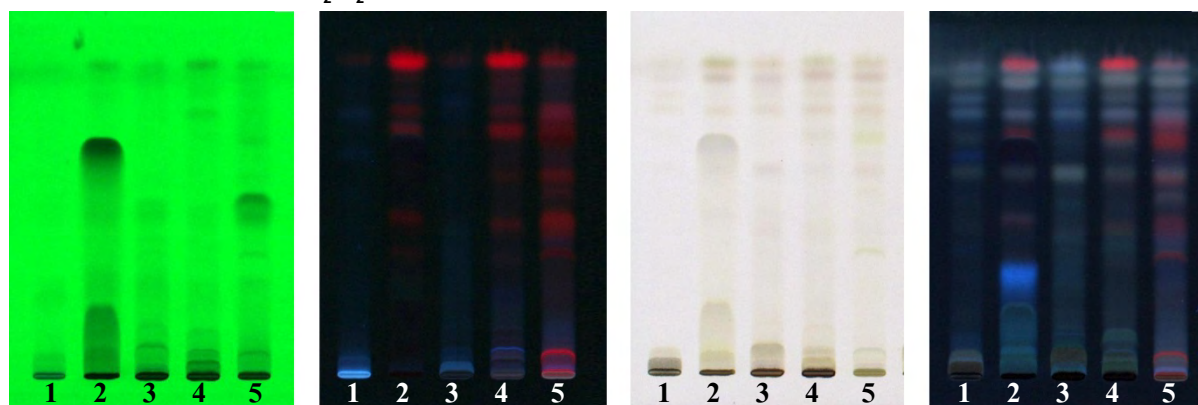
ระบบที่ 5 Methanol:Methylene Chloride:Water 1:1:0.02

ระบบที่ 6 Methanol:Methylene Chloride:Water 4:1:0.05

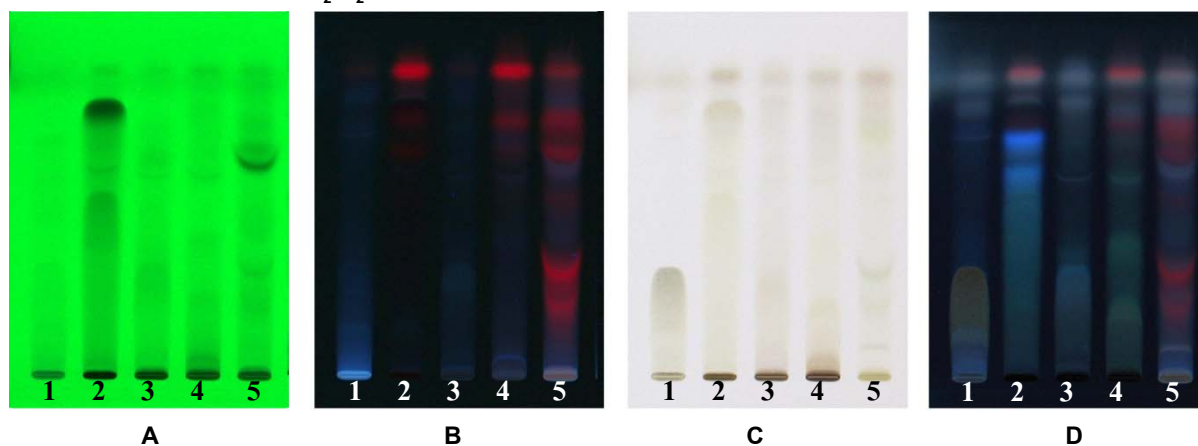
หลังจากการแยกสารโดยนำแผ่น TLC วางในระบบใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ต่างๆ ข้างต้นแล้ว พบว่าลักษณะและจำนวนของสารที่เห็นบนแผ่น TLC แผ่นเดียวกัน มีความแตกต่างกันจากการตรวจสอบด้วยวิธีต่างๆ กันคือส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และพ่นด้วยสารละลาย 30% sulfuric acid แล้วตรวจสอบภายใต้แสงขาว และแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เนื่องจากสารแต่ละชนิดจะมีความไวต่อแสงหรือสารที่ใช้ตรวจสอบแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 1-4

ผลการหาระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ในการแยกที่เหมาะสมด้วยระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นเมทานอลผสมเมทิลีนคลอไรด์ หรือ เมทานอลผสมเมทิลีนคลอไรด์และน้ำ และเมทานอลผสมคลอโรฟอร์มนั้นไม่ค่อยแตกต่างกัน และเมื่อใช้อัตราส่วนของเมทานอลเพิ่มขึ้นทำให้แถบสารมาซ้อนกันมากขึ้น จึงเลือกระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นเมทานอลผสมเมทิลีนคลอไรด์ในอัตราส่วน 1:4 เพื่อเป็นระบบวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นด้วย TLC

**Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:4]**



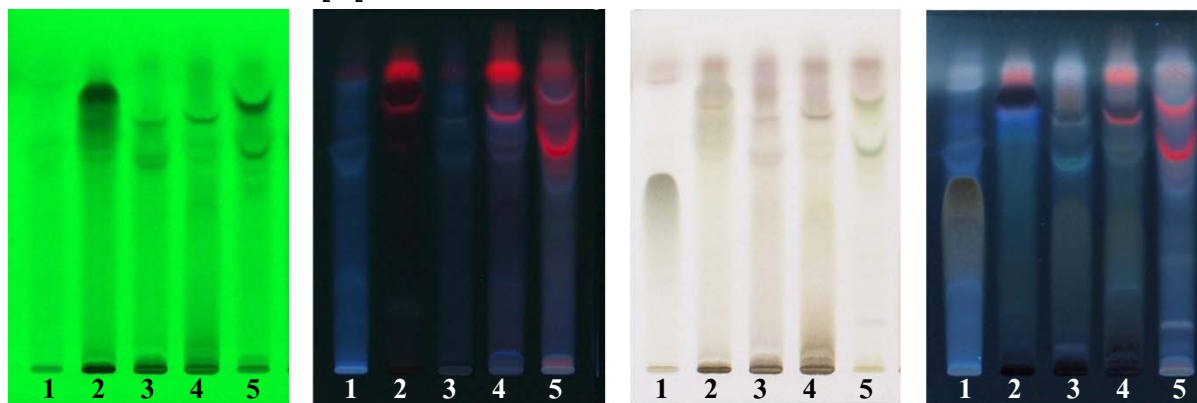
**Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:1]**



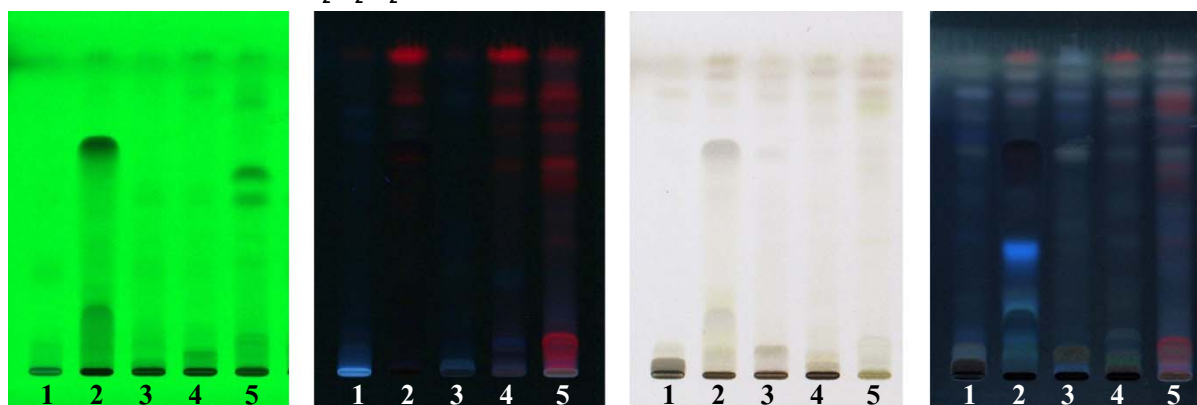
รูปที่ 1. TLC chromatogram 1 = ลูกเหรีียง, 2 = มันปู, 3 = ดอกดาหลา, 4 = แฉง, 5 = ผักกูด

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm

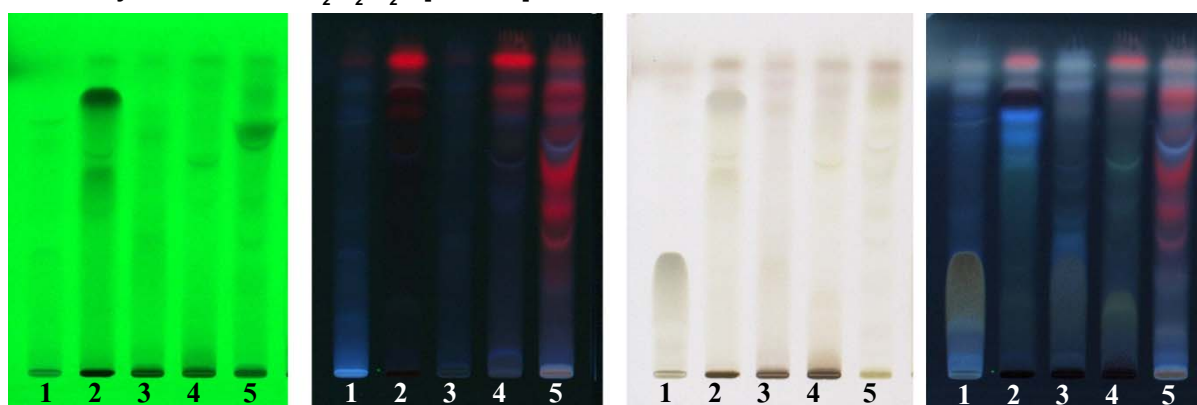
Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [4:1]



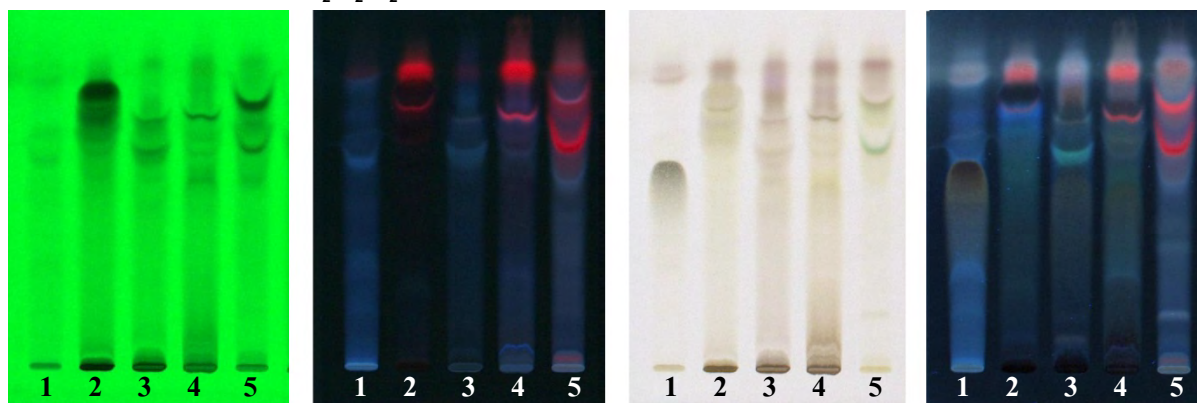
Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [1:4:0.05]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [1:1:0.02]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [4:1:0.05]



A

B

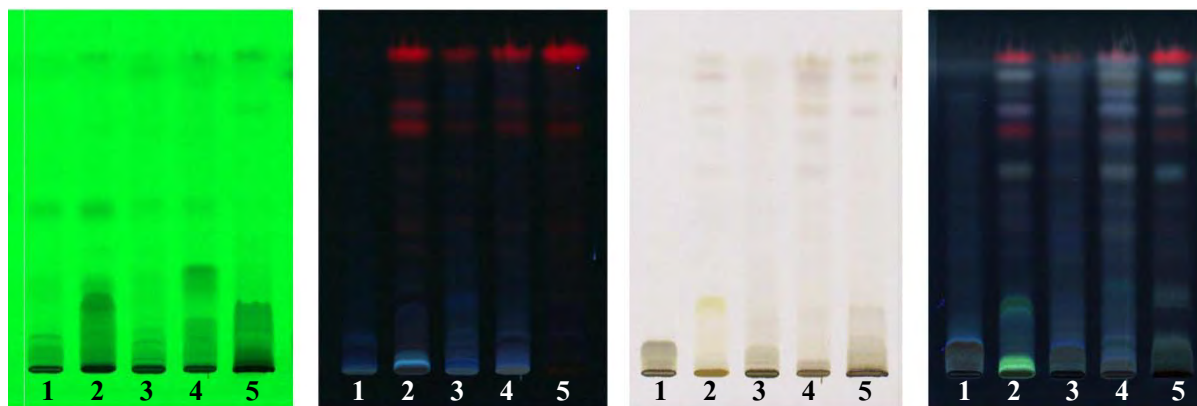
C

D

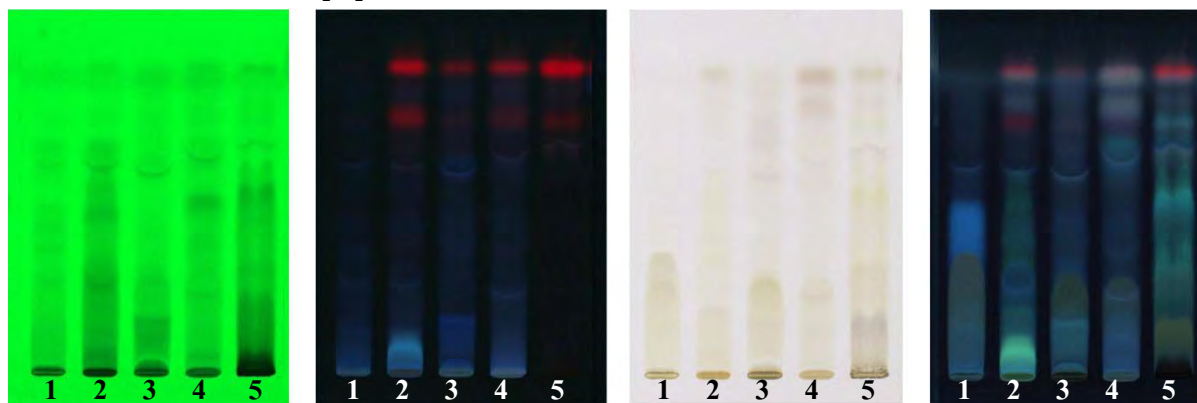
รูปที่ 1. (ต่อ) TLC chromatogram 1 = ลูกเหรี๋ยง, 2 = มันปู, 3 = ดอกดาหลา, 4 = แฉง, 5 = ผักกูด

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm

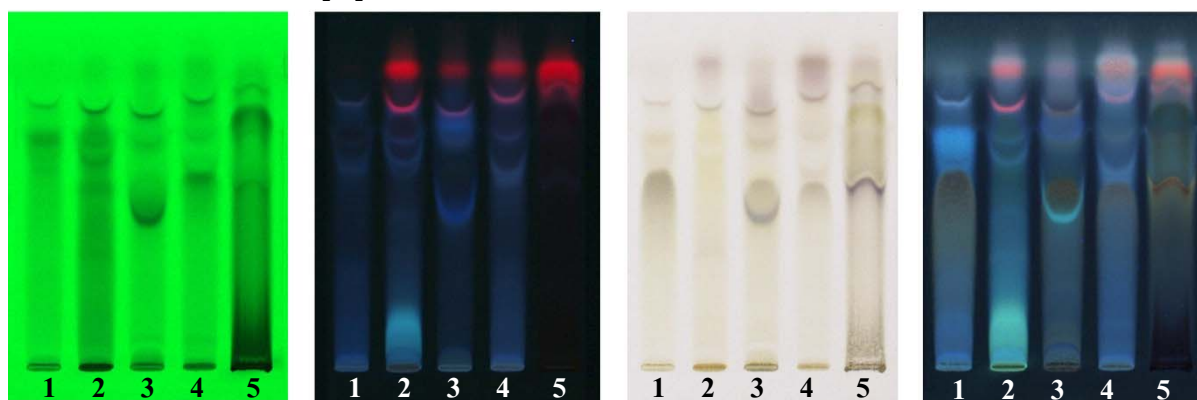
Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:4]



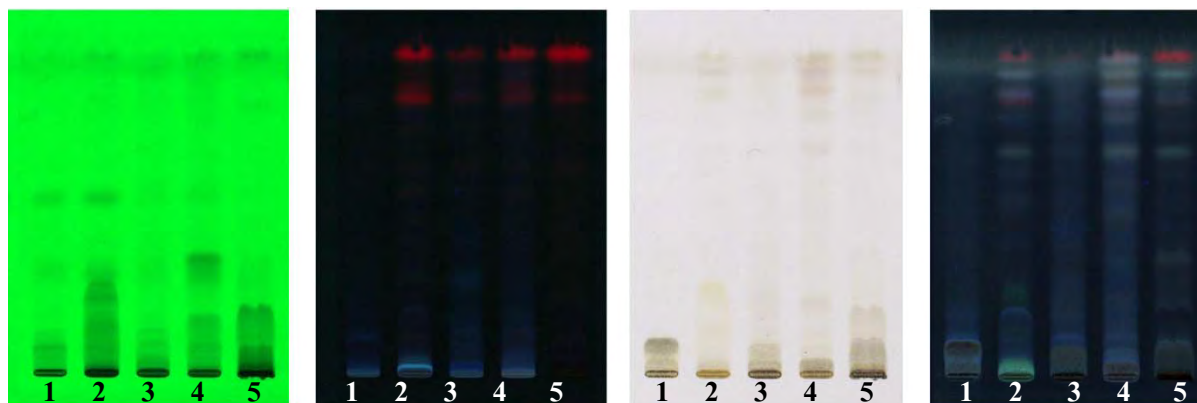
Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:1]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [4:1]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [1:4:0.05]



A

B

C

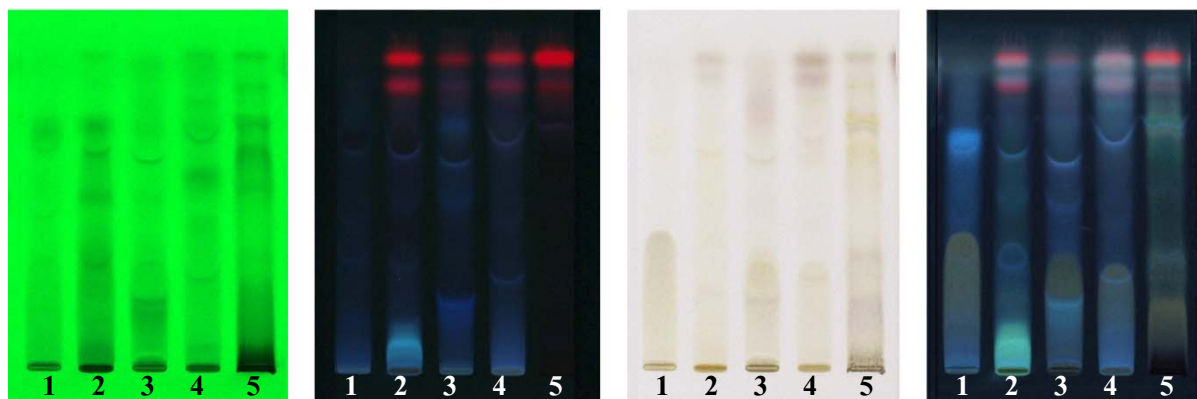
D

รูปที่ 2. TLC chromatogram 1 = ผักก้านจอง, 2 = กระถิน, 3 = ผักคราดหัวแหวน, 4 = ดอกขจร, 5 = กระโดนบก

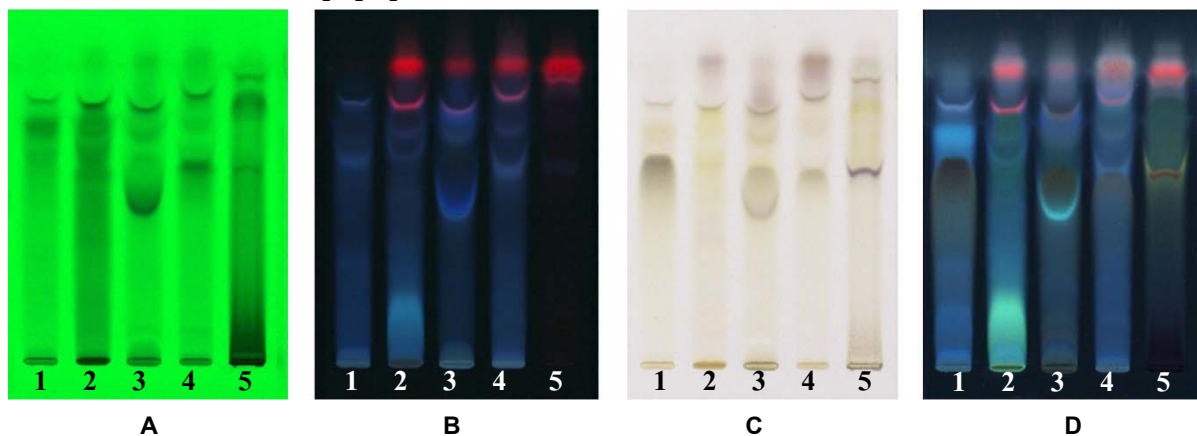
Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [1:1:0.02]

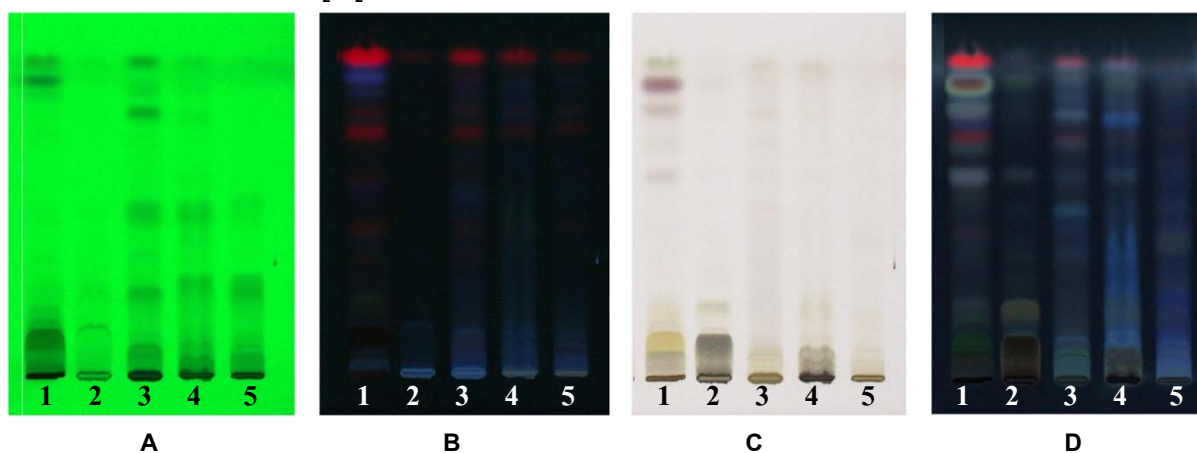


Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [4:1:0.05]



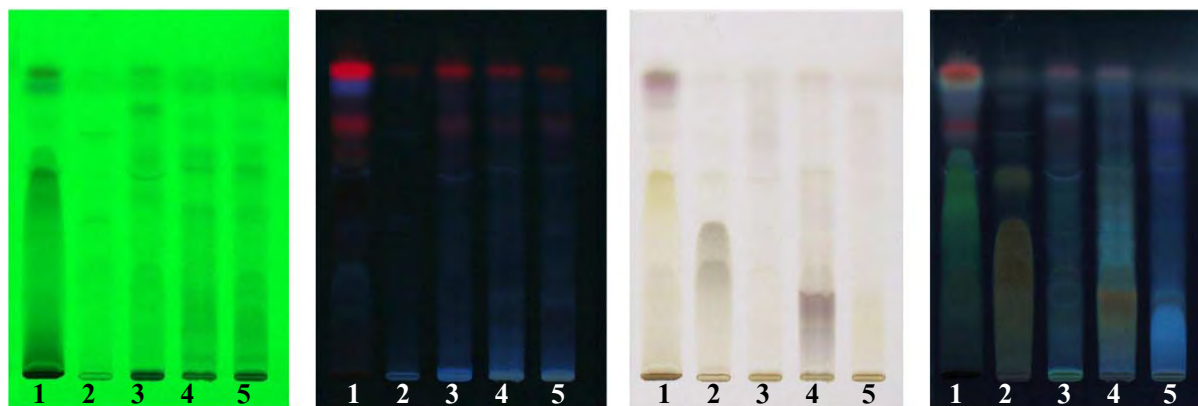
รูปที่ 2. (ต่อ) TLC chromatogram 1 = ผักก้านจอง, 2 = กระถิน, 3 = ผักคราดหัวแหวน, 4 = ดอกขจร, 5 = กระโดนบก  
Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm

Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:4]

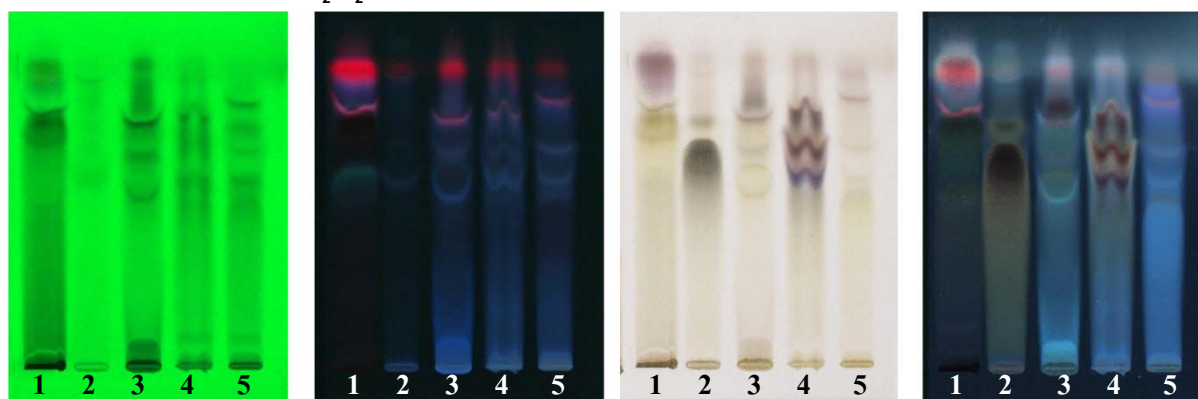


รูปที่ 3. TLC chromatogram ของ 1 = เสริม็ดขุน, 2 = มะมุด, 3 = ผักพุ่ม, 4 = ดอกโสน, 5 = ผักแมะ  
Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm

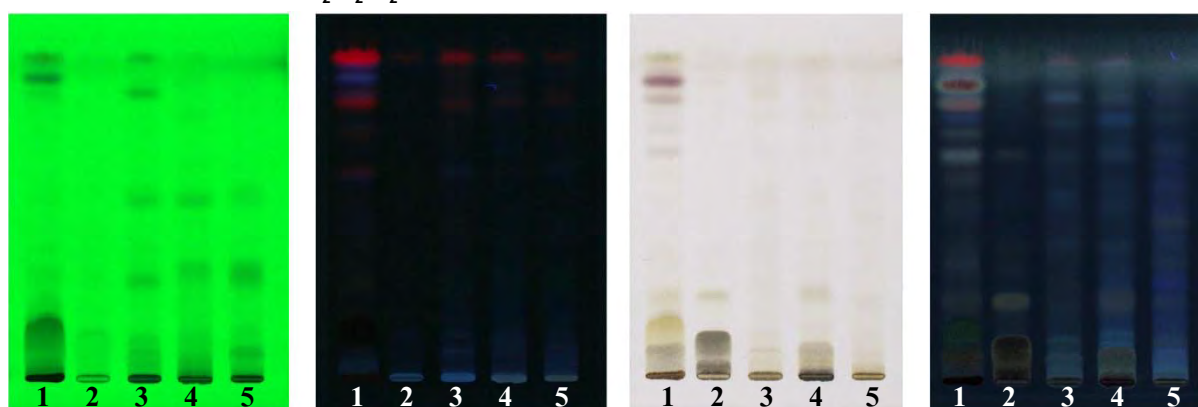
Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:1]



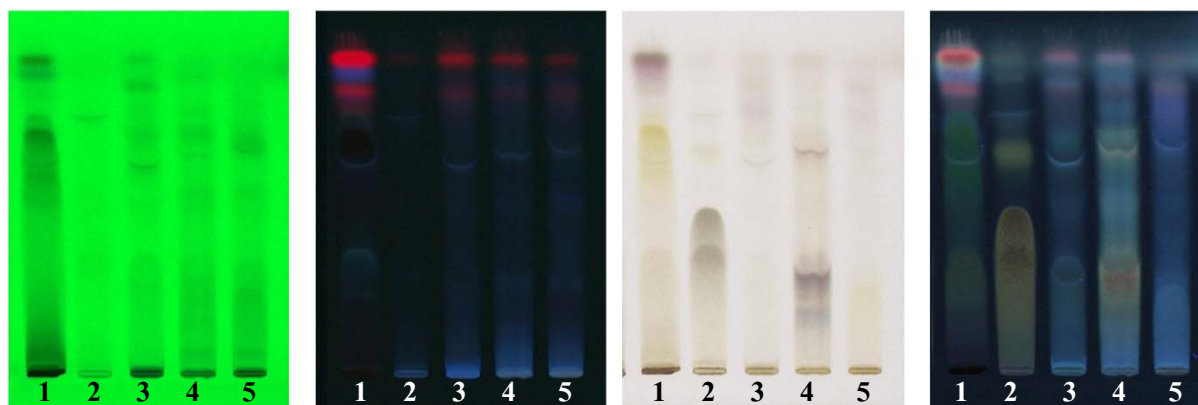
Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [4:1]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [1:4:0.05]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [1:1:0.02]



A

B

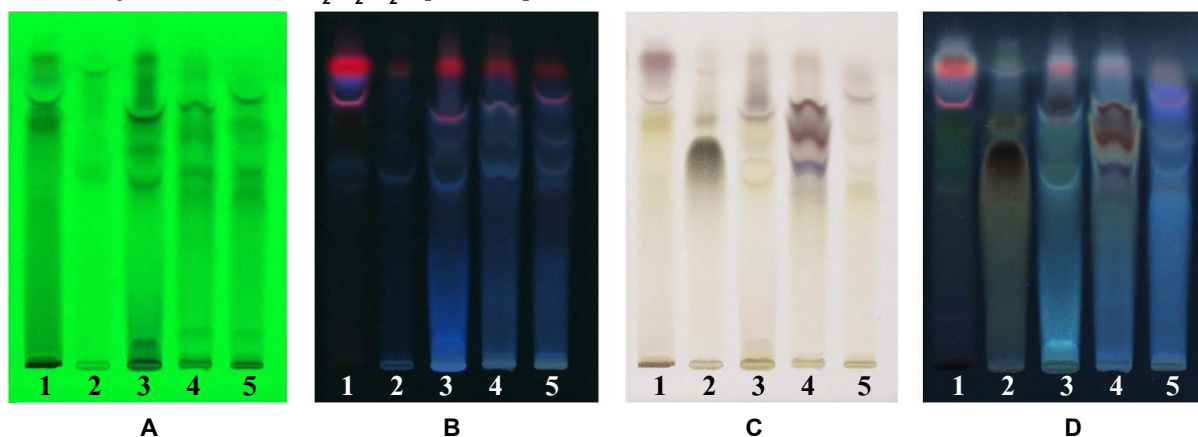
C

D

รูปที่ 3. (ต่อ) TLC chromatogram ของ 1 = เสริมดิน, 2 = มะมุด, 3 = ผักพุ่ม, 4 = ดอกโสน, 5 = ผักแมะ

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm

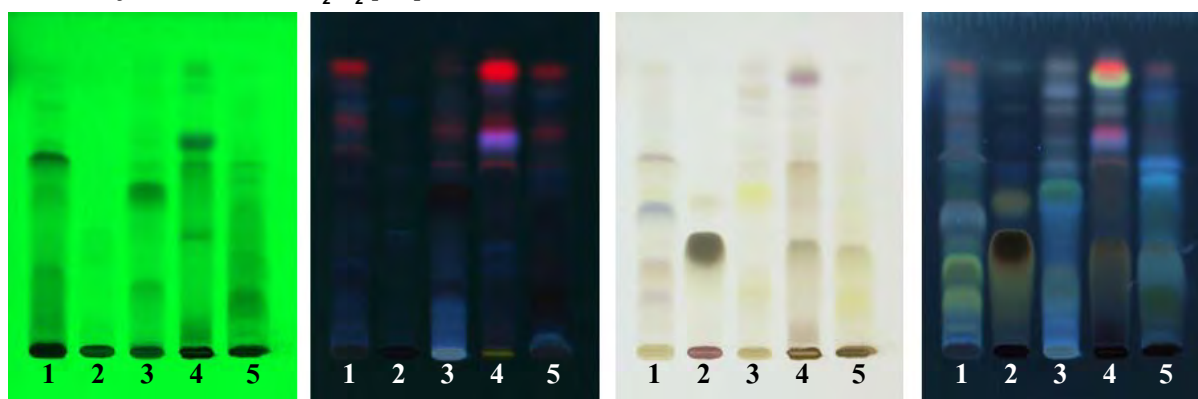
Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O [4:1:0.05]



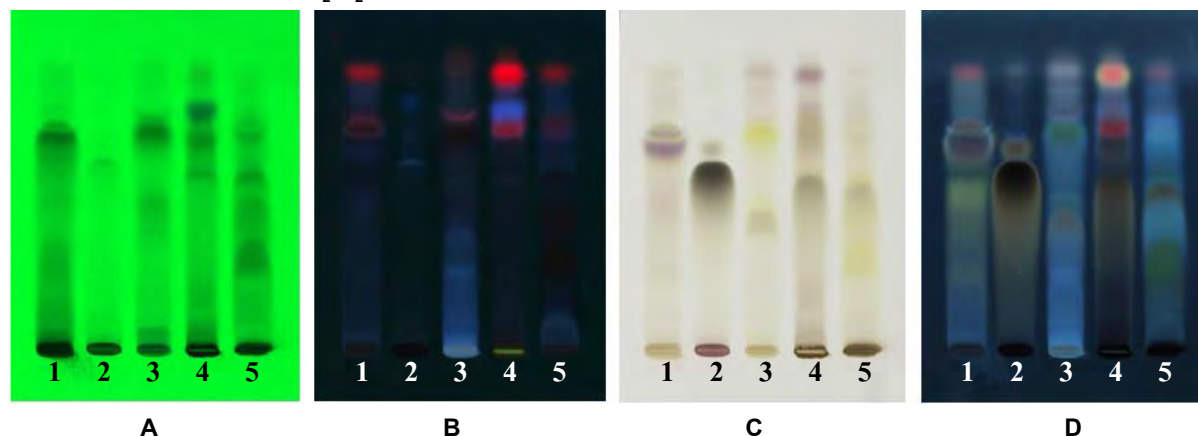
รูปที่ 3. (ต่อ) TLC chromatogram ของ 1 = เสมีดขุน, 2 = มะมุด, 3 = ผักพุ่ม, 4 = ดอกโสน, 5 = ผักแมะ

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm

Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:4]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:1]

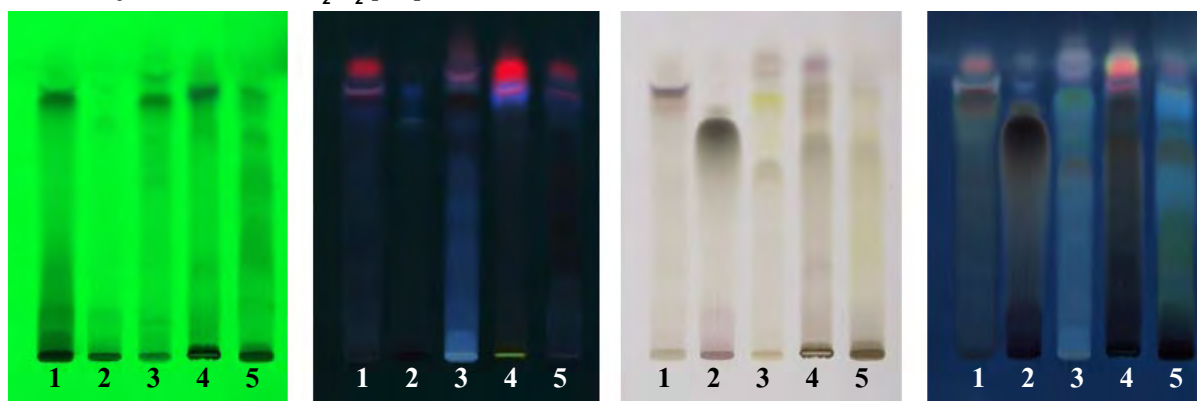


รูปที่ 4. TLC chromatogram 1 = กระโดนน้ำ, 2 = ชำมะเรียง, 3 = ผักเหลียง, 4 = พลองเหมือด, 5 = เมาไขปลา

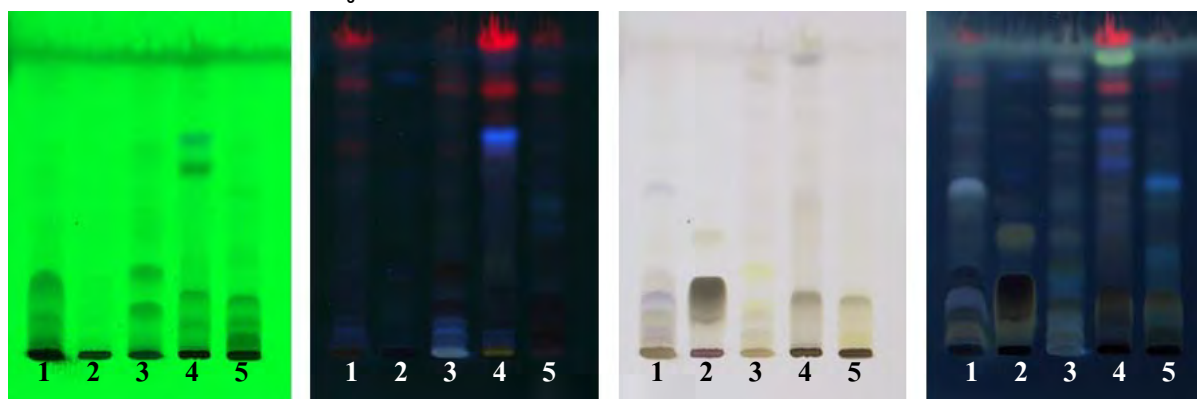
Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm



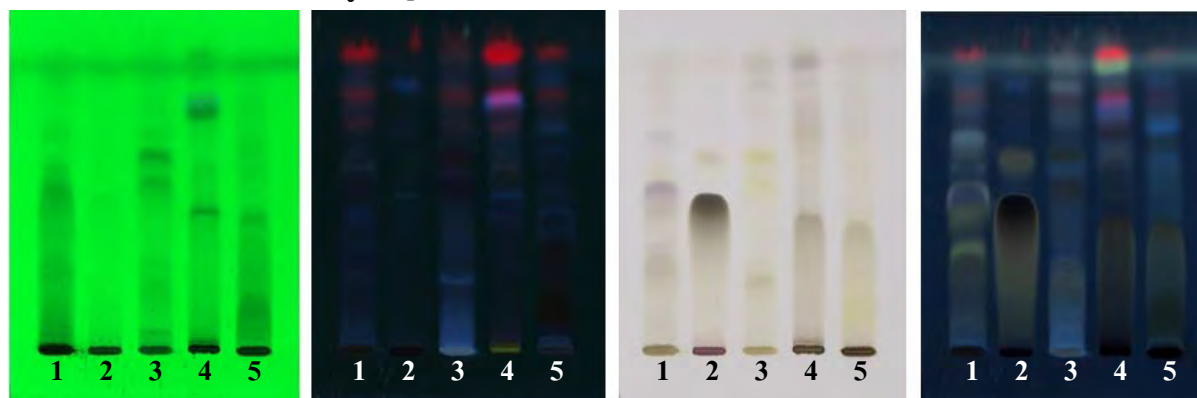
Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [4:1]



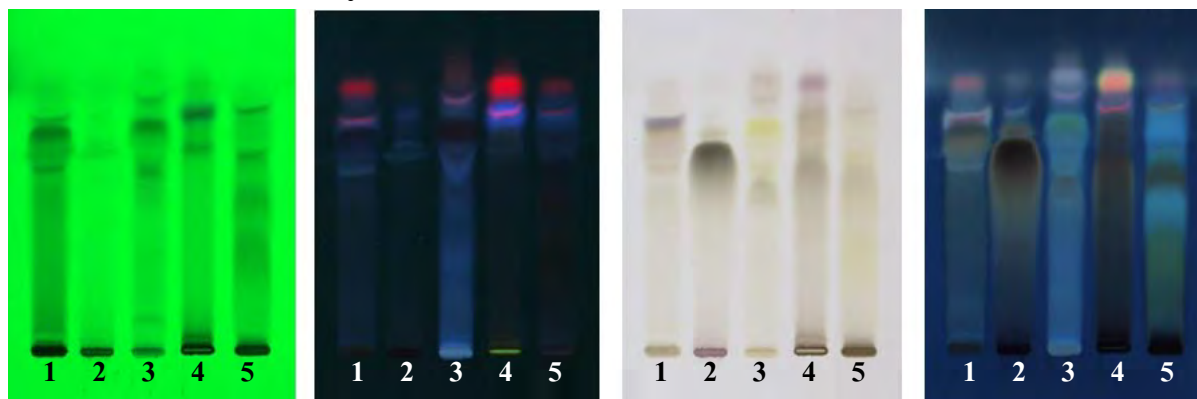
Solvent system : MeOH:CHCl<sub>3</sub> [1:4]



Solvent system : MeOH:CHCl<sub>3</sub> [1:1]



Solvent system : MeOH:CHCl<sub>3</sub> [4:1]



A

B

C

D

รูปที่ 4. (ต่อ) TLC chromatogram 1 = กระโดนน้ำ, 2 = ชำมะเรียง, 3 = ผักเหลียง, 4 = พลองเหมือด, 5 = เมาไขปลา

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm

### 3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

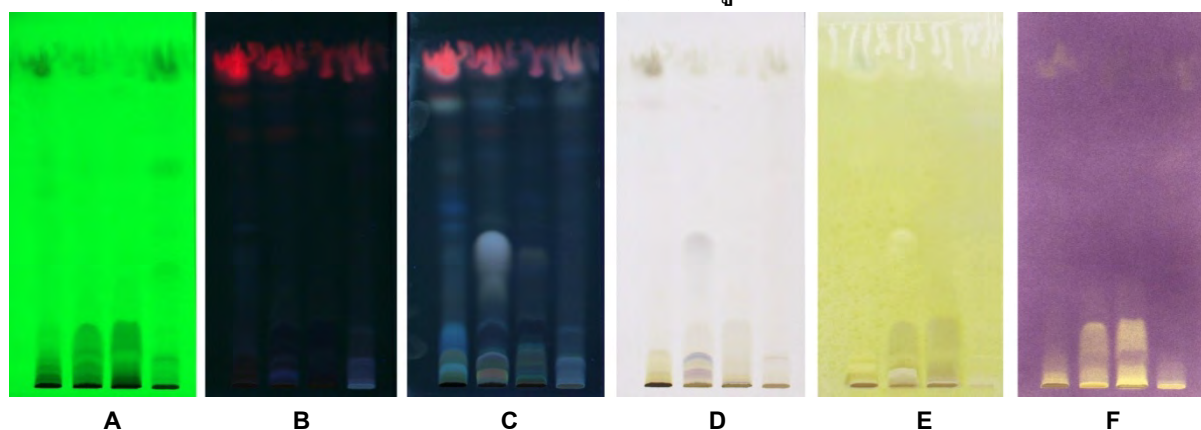
การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของผักพื้นบ้าน 21 ชนิด และเลือกผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวน 2 ชนิด เพื่อศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

#### 3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นด้วย TLC

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH method) เบื้องต้นด้วย TLC ของสารสกัดด้วย 80% เมทานอลในน้ำของผักพื้นบ้านทั้ง 20 ชนิด ได้แก่ เมาໄ໊ปลา (*Antidesma ghaesembilla*) กระโดนน้ำ (*Barringtonia acutangula*) กระโดนบก (*Careya sphaerica*) ผักพุ่ม (*Champereia manillana*) ผักกูด (*Diplazium esculentum*) เสม็ดชุน (*Eugenia grata* หรือ *Syzygium gratum*) ไบมันปู (*Glochidion wallichianum*) ผักเหลียง (*Gnetum gnemon*) ขำมะเรียง (*Lepisanthes fruticosa*) ผักกระถิน (*Leucaena glauca* หรือ *Leucaena leucocephala*) ผักก้านทอง (*Limnocharis flava*) พลองเหมือด (*Memecylon edule*) ไบแจง (*Maerua siamensis*) ผลมะมุด (*Mangifera foetida*) ดอกดาหลา (*Niolaia elatior* หรือ *Etlingera elatior*) ลูกเหรี้ง (*Parkia timoriana*) ดอกโสน (*Sesbania aculeate*) ผักคราดหัวแหวน (*Spilanthes acmella*) ดอกขจร (*Telosma minor*) ผักแมะ (*Momordica subangulata*) โดยใช้สารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 30 mg/mL ปริมาตร 10  $\mu$ L ชีบบนวัสดุภาคคงที่คือ Silica gel 60 F<sub>254</sub> และใช้ MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:4] เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ได้ผลแสดงในรูปที่ 5

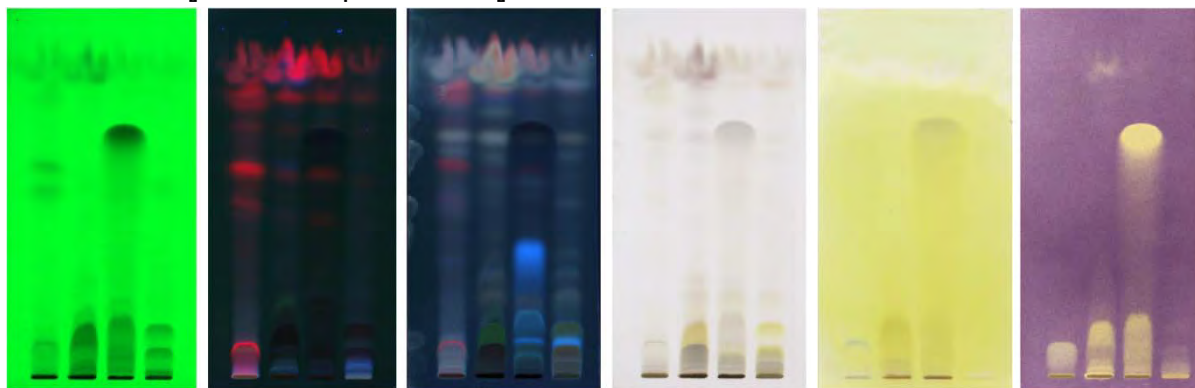
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นด้วย TLC ของสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 20 ชนิด พบว่าผักพื้นบ้านที่มีสารต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยปรากฏเป็นแถบสีขาวของสารบนพื้นสีเหลืองของ TLC ได้แก่ เมาໄ໊ปลา กระโดนน้ำ กระโดนบก เสม็ดชุน มั่นปู ผักก้านทอง แจง พลองเหมือด ผลมะมุด ดอกดาหลา ดอกโสน ดอกขจร และผักยอ ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วย TLC พบว่าสารสกัดผักพื้นบ้านส่วนใหญ่มีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เนื่องจากมีแถบสีเหลืองเกิดขึ้นบนแผ่น TLC จากการเปลี่ยนแปลงของอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสีม่วง และพบว่าสารสกัดไบมันปูให้ผลบวกในการทดสอบโดยเปลี่ยนสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นสีเหลืองทันที และให้ผลชัดที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากผักกระโดนบก กระโดนน้ำ เสม็ดชุน พลองเหมือด และกระถิน

แถบสาร 1 = เมาໄ໊ปลา, 2 = กระโดนน้ำ, 3 = กระโดนบก, 4 = ผักพุ่ม

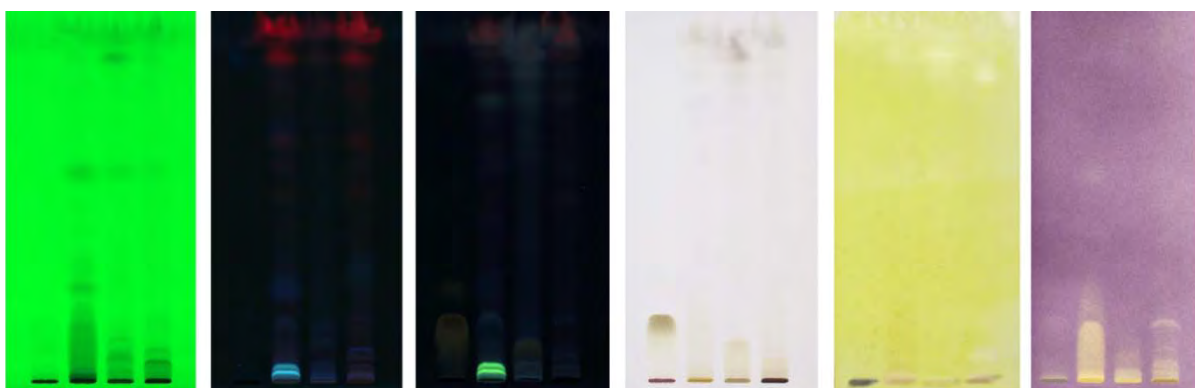


รูปที่ 5. TLC chromatogram ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ, Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, E = Anti-AChE, F = Anti-DPPH

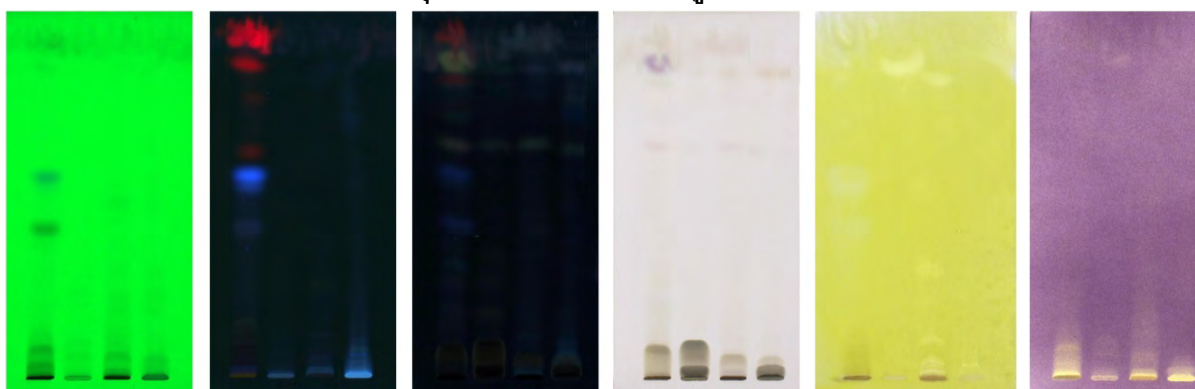
แถบสาร 1 = ผักกูด, 2 = เสม็ดขุน, 3 = ใบมันปู, 4 = ผักเหลียง



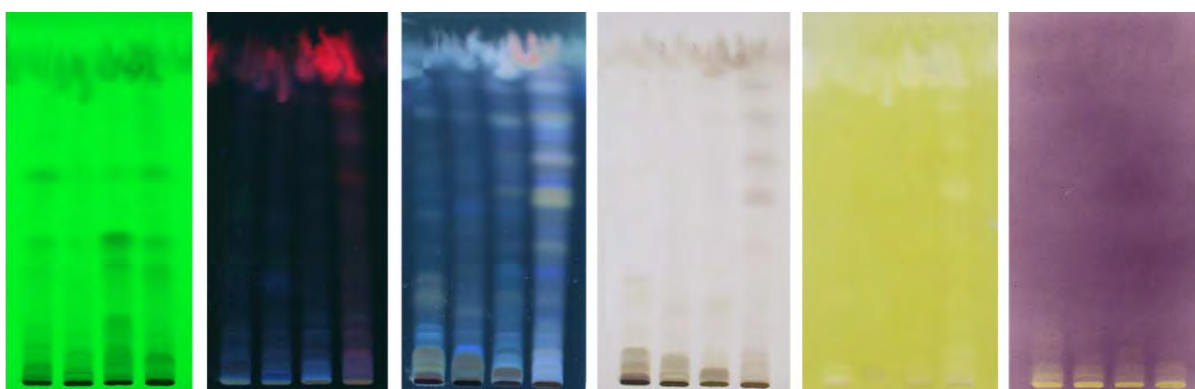
แถบสาร 1 = ขำมะเรียง, 2 = ผักกระถิน, 3 = ผักก้านจอง, 4 = ใบแจง



แถบสาร 1 = พลองเหมือด, 2 = ผลมะมุด, 3 = ดอกดาหลา, 4 = ลูกเหรียง



แถบสาร 1 = ดอกโสน, 2 = ผักคราดหัวแหวน, 3 = ดอกขจร, 4 = ผักแมะ



A

B

C

D

E

F

รูปที่ 5. (ต่อ) TLC chromatogram ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ, Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30%  $H_2SO_4$ / UV 366 nm, D = 30%  $H_2SO_4$ , E = Anti-AChE, F = Anti-DPPH

### 3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ด้วยวิธี Ellman's method

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ด้วยวิธี Ellman's method โดยทดสอบใน microplate และอ่านค่าด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm และคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  โดยสารที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase จะยับยั้งปฏิกิริยาการเปลี่ยนของสาร acetylthiocholine เป็น thiocholine ทำให้ไม่เกิดสารสีเหลืองจากการรวมตัวของสาร thiocholine กับสาร 5,5'-dithiobis-[2-nitrobenzoic acid] (DTNB) ดังนั้นที่ความเข้มข้นเดียวกัน สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase มากกว่าจะเกิดสีเหลืองน้อยกว่า โดยค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ ของสารที่ความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/mL}$  และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดด้วย 80% เมทานอลในน้ำของผักพื้นบ้านทั้ง 21 ชนิด แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. ผลการทดสอบฤทธิ์ anti-AChE ของสารสกัดด้วย 80% เมทานอลในน้ำของผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ

สารสกัด	% inhibition (ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Galanthamine (positive control)	-	$0.81 \pm 0.04$
เม้าไขปลา	$47.58 \pm 1.72$	-
กระโดนน้ำ	$84.20 \pm 1.05$	$302.19 \pm 26.99$
กระโดนบก	$68.93 \pm 1.58$	$256.98 \pm 6.89$
ผักพุ่ม	$13.37 \pm 0.35$	-
ผักกูด	$16.03 \pm 1.23$	-
เสม็ดขุน	$85.67 \pm 0.38$	$152.46 \pm 4.12$
ใบมันปู	$81.27 \pm 1.32$	$186.68 \pm 5.23$
ผักเหลียง	$17.76 \pm 0.51$	-
ชำมะเรียง	$13.19 \pm 0.33$	-
ผักกระถิน	$17.43 \pm 1.94$	-
ผักก้านจอบ	$11.09 \pm 0.78$	-
พลองเหมือด	$36.30 \pm 1.49$	-
แจง	$20.39 \pm 0.92$	-
ผลมะมุด	$11.54 \pm 0.89$	-
ดอกดาหลา	$12.89 \pm 0.94$	-
ลูกเหรีียง	$8.85 \pm 2.02$	-
ดอกโสน	$12.30 \pm 0.22$	-
ผักคราดหัวแหวน	$22.89 \pm 0.69$	-
ดอกขจร	$38.03 \pm 2.72$	-
ผักแมะ	$9.73 \pm 0.47$	-
ใบสมเล็ด	$88.09 \pm 2.49$	$63.49 \pm 0.63$

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/mL}$  พบว่า สารสกัดผักที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มากกว่า 50% คือผักกระโดนน้ำ กระโดนบก เสม็ดขุนมันปู และสมเล็ด โดยมีค่าเท่ากับ  $84.20 \pm 1.05$ ,  $68.93 \pm 1.58$ ,  $85.67 \pm 0.38$ ,  $81.27 \pm 1.32$  และ  $88.09 \pm 2.49$  ตามลำดับ และผลจากการทดสอบหา  $IC_{50}$  ของสารสกัดผักทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $302.19 \pm 26.99$ ,  $256.98 \pm 6.89$ ,  $152.46 \pm 4.12$ ,  $186.68 \pm 5.23$  และ  $63.49 \pm 0.63$   $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ

### 3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี FRAP assay และ DPPH assay

การวัดประสิทธิภาพของสารในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay โดยใช้ microplate อ่านค่าด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 593 nm และคำนวณเป็นค่า FRAP value ซึ่งเป็นค่าที่บอกความสามารถในการรีดิวซ์  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ ให้เป็น  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ดังนั้นสารที่มีค่า FRAP value สูง แสดงว่าเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี จึงมีความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี ซึ่งผลของค่า FRAP value ของผักพื้นบ้านทั้ง 21 ชนิดแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. FRAP value ของสารสกัดด้วย 80% เมทานอลในน้ำของผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ

สารสกัด	FRAP value (mmol $\text{FeSO}_4$ /100 g dried sample)	DPPH $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Vit C (positive control)	225.77	$10.52 \pm 0.48$
Trolox (positive control)	226.82	$12.54 \pm 0.89$
มะขามป้อม	4.73	$50.74 \pm 0.46$
กระโดนน้ำ	44.73	$16.58 \pm 0.31$
กระโดนบก	85.99	$9.87 \pm 0.07$
ผักพุ่ม	8.95	$681.88 \pm 5.61$
ผักกูด	0.90	$1,149.79 \pm 32.58$
เสม็ดขุ่น	29.95	$49.22 \pm 0.37$
ใบมันปู	26.66	$11.05 \pm 0.12$
ผักเหลียง	3.67	$1,548.45 \pm 11.85$
ขามะเรียง	2.54*	$468.2 \pm 1.49$
ผักกระถิน	15.15	$440.34 \pm 2.79$
ผักก้านจอก	12.94	$512.53 \pm 3.4$
พลองเหมือด	25.08	$48.42 \pm 0.26$
แจง	14.96	$508.52 \pm 5.28$
ผลมะมุด	1.35**	$962.5 \pm 11.29$
ดอกดาหลา	3.25	$453.32 \pm 4.16$
ลูกเหรีียง	1.74	$1,159.61 \pm 18.57$
ดอกโสน	3.79	$517.22 \pm 2.87$
ผักคราดหัวแหวน	9.83	$477.11 \pm 4.41$
ดอกขจร	5.54	$583.34 \pm 11.31$
ผักแมะ	3.03	$1,150.95 \pm 2.46$
ใบสมเล็ด	62.28	$39.97 \pm 0.26$

\*คิดต่อ 100 กรัม น้ำหนักพืชสด

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี FRAP assay พบว่าสารสกัดจากกระโดนบก ให้ค่า FRAP value สูงที่สุด รองลงมาคือ สมเล็ด กระโดนน้ำ เสม็ดขุ่น มันปู และ พลองเหมือด โดยมีค่า FRAP value เท่ากับ 85.99, 62.28, 44.73, 29.95, 26.66 และ 25.08 mmol  $\text{FeSO}_4$  /100 g ของน้ำหนักพืชแห้ง ตามลำดับ

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH assay พบว่าสารสกัดจากกระโดนบกมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด รองลงมาคือ มันปู กระโดนน้ำ สมเล็ด พลองเหมือด และ เสม็ดขุ่น โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $9.87 \pm 0.07$ ,  $11.05 \pm 0.12$ ,  $16.58 \pm 0.31$ ,  $39.97 \pm 0.26$ ,  $48.42 \pm 0.26$  และ  $49.22 \pm 0.37$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ



### 3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร และเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารฮีสตามีน

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร ได้แก่เชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella Flexneri*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Enterococcus sp.*, *Phaseolus vulgaris* และ *Salmonella typhi* และเชื้อที่สามารถสร้างสารฮีสตามีนทำให้เกิดอาการแพ้ ได้แก่เชื้อ *Morganella morganii*, *Psychrobacter arenosus*, *Acinetobacter junii* และ *Myroides sp.* โดยหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัด 80% เมทานอลในน้ำของผักพื้นบ้าน ทั้ง 20 ชนิด ต่อเชื้อดังกล่าว ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5-7

ผลการการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร และเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการแพ้โดยสร้างสารฮีสตามีน พบว่าสารสกัด 80% เมทานอลในน้ำของผักพื้นบ้านทั้ง 20 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว หรือมีฤทธิ์น้อยมาก เนื่องจากค่า MIC และ MBC ของสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 20 ชนิด มีค่ามากกว่าค่าที่ WHO กำหนด คือสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต้องมีค่า MBC ไม่เกิน 125 µg/mL

ตารางที่ 5. ค่า MIC และ MBC (mg/mL) ของสารสกัดผักพื้นบ้านต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Sh. Flexneri*, *B. cereus* และ *S. aureus*

สารสกัด	<i>E. coli</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>Shi. flexneri</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
เมาไซปลา	25	25	12.5	12.5	12.5	>25	12.5	25	6.25	12.5	12.5	12.5
กระโดนน้ำ	6.25	25	12.5	>25	>25	>25	12.5	25	6.25	12.5	1.56	6.25
กระโดนบก	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	25	>25	>25	>25	>25
ผักพุ่ม	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	25	3.125	6.25
ผักกูด	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
เส้ม็ดขุน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
มันปู	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ผักเหลียง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	>25
ขำมะเรียง	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25
ผักกระถิน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	6.25	12.5
ผักก้านจอบ	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25
พลองเหมือด	12.5	25	6.25	12.5	3.13	12.5	12.5	12.5	3.13	12.5	6.25	12.5
แจง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ผลมะมุด	25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25	>25	>25	25	>25
ดอกดาหลา	12.5	25	>25	>25	12.5	25	12.5	25	6.25	12.5	3.125	12.5
ลูกเหรีียง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ดอกโสน	12.5	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	>25
ผักคราดหัว แหวน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25	12.5	25
ดอกขจร	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ผักมะ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25	3.125	6.25

ตารางที่ 6. ค่า MIC และ MBC (mg/mL) ของสารสกัดผักพื้นบ้านต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *Enterococcus sp.*, *P. vulgaris* และ *S. typhi*

สารสกัด	<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>Enterococcus sp.</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>S. typhi</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
เมาไข่ปลา	6.25	12.5	12.5	25	1.56	6.25	25	>25	6.25	25
กระโดนน้ำ	3.13	12.5	12.5	>25	1.56	6.25	6.25	25	3.13	6.25
กระโดนบก	>25	>25	>25	>25	25	>25	>25	>25	25	>25
ผักพุ่ม	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ผักกูด	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
เสม็ดชุน	3.125	12.5	12.5	25	3.125	12.5	6.25	>25	6.25	25
มันปู	1.562	6.25	3.125	12.5	1.562	12.5	6.25	25	3.125	3.125
ผักเหลียง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25
ข่ามะเรียง	25	>25	>25	>25	12.5	25	12.5	>25	25	>25
ผักกระถิน	25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	12.5	25
ผักก้านจอบ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	25	>25
พลองเหมือด	3.13	6.25	3.13	6.25	1.56	3.13	12.5	25	3.13	12.5
แจง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ผลมะมุด	>25	>25	>25	>25	12.5	>25	>25	>25	25	25
ดอกดาหลา	6.25	12.5	6.25	12.5	6.25	12.5	25	>25	6.25	12.5
ลูกเหริยาง	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ดอกโสน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ผักคราดหัว แหวน	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ดอกขจร	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
ผักมะะ	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25

ตารางที่ 7. ค่า MIC และ MBC (mg/mL) ของสารสกัดผักพื้นบ้านต่อเชื้อแบคทีเรีย *M. morganii*, *P. arenosus*, *A. junii*, และ *Myroides sp.*

สารสกัด	<i>M. morganii</i>		<i>A. junii</i>		<i>Myroides sp.</i>		<i>P. arenosus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
กระโดนน้ำ	1.562	6.25	> 25	> 25	1.562	6.25	1.562	6.25
ผักเหลียง	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
ส้มเมา	6.25	12.5	12.5	> 25	3.125	12.5	12.5	12.5
ข่ามะเรียง	12.5	25	25	25	12.5	25	12.5	25
จำปูน	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
พลองเหมือด	1.562	3.125	3.125	12.5	> 25	> 25	6.25	12.5

### 3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดผัก 3 ชนิด โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารที่ทำให้เกิดการอักเสบได้แก่ nitric oxide, TNF- $\alpha$  และ IL-6 ได้ผลการยับยั้งดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8. ผลการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide, TNF- $\alpha$  และ IL-6 ของสารสกัดผักพื้นบ้าน

สารสกัด	nitric oxide		TNF- $\alpha$		IL-6	
	nitrite ( $\mu\text{mol/L}$ )	% Inhibition	TNF- $\alpha$ (ng/ml)	% Inhibition	IL-6 (ng/ml)	% Inhibition
เสม็ดขุน	32.09	39.68	2163	34.02	1483	18.07
มันปู	32.25	39.37	2163	ND	1584	12.46
สมเ็ด	3.636	90.02	1450	20.37	640	67.63
Dexamethasone	19.95	62.50	1356	53.22	181	90.00

ND : ไม่สามารถประเมินได้

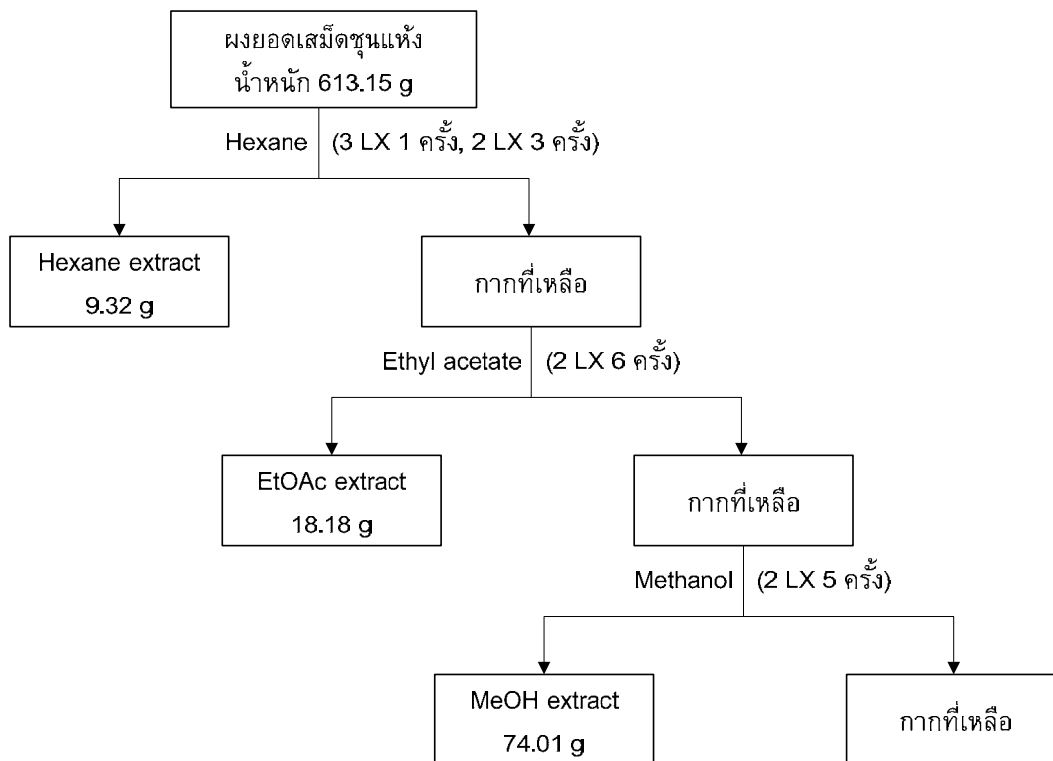
ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดผักทั้ง 3 ชนิดพบว่าสารสกัดสมเ็ดมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการหลั่ง nitric oxide และ IL-6 ได้ดีที่สุด โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง 90.02% และ 67.63% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเสม็ดขุนมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง TNF- $\alpha$  ได้ 34.02 % ซึ่งมากกว่าสารสกัดผักอีก 2 ชนิด

เนื่องจากสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 20 ชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหาร และก่อให้เกิดการแพ้ ดังนั้นการพิจารณาเลือกผักพื้นบ้านเพื่อนำมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะพิจารณาจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ต้านออกซิเดชัน และด้านการอักเสบเบื้องต้น ซึ่งพบว่าผักพื้นบ้านที่มีศักยภาพที่จะนำมาศึกษาต่อคือ เสม็ดขุน สมเ็ด มันปู กระโดนน้ำ และกระโดนบก เนื่องจากผักทั้ง 6 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านออกซิเดชันได้ดี และสารสกัดสมเ็ดยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยสามารถยับยั้งการหลั่ง nitric oxide และ IL-6 ได้ นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาสารสำคัญของต้นเสม็ดขุน และสมเ็ดมาก่อน จึงเลือกเสม็ดขุน และสมเ็ดมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์ต่อ

## บทที่ 4 การสกัดและแยกสารออกฤทธิ์จากยอดเสม็ดชุน (*Syzygium gratum*)

### 4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

สกัดผงยอดเสม็ดชุนน้ำหนัก 613.5 กรัม ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ด้วยวิธีการหมัก แต่ละครั้งห่างกันประมาณ 2-3 วัน สกัดจนหมดจดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอลตามลำดับ (รูปที่ 6) แล้วนำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดไปโดยการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และหลังจากทำให้แห้งมากขึ้นด้วยเครื่อง freeze dryer ได้ปริมาณและลักษณะสารสกัดแสดงดังตารางที่ 9



รูปที่ 6. ขั้นตอนการสกัดยอดเสม็ดชุนด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล

ตารางที่ 9. ปริมาณและลักษณะสารสกัดผักเสม็ดชุน และมันปูที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

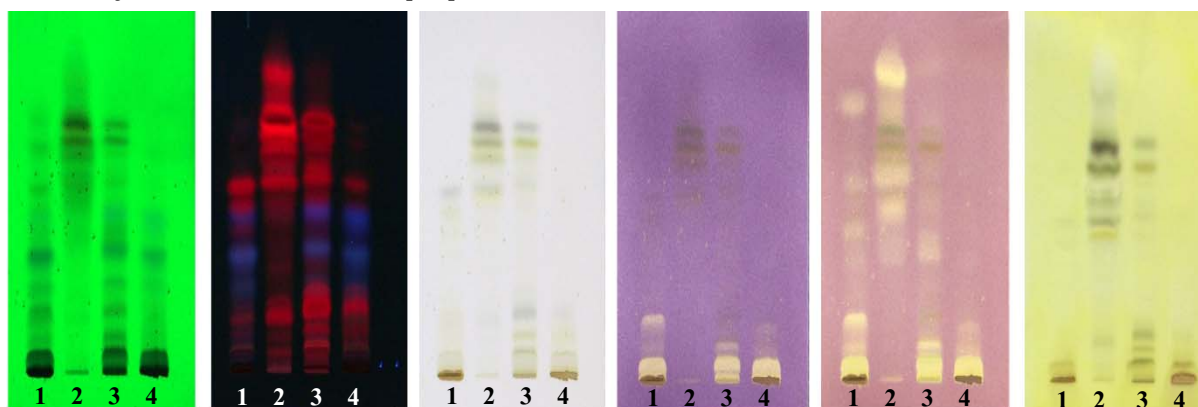
พืช	น้ำหนักพืชแห้ง (g)	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัด (g)	% yield	ลักษณะสารสกัด
เสม็ดชุน	613.15	เฮกเซน	9.32	1.52	ของแข็งสีเขียวน้ำตาล
		เอทิลอะซิเตต	18.18	2.97	ของแข็งสีเขียวน้ำตาล
		เมทานอล	74.01	12.07	ของแข็งสีน้ำตาล

### 4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

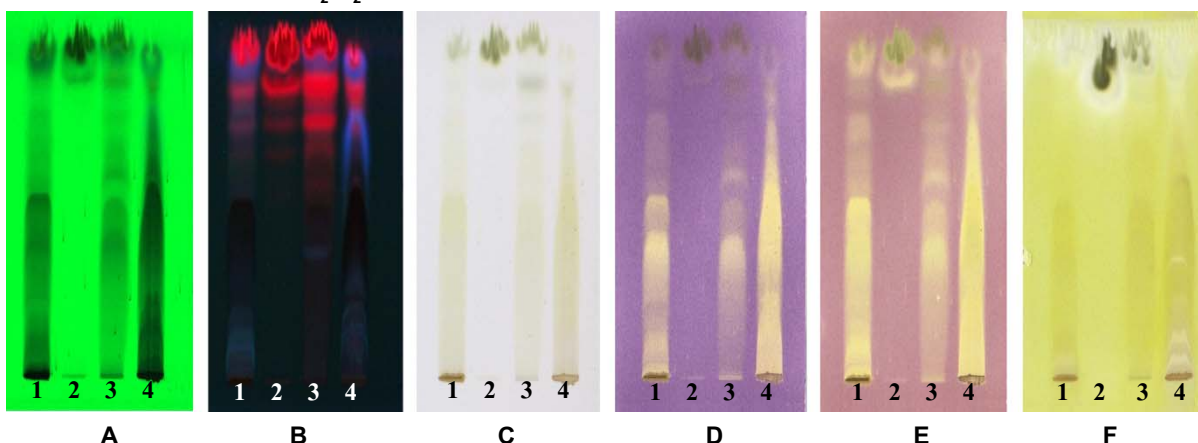
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดผักเสม็ดชุนด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดด้วยวิธี TLC โดยใช้สารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 50 mg/mL ปริมาตร 5  $\mu$ L ขีตปนัฏวักภาคค่งที่ค็อ Silica gel 60 F<sub>254</sub> ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเสม็ดชุนแสดงในรูปที่ 7

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ด้วยวิธี Ellman's method และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบเสม็ดชุนด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยทดสอบใน microplate (ทดสอบฤทธิ์โดยโครงการย่อยอื่น) และหาค่าร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ acetylcholinesterase และร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบเสม็ดชุนที่ความเข้มข้น 300  $\mu$ g/mL และ 50  $\mu$ g/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10

**Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]**



**Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [3:7]**



**รูปที่ 7.** TLC chromatogramsฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดของยอดเสม็ดชุน 1 = 80% MeOH extract, 2 = Hexane extract, 3 = EtOAc extract, 4 = MeOH extract, Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = Anti-DPPH at 0 hr, E = Anti-DPPH at 24 hr, F = Anti-AChE

**ตารางที่ 10.** ค่าร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์ acetylcholinesterase และอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดยอดเสม็ดชุน

สารสกัด ใบสมเล็ด	% inhibition ของเอนไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดใบสมเล็ด ที่ความเข้มข้น 300 µg/mL	% inhibition อนุมูลอิสระ DPPH ที่ ความเข้มข้น 50 µg/mL
เฮกเซน	*	7.20 ± 2.33
เอทิลอะซิเตต	*	68.68 ± 1.42
เมทานอล	61.90 ± 0.08	68.72 ± 0.32

\* ไม่สามารถหาค่าร้อยละการยับยั้งได้เนื่องจากมีปัญหาด้านการละลายของสารสกัด

จากรูปที่ 7 พบว่าสารสกัดยอดเสม็ดชุนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารที่มีขั้วสูงของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและเมทานอลมีฤทธิ์ดี โดยเปลี่ยนสีม่วงอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสีเหลืองทันที (รูป 7 D) ส่วนสารที่มีขั้วต่ำของสารสกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์น้อยกว่าเนื่องจากต้องใช้เวลาในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH นานกว่า (รูป 7 E) นอกจากนี้สารสกัดยอดเสม็ดชุนด้วยตัวทำละลายทุกชนิดยังแสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยปรากฏแถบสีขาวยบนแผ่น TLC (รูปที่ 7 F) การทดสอบด้วย microplate พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 300 µg/mL มีค่าร้อยละของการต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 61.90 ± 0.08 ส่วนสารสกัดด้วยเฮกเซน และเอทิลอะซิเตตไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากมีปัญหาด้านการละลาย สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และเมทานอลยังสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL

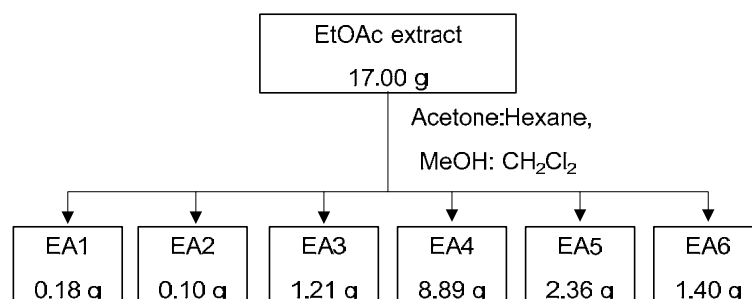
### 4.3 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี

สารสกัดด้วยตัวทำละลายทุกชนิดของเสม็ดชันแสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase นอกจากนี้ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและเมทานอลยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี จึงเลือกสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและเมทานอลมาทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

#### 4.3.1 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอทิลอะซิเตต

##### 4.3.1.1 การแยกสารสกัดเอทิลอะซิเตต

แยกสารสกัดเอทิลอะซิเตตของยอดเสม็ดชันน้ำหนัก 17.00 กรัม ด้วยวิธี quick column chromatography โดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 200 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Hexane, 5% Acetone : Hexane, 10% Acetone : Hexane, 20% Acetone : Hexane, 30% Acetone : Hexane, 40% Acetone : Hexane, 50% Acetone : Hexane, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> และ 100% MeOH อย่างละ 1 ลิตร ตามลำดับ หลังจากรวมส่วนของสารสกัด (fraction) ที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (EA1-EA6) ดังรูปที่ 8



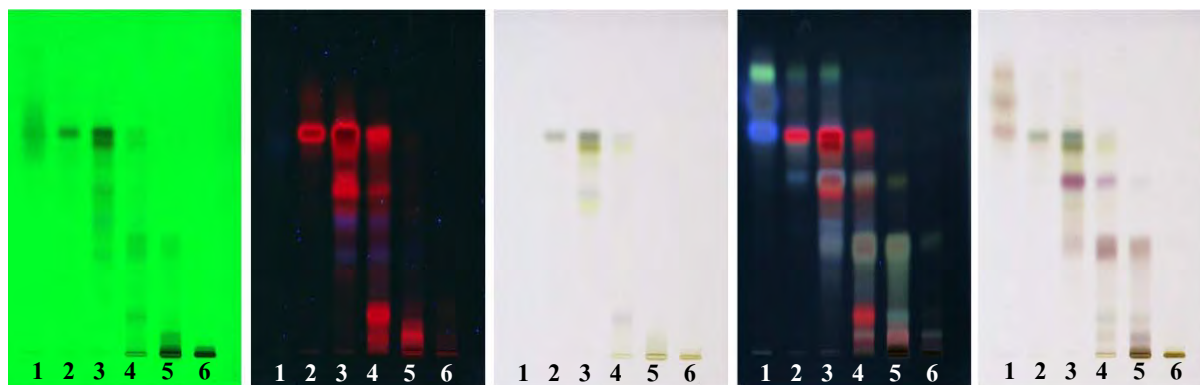
รูปที่ 8. การแยกสารของ EtOAc extract ของยอดเสม็ดชัน ด้วย quick column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EA1-EA6 แสดงในตารางที่ 11 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 9

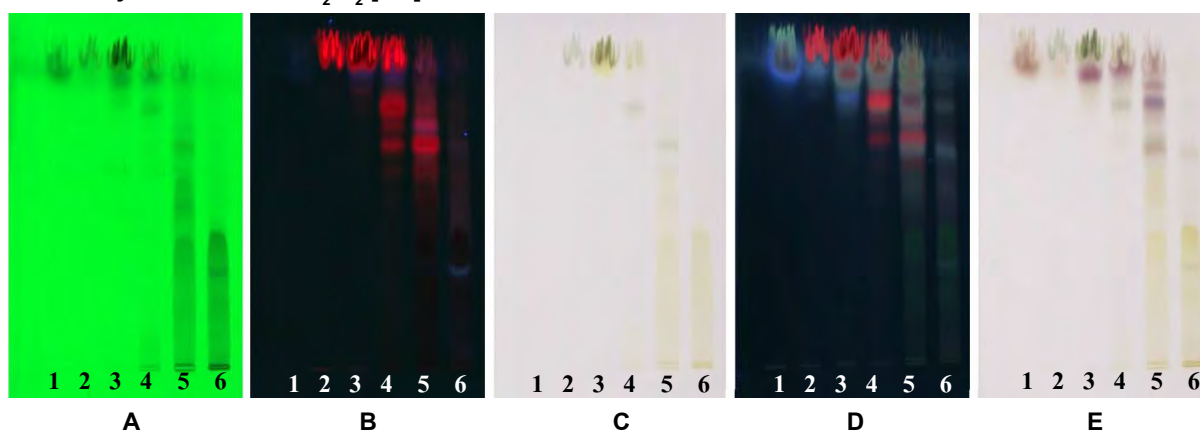
ตารางที่ 11. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EA1-EA6

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EA1	100% Hexane	0.18	ไขสีเหลืองอ่อน
EA2	5% Acetone : Hexane	0.10	สารหนืดสีเขียว
EA3	10-20% Acetone : Hexane	1.21	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EA4	30-50% Acetone : Hexane – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8.89	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EA5	10-15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.36	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EA6	20-70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	1.40	ของแข็งสีน้ำตาล

**Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]**



**Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [3:7]**



**รูปที่ 9.** TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EA1-EA6

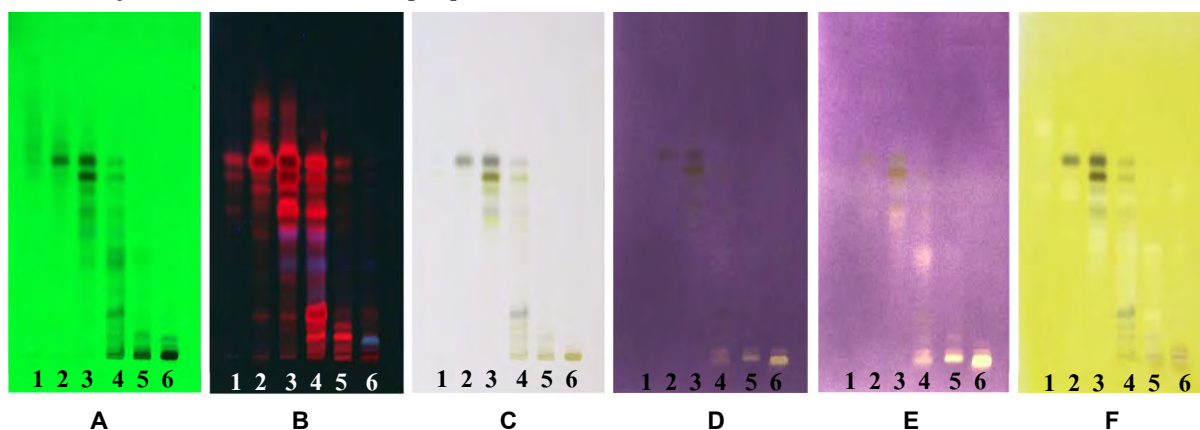
Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm, F = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### 4.3.1.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เบื้องต้นของส่วนของสารสกัดที่แยกจากสารสกัดเอทิลอะซิเตตของยอดเสม็ดชุน

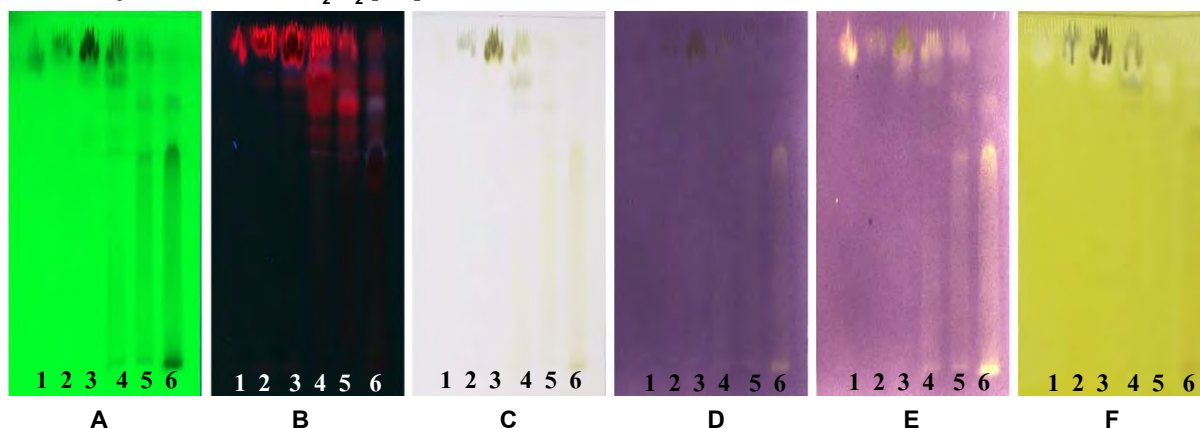
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด 6 fractions (EA1-EA6) ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตของยอดเสม็ดชุนด้วยวิธี TLC ดังแสดงในรูปที่ 10

**Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]**



**รูปที่ 10.** TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด EA1-EA, Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = Anti-DPPH at 0 hr, E = Anti-DPPH at 24 hr, F = Anti-AChE

Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [3:7]

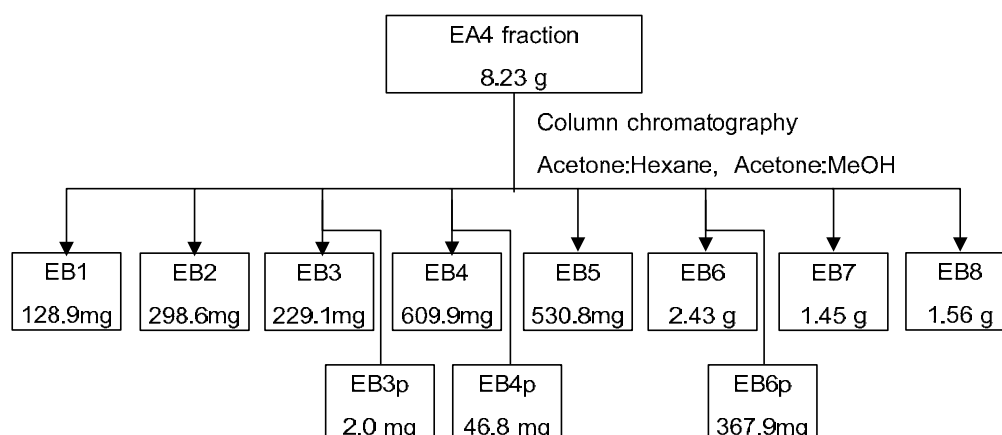


รูปที่ 10. (ต่อ) TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด EA1-EA, Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = Anti-DPPH at 0 hr, E = Anti-DPPH at 24 hr, F = Anti-AChE

จากรูปที่ 10 ส่วนของสารสกัดที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตของยอดเสม็ดชุนทั้ง 6 fractions มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยเฉพาะส่วนของสารสกัดที่มีขั้วสูงของส่วนของสารสกัดที่ 4, 5 และ 6 โดยเปลี่ยนสีม่วงอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสีเหลืองทันที (รูป 10 D) และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้น (รูป 10 E) นอกจากนี้ส่วนของสารสกัดทั้ง 6 fractions โดยเฉพาะส่วนของสารสกัดที่ EA3, EA4 และ EA5 ยังแสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยปรากฏแถบสีขาวบนแผ่น TLC (รูปที่ 10 F)

#### 4.3.1.3 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-A4 (EA4)

แยกส่วนของสารสกัด EA4 น้ำหนัก 8.23 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 500 g) และใช้วัฏภาคภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (1 L), 3% Acetone : Hexane (1 L), 5% Acetone : Hexane (1L), 10% Acetone : Hexane (2 L), 15% Acetone : Hexane (3.5 L), 20% Acetone : Hexane (5 L), 25% Acetone : Hexane (4 L), 30% Acetone : Hexane (2 L), 50% Acetone : Hexane (3 L), 70% Acetone : Hexane (1 L), 100% Acetone (1 L), 30% MeOH : Acetone (1 L), 50% MeOH : Acetone (1 L), 100% MeOH (1 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัด (fraction) ที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (EB1-EB8) และแยกตะกอนได้จากส่วนของสารสกัด EB3, EB4 และ EB6 (EB3p, EB4p และ EB6p) ดังรูปที่ 11



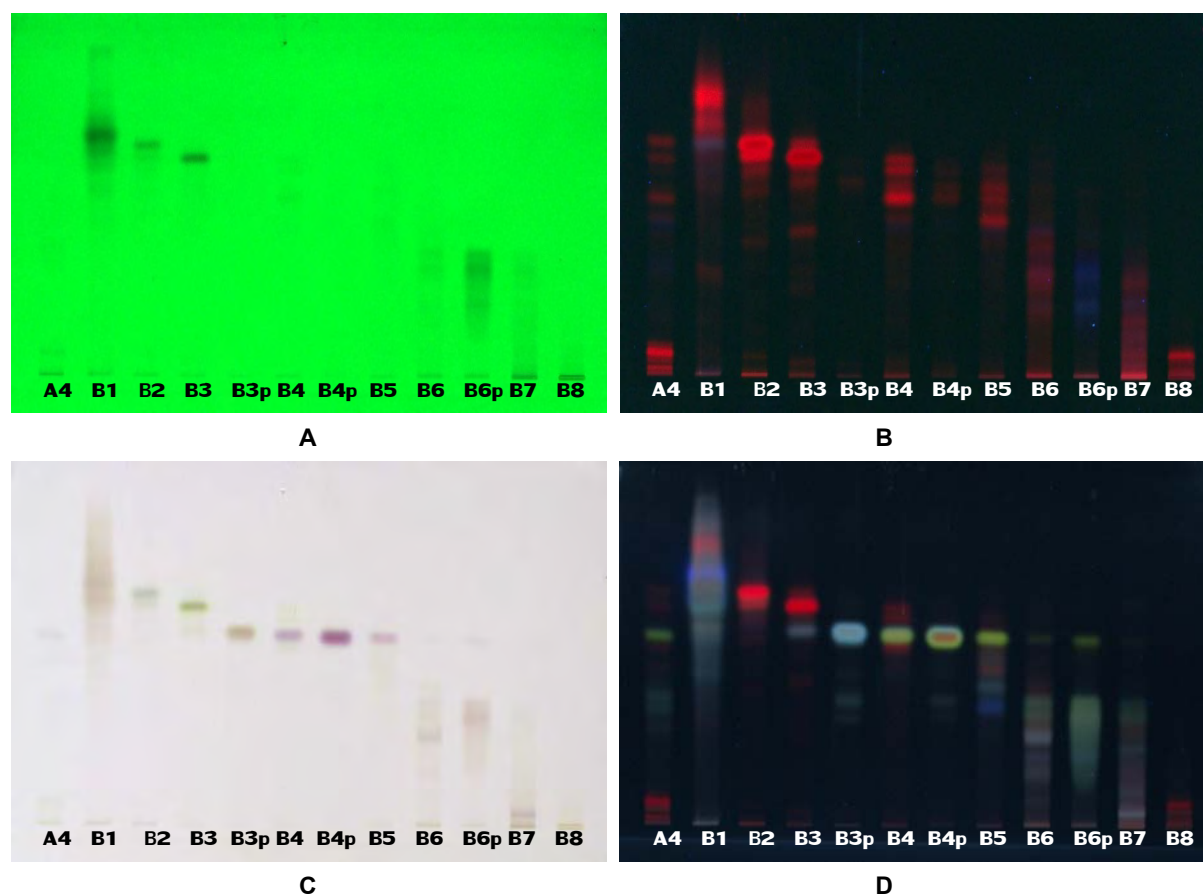
รูปที่ 11. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-A4 ด้วย column chromatography



ตารางที่ 12. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EB1-EB8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EB1	100% Hexane 600 mL	0.1289	ของแข็งสีเขียวอ่อน
EB2	100% Hexane 0.4 L – 10% Acetone : Hexane 0.1 L	0.2986	สารหนืดสีดำ
EB3	10% Acetone : Hexane 1 L	0.2291	สารหนืดสีดำ
EB3p	10% Acetone : Hexane 1 L	0.0020	ของแข็งสีเขียวอ่อน
EB4	10% Acetone : Hexane 0.9 L - 15% Acetone : Hexane 1.9 L	0.6099	สารหนืดสีเขียวเข้ม
EB4p	10% Acetone : Hexane 0.9 L - 15% Acetone : Hexane 1.9 L	0.0468	ของแข็งสีขาว
EB5	15% Acetone : Hexane 1.6 L - 20% Acetone : Hexane 3.1 L	0.5308	สารหนืดสีเขียวเข้ม
EB6	20% Acetone : Hexane 1.9 L - 50% Acetone : Hexane 0.7 L	2.4266	ผงสีเขียวเข้ม
EB6p	20% Acetone : Hexane 1.9 L - 50% Acetone : Hexane 0.7 L	0.3679	ของแข็งสีเขียวย่อมน
EB7	50% Acetone : Hexane 2.3 L - 30% MeOH : Acetone 0.3 L	1.45	ของแข็งสีเขียว
EB8	30% MeOH : Acetone 0.7 L - 100% MeOH 1 L	1.56	สารหนืดสีเขียวเข้ม

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EB1-EB8 และตะกอน EB3p, EB4p และ EB6p แสดงในตารางที่ 12 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 12



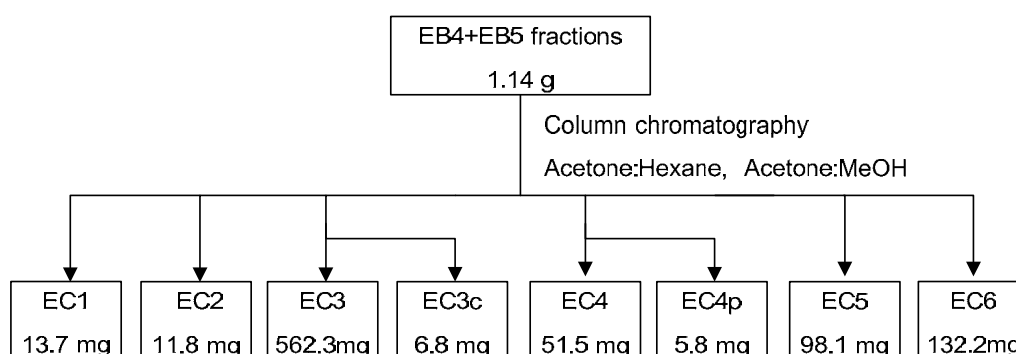
รูปที่ 12. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EB1-EB8

Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.4 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-B4 และ B5 (EB4+EB5)

นำส่วนของสารสกัดที่ EB4 และ EB5 ที่น่าจะมีสารออกฤทธิ์ชนิดเดียวกัน น้ำหนักรวม 1.14 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคกรองที่เป็น silica gel (Grade 7734, pore size 100<sup>o</sup>A, 70-230 mesh, 70 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (200 mL), 5% Acetone : Hexane (200 mL), 10% Acetone : Hexane (400 mL), 15% Acetone : Hexane (400 mL), 20% Acetone : Hexane (400 mL), 25% Acetone : Hexane (200 mL), 30% Acetone : Hexane (100 mL), 50% Acetone : Hexane (100 mL), 70% Acetone : Hexane (100 mL), 100% Acetone (100 mL), 30% MeOH : Acetone (200 mL), 50% MeOH : Acetone (100 mL), 100% MeOH (200 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (EC1-EC6) และแยกผลึกได้จากส่วนของสารสกัด EC3 (EC3c) และแยกตะกอนได้จากส่วนของสารสกัด EC4 (EC4p) ดังรูปที่ 13



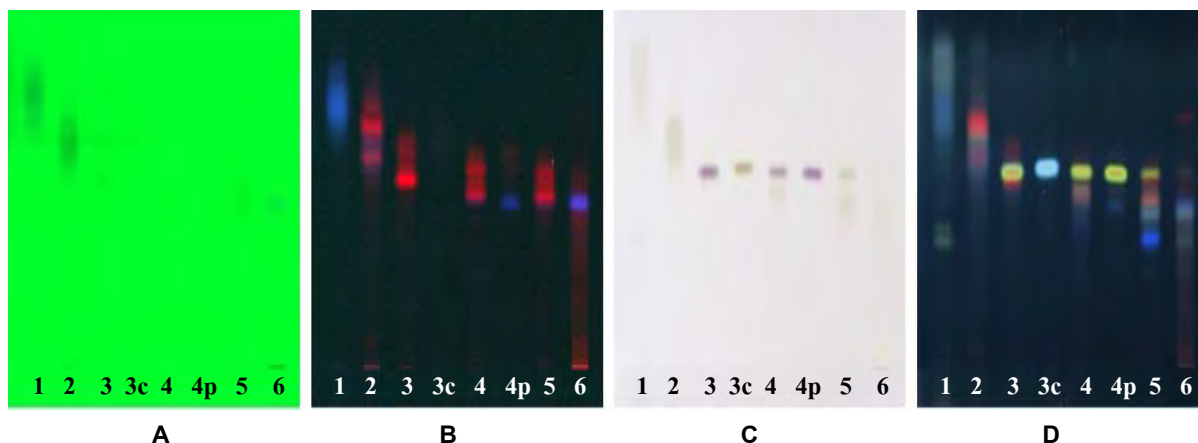
รูปที่ 13. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EB4 และ EB5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EC1-EC6 ผลึก EC3c และตะกอน EC4p แสดงในตารางที่ 13 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions ผลึกและตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 14 และการเปรียบเทียบลักษณะ TLC ของ EB3c และ EC3c ดังรูปที่ 15

จาก TLC chromatograms พบว่าตะกอน EB3p และผลึก EC3c มีลักษณะของ TLC เหมือนกัน มีค่า R<sub>f</sub> เท่ากัน (รูปที่ 15) และมีความบริสุทธิ์จึงให้เป็น compound 1

ตารางที่ 13. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EC1-EC6

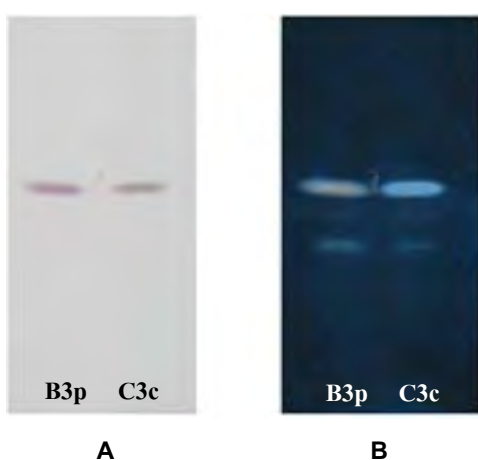
Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EC1	100% Hexane 0.2 L - 10% Acetone : Hexane 0.15 L	0.0137	สารหนืดสีเขียว
EC2	10% Acetone : Hexane 0.25 L - 15% Acetone : Hexane 0.15 L	0.0118	สารหนืดสีน้ำตาล
EC3	15% Acetone : Hexane 0.25 L - 20% Acetone : Hexane 0.3 L	0.5623	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EC3c	15% Acetone : Hexane 0.25 L - 20% Acetone : Hexane 0.3 L	0.0068	ผลึกสีขาว
EC4	20% Acetone : Hexane 0.1 L	0.0515	สารสีเขียวยาว
EC4p	20% Acetone : Hexane 0.1 L	0.0058	สารสีเหลืองอ่อน
EC5	25% Acetone : Hexane 0.2 L - 30% Acetone : Hexane 0.05 L	0.0981	สารสีเขียวยาว
EC6	30% Acetone : Hexane 0.05 L - 100% MeOH 0.1 L	132.2	สารสีน้ำตาลเข้ม



รูปที่ 14. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EC1-EC6

Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



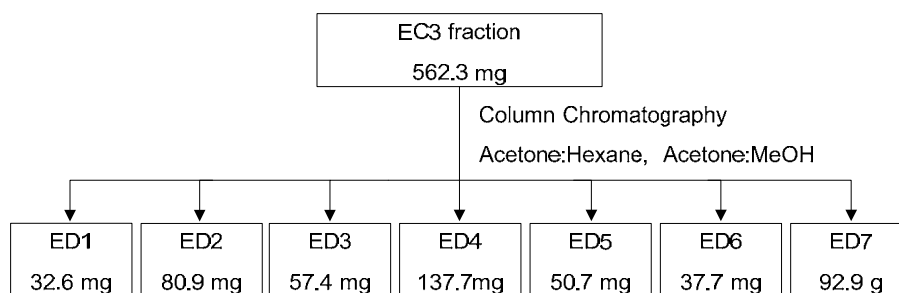
รูปที่ 15. TLC chromatograms ของ EB3p และ EC3c

Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]

Detector : A = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, B = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.5 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-C3 (EC3)

นำส่วนของสารสกัด EC3 น้ำหนัก 0.5623 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, pore size 100<sup>o</sup>A, 70-230 mesh, 80 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (400 mL), 1% Acetone : Hexane (400 mL), 5% Acetone : Hexane (700 mL), 7% Acetone : Hexane (1.4 L), 10% Acetone : Hexane (1.2 L), 15% Acetone : Hexane (400 mL), 20% Acetone : Hexane (300 mL), 30% Acetone : Hexane (300 mL), 40% Acetone : Hexane (300 mL), 50% Acetone : Hexane (300 mL), 60% Acetone : Hexane (300 mL), 70% Acetone : Hexane (300 mL), 90% Acetone : Hexane (300 mL), 100% Acetone (400 mL), 30% MeOH : Acetone (400 mL), 50% MeOH : Acetone (400 mL), 70% MeOH : Acetone (400 mL) และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (ED1-ED7) ดังรูปที่ 16

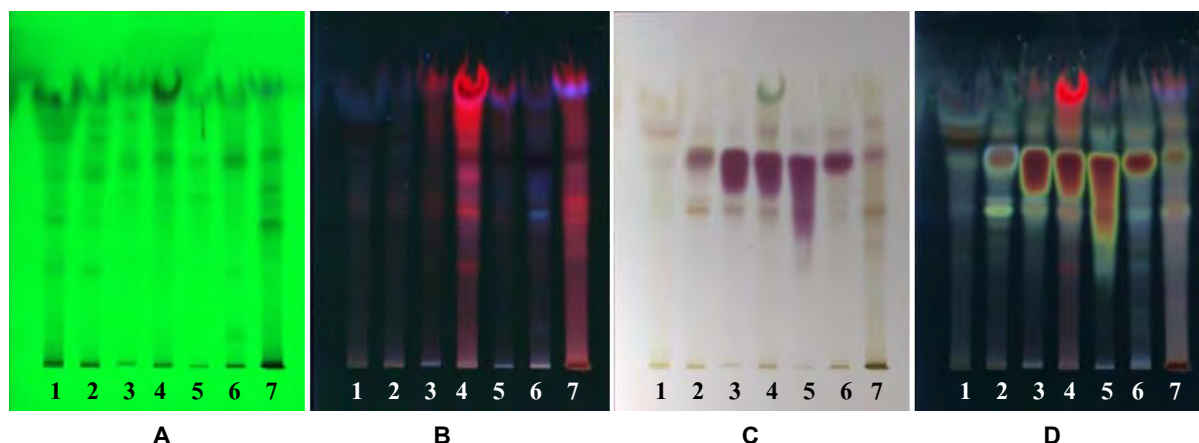


รูปที่ 16. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-C3 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด ED1-ED7 แสดงในตารางที่ 14 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions ที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 17

ตารางที่ 14. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction ED1-ED7

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
ED1	100% Hexane – 7% Acetone : Hexane	0.0326	สารสีเหลืองอมส้ม
ED2	10% Acetone : Hexane 380 mL	0.0809	ของแข็งสีส้ม
ED3	10% Acetone : Hexane 120 mL	0.0574	ของแข็งสีขาวอมเขียว
ED4	10% Acetone : Hexane 350 mL	0.1377	ของแข็งสีเขียว
ED5	10% Acetone : Hexane 450 mL – 15% Acetone : Hexane	0.0507	ของแข็งสีขาวอมเขียว
ED6	20% Acetone : Hexane – 30% Acetone : Hexane	0.0377	ของแข็งสีขาวอมเขียว
ED7	40% Acetone : Hexane – 100% MeOH	0.0929	สารสีเขียวเข้ม



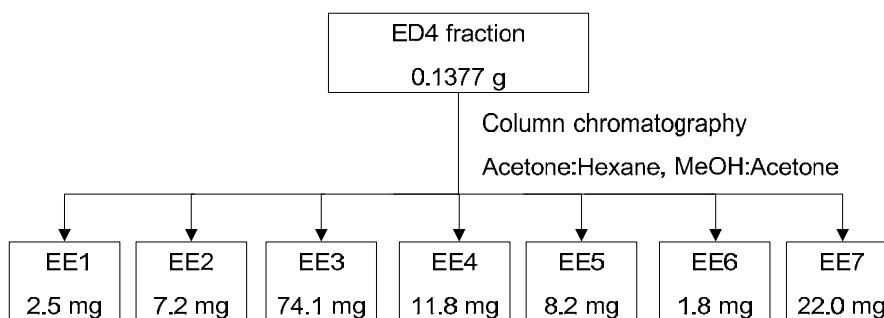
รูปที่ 17. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด ED1-ED7

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.6 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-D4 (ED4)

แยกส่วนของสารสกัด ED4 น้ำหนัก 0.1377 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 30 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (100 mL), 5% Acetone : Hexane (200 mL), 7% Acetone : Hexane (300 mL), 10% Acetone : Hexane (800 mL), 15% Acetone : Hexane (300 mL), 20% Acetone : Hexane, 30% Acetone : Hexane, 50% Acetone : Hexane, 70% Acetone : Hexane, 90% Acetone : Hexane, 100% Acetone, 50% MeOH : Acetone อย่างละ 200 mL และ 100% MeOH (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (EE1-EE7) ดังรูปที่ 18

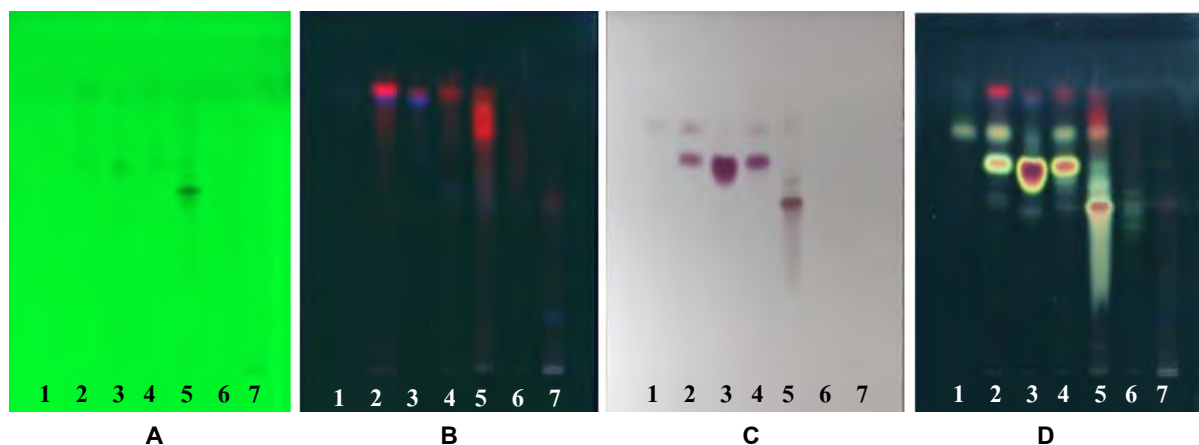


รูปที่ 18. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-D4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EE1-EE7 แสดงในตารางที่ 15 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 19

ตารางที่ 15. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EE1-EE7

Fraction	ภูมิภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EE1	100% Hexane – 7% Acetone : Hexane	0.0025	ของแข็งสีขาวอ่อน
EE2	10% Acetone : Hexane 200 mL	0.0072	ของแข็งสีขาว
EE3	10% Acetone : Hexane 400 mL	0.0741	ผงสีขาว
EE4	10% Acetone : Hexane 0.2 L – 20% Acetone : Hexane	0.0118	ของแข็งสีขาว
EE5	30% Acetone : Hexane	0.0082	ของแข็งสีขาวอ่อน
EE6	50% Acetone : Hexane	0.0018	ของแข็งสีขาว
EE7	70% Acetone : Hexane – 100% MeOH	0.0220	ของแข็งสีขาวเหลือง



รูปที่ 19. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EE1-EE7

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

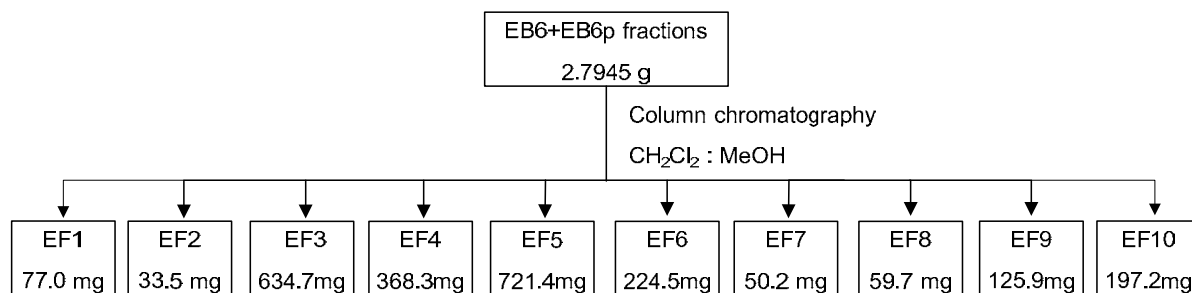
Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

ส่วนของสารสกัด EE3 น้ำหนัก 74.1 มิลลิกรัม นำมาล้างผลึกใหม่ได้สารบริสุทธิ์ที่มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก จึงให้เป็น compound 2

#### 4.3.1.7 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของของส่วนของสารสกัด EtOAc-B6 และ EtOAc-B6p

##### (EB6+EB6p)

นำส่วนของสารสกัดที่ EB6 และ EB6p น้ำหนักรวม 2.7945 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคกรองที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 80 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400 mL), 3% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (750 mL), 5% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (800 mL), 10% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 mL), 15% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 mL), 20% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 mL), 25% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (600 mL), 30% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL), 40% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL), 50% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL), 70% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL), 90% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL), 100% MeOH (800 mL) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 10 fractions (EF1-EF10) ดังรูปที่ 20

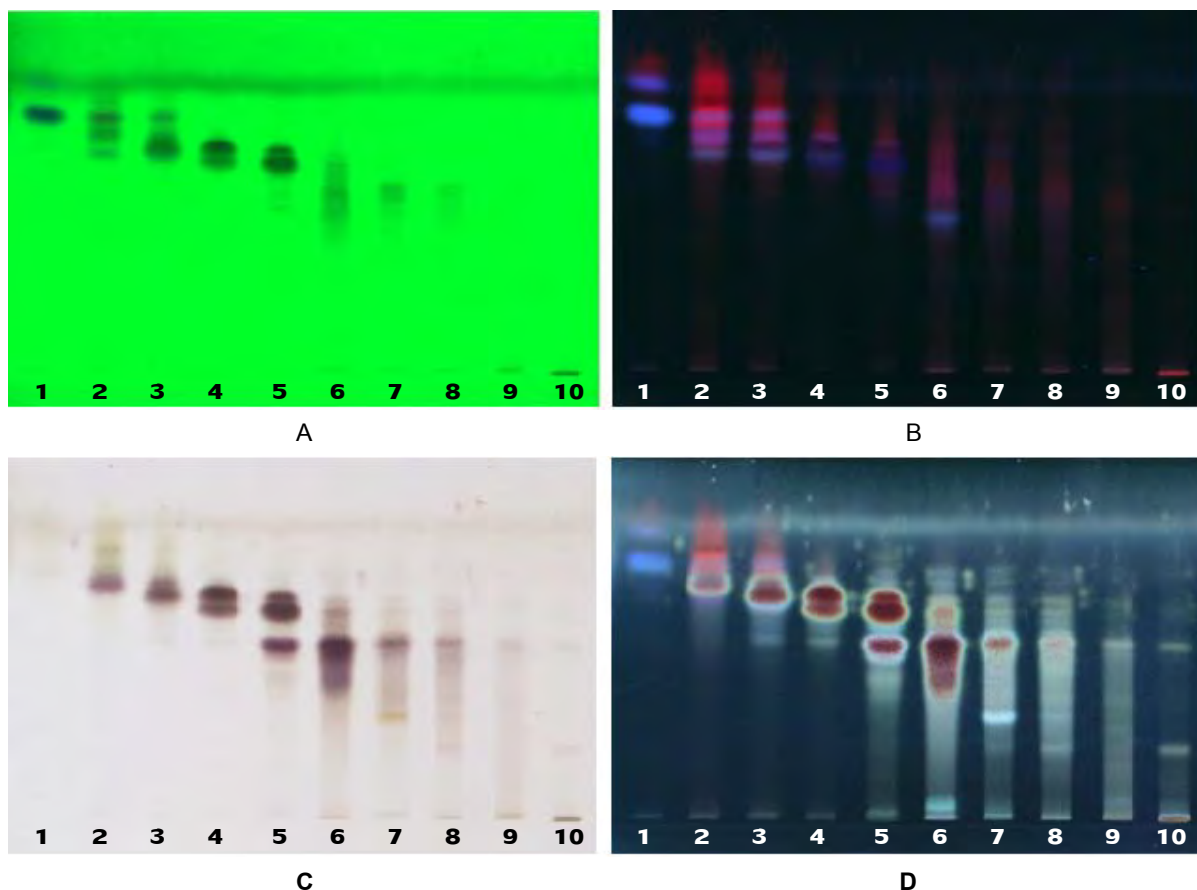


รูปที่ 20. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-B6 และ B6p ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EF1-EF10 แสดงในตารางที่ 16 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 10 fractions ผลึกและตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 21

ตารางที่ 16. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EF1-EF10

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสารสกัด
EF1	100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 400 mL – 3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 60 mL	0.0770	ผงสีเขียว
EF2	3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 90 mL	0.0335	ผงสีเขียวเข้ม
EF3	3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 90 mL	0.6347	สารสีเขียว
EF4	3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 120 mL	0.3683	สารสีเขียว
EF5	3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 390 mL	0.7214	ของแข็งสีขาวปนเขียว
EF6	5% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 570 mL	0.2245	ของแข็งสารสีเขียวเข้ม
EF7	5% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 230 mL – 7% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 110 mL	0.0502	ผงสีเขียวย่อน
EF8	7% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 110 mL	0.0597	สารสีเขียว
EF9	10% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 500 mL – 25% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 600 mL	0.1259	สารสีเขียว
EF10	30% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 300 mL – 100% MeOH 800 mL	0.1972	สารสีเขียวเข้ม



รูปที่ 21. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EF1-EF10

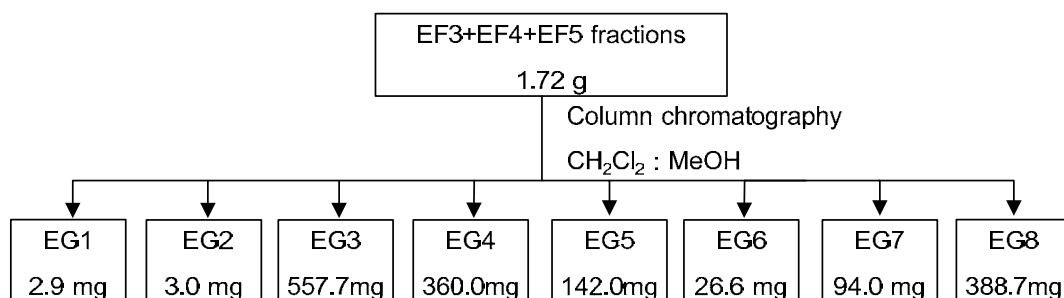
Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.8 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-F3, F4 และ F5

##### (EF3+EF4+EF5)

นำส่วนของสารสกัดที่ EF3, EF4 และ EF5 น้ำหนักรวม 1.7244 กรัม มาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7736, 35-70 mesh, 52 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 1% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (400 mL), 3% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (200 mL), 5% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (200 mL), 10% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (200 mL), 15% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (200 mL), 20% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (200 mL), 30% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (200 mL), 40% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (100 mL), 50% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (100 mL), 60% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (100 mL), 70% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (100 mL), 90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (100 mL), 100% MeOH (500 mL) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (EG1-EG8) ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-F3, F4 และ F5 ด้วย column chromatography

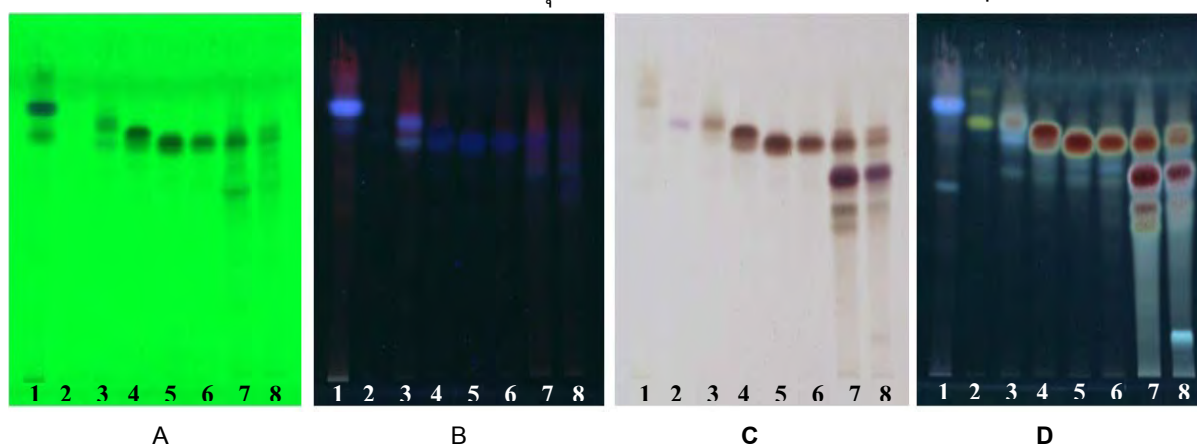


น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EG1-EG8 แสดงในตารางที่ 17 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions ผลึกและตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 23

ตารางที่ 17. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EG1-EG8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสารสกัด
EG1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL – 1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 400 mL	2.9	ผงสีเขียวน้ำตาล
EG2	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL	3.0	ผงสีขาวปนเขียว
EG3	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	557.7	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EG4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 25 mL	360.0	ผงสีขาวปนเขียว
EG5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	142.0	ผงสีขาวปนเขียว
EG6	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	26.6	ผงสีขาวปนเขียว
EG7	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 25 mL	94.0	ผงสีเขียวอ่อน
EG8	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL – 100% MeOH 500 mL	388.7	ของแข็งสีเขียวเข้ม

ส่วนของสารสกัด EG5 และ EG6 น้ำหนัก 142.0 มิลลิกรัม และ 26.6 มิลลิกรัม ตามลำดับ นำมาตกผลึกใหม่ด้วย methanol และ dichloromethane ได้สารบริสุทธิ์ที่มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว จึงให้เป็น compound 3



รูปที่ 23. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EG1-EG8

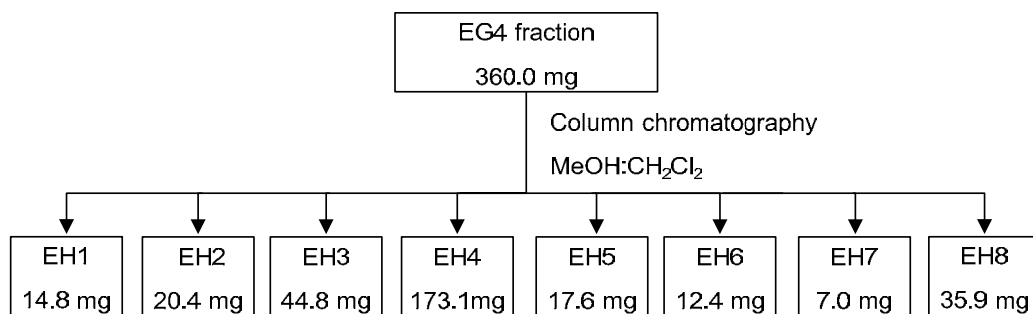
Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.9 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-G4 (EG4)

นำส่วนของสารสกัด EG4 น้ำหนัก 360.0 มิลลิกรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, pore size 100<sup>o</sup>A, 70-230 mesh, 55 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (EH1-EH8) ดังรูปที่ 24



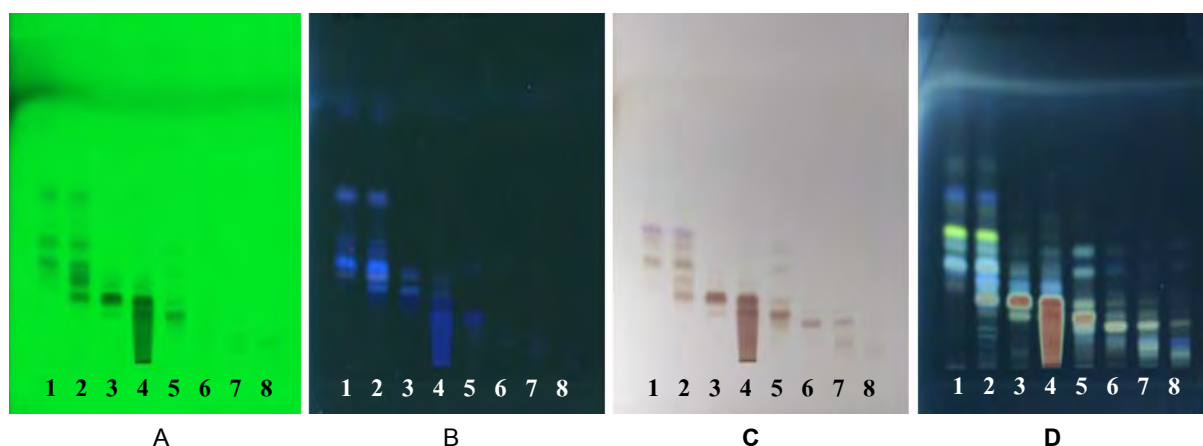


รูปที่ 24. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-G4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EH1-EH8 แสดงในตารางที่ 18 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions ผลึกและตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 25

ตารางที่ 18. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EH1-EH8

Fraction	วิฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสารสกัด
EH1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL – 3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL	14.8	ของแข็งสีขาว
EH2	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	20.4	ของแข็งสีขาว
EH3	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	44.8	ของแข็งสีขาว
EH4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	173.1	ของแข็งสีขาว
EH5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	17.6	ของแข็งสีขาว
EH6	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL	12.4	ของแข็งสีขาว
EH7	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	7.0	ของแข็งสีขาว
EH8	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL – 100% MeOH 500 mL	35.9	ของแข็งสีขาว



รูปที่ 25. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EH1-EH8

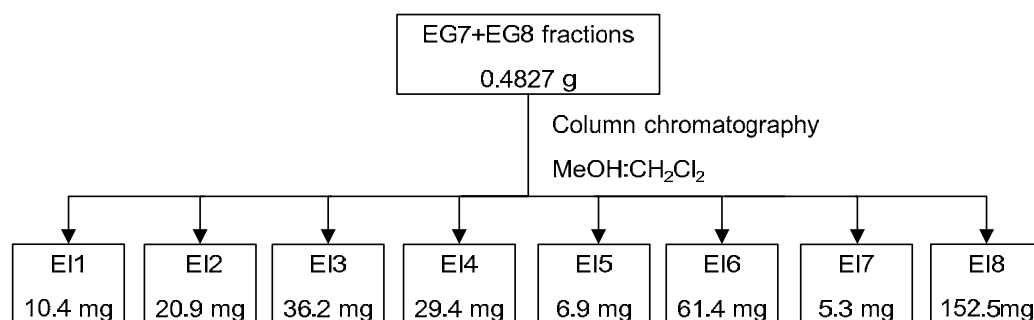
Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.10 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-G7+EG8 (EG7+EG8)

นำส่วนของสารสกัด EG7 น้ำหนัก 0.0940 กรัม และ EG8 น้ำหนัก 0.3887 กรัม มาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, pore size 100<sup>o</sup>A, 70-230 mesh, 55 g)

และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL), 1% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL), 5% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 7% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 15% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 30% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 50% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 70% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  อย่างละ 200 mL และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวม ส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (EI1-EI8) ดังรูปที่ 26

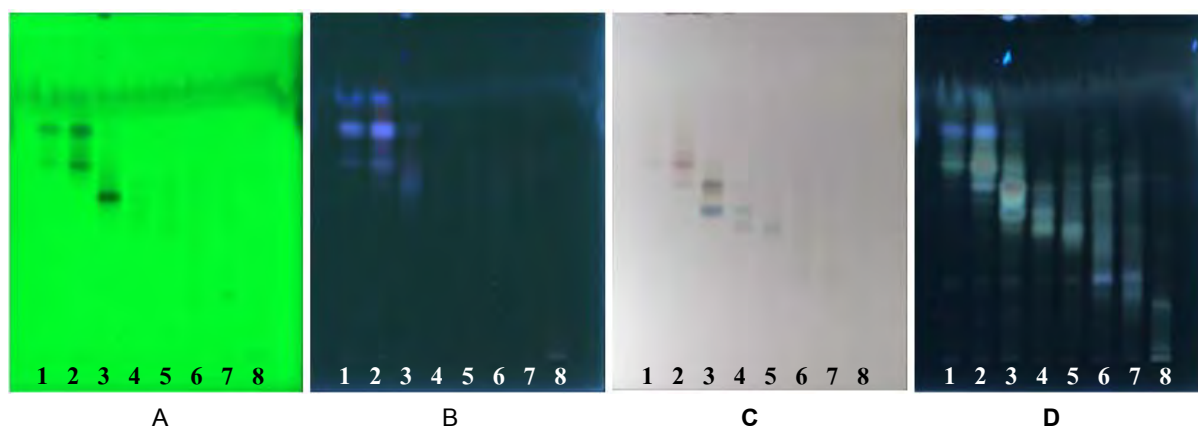


รูปที่ 26. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-G7 และ G8 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของ สารสกัด EI1-EI8 แสดงในตารางที่ 19 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions ที่ แยกได้ แสดงดังรูปที่ 27

ตารางที่ 19. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EI1-EI8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก(mg)	ลักษณะสารสกัด
EI1	100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ – 7% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL	0.0104	ของแข็งสีขาว
EI2	7% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 100 mL	0.0209	ของแข็งสีขาว
EI3	7% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL	0.0362	ของแข็งสีขาว
EI4	10% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL	0.0294	ของแข็งสีขาว
EI5	10% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 100 mL	0.0069	ของแข็งสีขาว
EI6	10% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL	0.0614	ของแข็งสีขาว
EI7	15% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL	0.0053	ของแข็งสีขาว
EI8	15% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 150 mL – 100% MeOH	0.1525	ของแข็งสีเหลือง



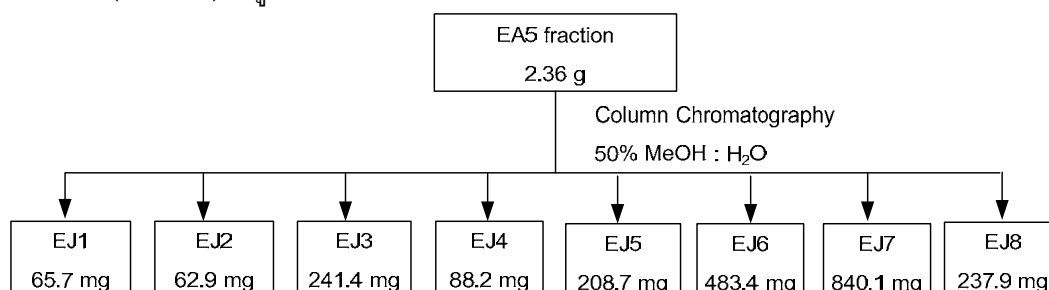
รูปที่ 27. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EI1-EI8

Solvent system : MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , D = 30%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  / UV 366 nm

#### 4.3.1.11 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-A5 (EA5)

นำส่วนของสารสกัด EA5 น้ำหนัก 2.36 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคองที่เป็น silica gel (Grade 7734, pore size 100<sup>o</sup>A, 70-230 mesh, 80 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.4 L), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (900 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.4 L), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 60% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 80% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) และ 100% MeOH (1.7 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (EJ1-EJ8) ดังรูปที่ 28

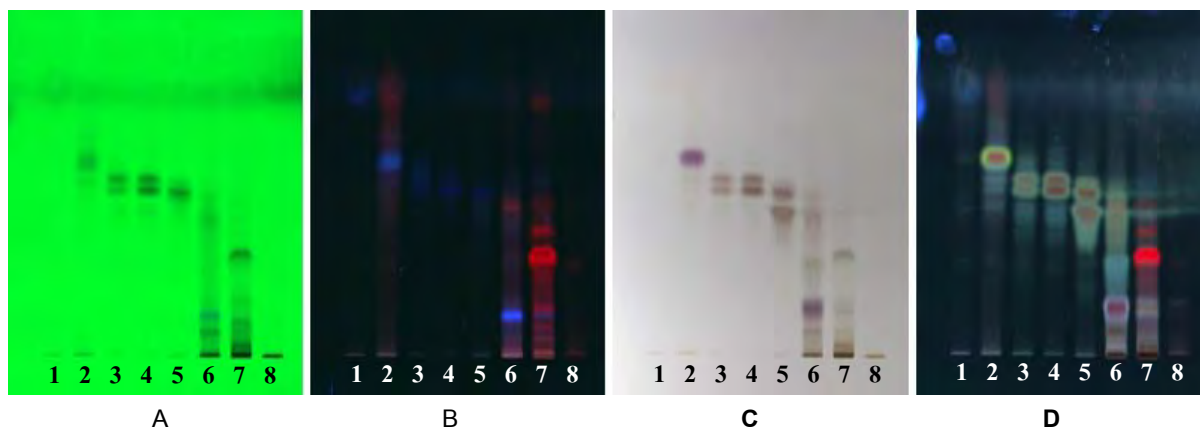


รูปที่ 28. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-A5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EJ1-EJ8 แสดงในตารางที่ 20 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions ที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 29

ตารางที่ 20. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EJ1-EJ8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
EJ1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	65.7	ของแข็งสีเขียวย่อ
EJ2	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 300 mL	62.9	ของแข็งสีเขียว
EJ3	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	241.4	ของแข็งสีขาวอมเขียว
EJ4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	88.2	ของแข็งสีขาว
EJ5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 750 mL	208.7	ของแข็งสีขาวปนเขียว
EJ6	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 750 mL	483.4	ของแข็งสีเขียวอมน้ำตาล
EJ7	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 650 mL – 30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	840.1	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EJ8	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	237.9	ของแข็งสีน้ำตาลอมเขียว



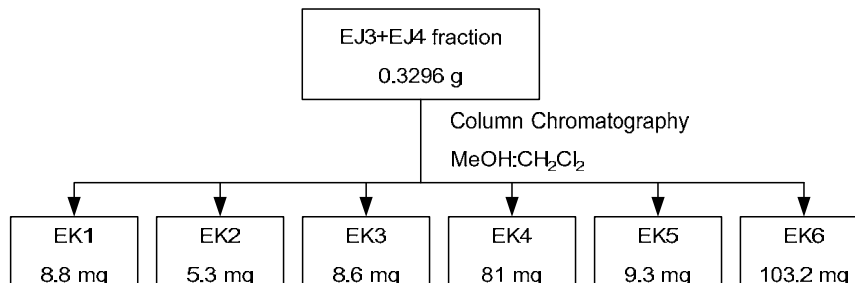
รูปที่ 29. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EJ1-EJ8

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.12 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-J3 และ J4 (EJ3+EJ4)

นำส่วนของสารสกัด EJ3 น้ำหนัก 0.2414 กรัม และสารสกัด EJ4 น้ำหนัก 0.0882 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63µm, 230-400 mesh, 80.16g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1200 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> , 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ,90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (EK1-EK6) ดังรูปที่ 30

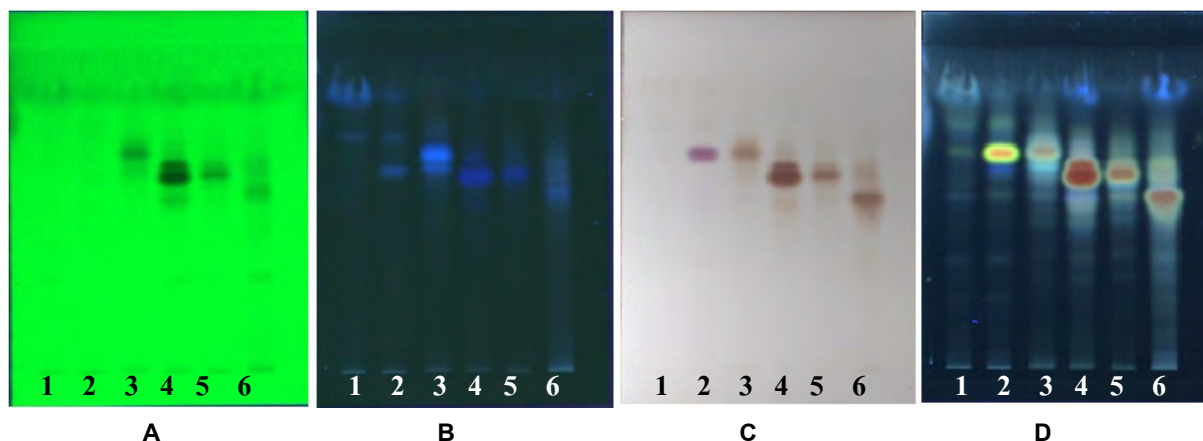


รูปที่ 30. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-J3 และ J4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EK1-EK6 แสดงในตารางที่ 21 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 31

ตารางที่ 21. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EK1-EK6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EK1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L	0.0088	สารผงสีขาวอมเขียว
EK2	1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	0.0053	สารผงสีขาวอมเขียว
EK3	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	0.0086	สารผงสีขาวอมเขียว
EK4	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.4 L	0.0810	สารผงสีขาวอมเขียว
EK5	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.4 L	0.0093	สารผงสีขาวอมเขียว
EK6	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.4 L – 100% MeOH	0.1032	สารผงสีขาวอมเขียว



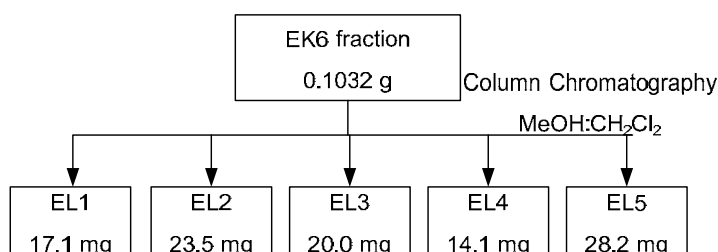
รูปที่ 31. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EK1-EK6

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.13 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-K6

นำส่วนของสารสกัด EK6 น้ำหนัก 0.1032 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63 µm, 230-400 mesh, 80.16 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1200 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (EL1-EL5) ดังรูปที่ 32



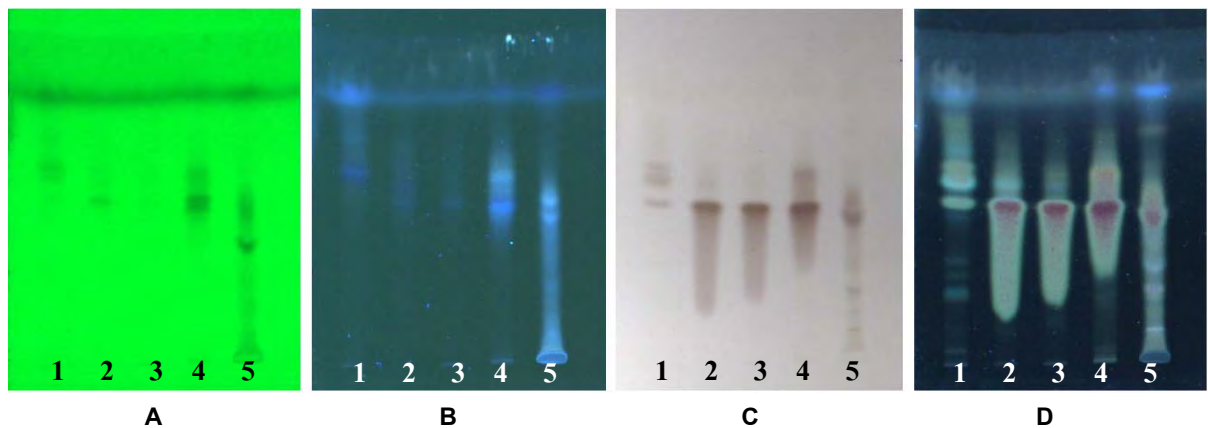
รูปที่ 32. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-K6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EL1-EL5 แสดงในตารางที่ 22 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 33

สาร EL2 และ EL 3 นำมาตกผลึกใหม่มีลักษณะเป็นผงสีขาว ให้เป็น compound 4

ตารางที่ 22. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EL1-EL5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
EL1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L	17.1	สารสีขาวอมเขียว
EL2	1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	23.5	ผงสีขาว
EL3	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	20.0	ผงสีขาว
EL4	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.4 L	14.1	ผงสีขาวอมเขียว
EL5	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.4 L	28.2	ผงสีขาวอมเขียว



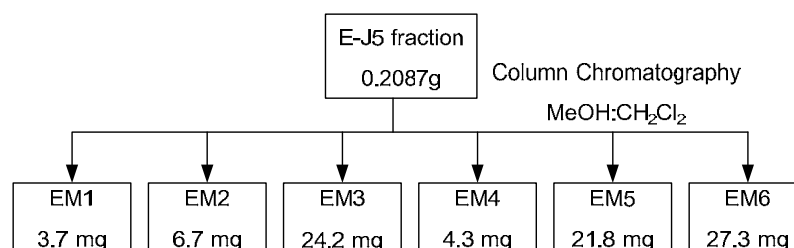
รูปที่ 33. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EL1-EL5

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.14 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-J5

นำส่วนของสารสกัด EJ5 น้ำหนัก 0.2087 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63  $\mu$ m, 230-400 mesh, 70.64 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 5% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 10% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 15% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 10% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3000 mL), 20% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 25% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 100% EtOAc, 70% EtOAc : MeOH, 50% EtOAc : MeOH, 30% EtOAc : MeOH และ 100% MeOH อย่างละ 300 mL หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (EM1-EM6) ดังรูปที่ 34

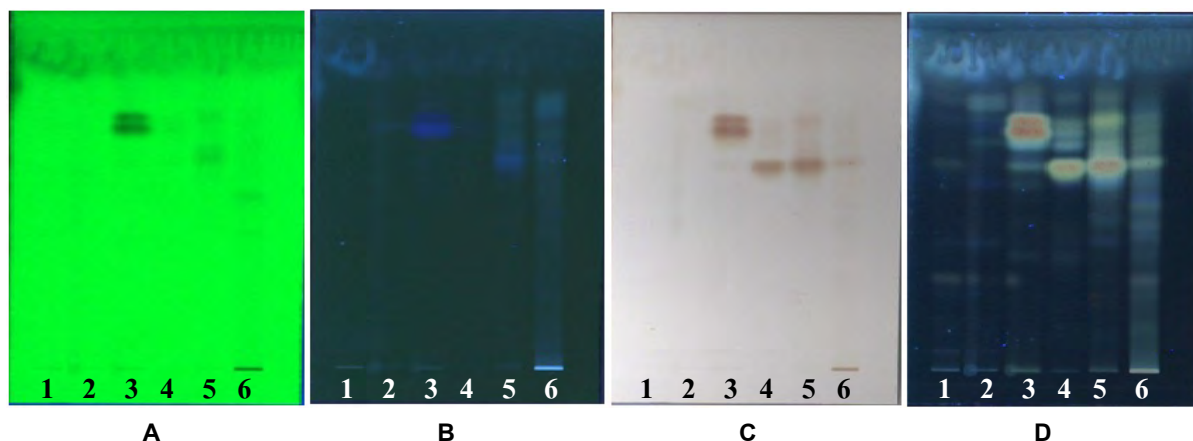


รูปที่ 34. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-F5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EM1-EM6 แสดงในตารางที่ 23 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 35

ตารางที่ 23. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EM1-EM6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EM1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 10% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0037	สารผงสีขาวขุ่น
EM2	10% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.7 L	0.0067	สารผงสีขาวขุ่น
EM3	15% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 20% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2 L	0.0242	สารผงสีขาวขุ่น
EM4	20% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1L – 30% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0043	สารผงสีขาวขุ่น
EM5	60% EtOAc: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% EtOAc	0.0218	สารผงสีขาวขุ่น
EM6	70% EtOAc : MeOH – 100% MeOH	0.0273	สารผงสีเหลืองอ่อน



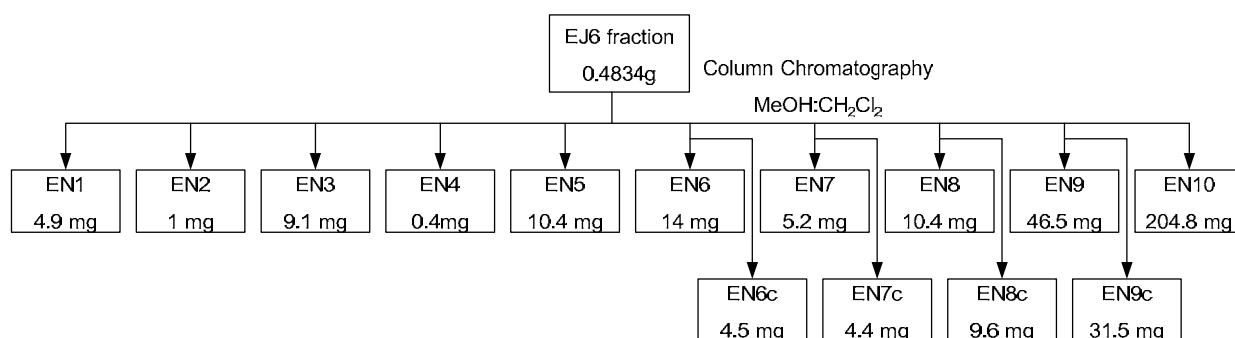
รูปที่ 35. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EM1-EM6

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.1.15 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-J6

นำส่วนของสารสกัด EJ6 น้ำหนัก 0.4834 กรัม มาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63 µm, 230-400 mesh, 55.6 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2000 mL), 4% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 200 mL และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัด (fraction) ที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 10 fractions (EN1-EN10) ดังรูปที่ 36



รูปที่ 36. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-J6 ด้วย column chromatography

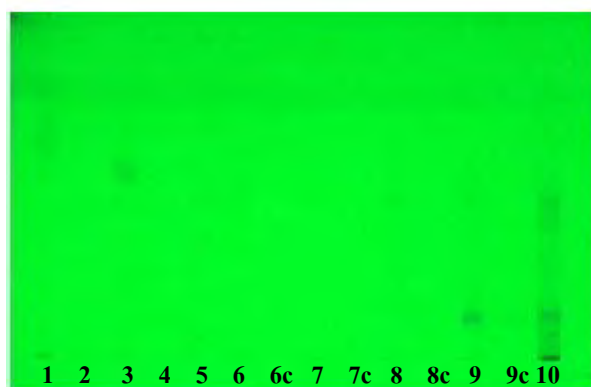
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EN1-EN10 แสดงในตารางที่ 24 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 10 fractions แสดงดังรูปที่ 37

ส่วนของสารสกัด EN8c และ EN9c น้ำหนัก 9.6 และ 31.5 มิลลิกรัม ตกผลึกใหม่ได้สารบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เช่นเดียวกับ EN6c และ EN7c เป็น compound 5

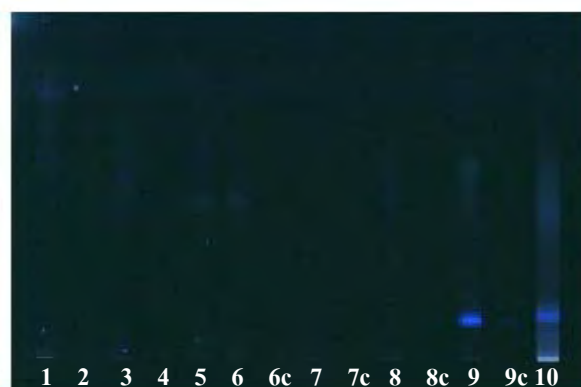


ตารางที่ 24. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EN1-EN10

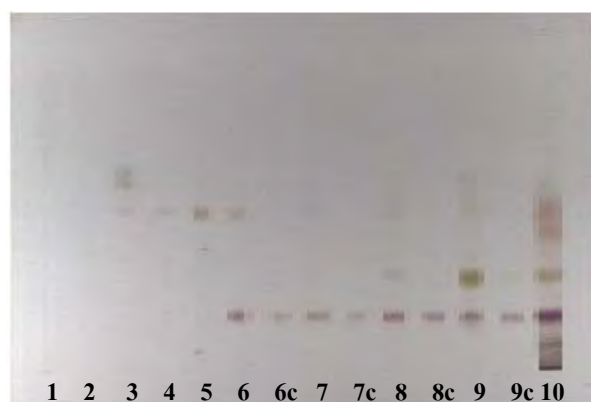
Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EN1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0049	สารเคลือบขวดสีเขียวอ่อน
EN2	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 700 mL	0.0010	สารผงสีขาว
EN3	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL	0.0091	สารผงสีขาว
EN4	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL	0.0004	สารผงสีขาว
EN5	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL	0.0104	สารผงสีขาว
EN6	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL– 4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0140	สารผงสีขาว
EN6c	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL– 4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0045	สารผงสีขาว
EN7	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0052	สารผงสีขาว
EN7c	4 % MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0044	สารผงสีขาว
EN8	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0104	สารผงสีขาว
EN8c	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0096	สารผงสีขาว
EN9	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0465	สารผงสีขาว
EN9c	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0315	สารผงสีขาว
EN10	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -100%MeOH	0.2048	สารผงสีเขียวอมเหลือง



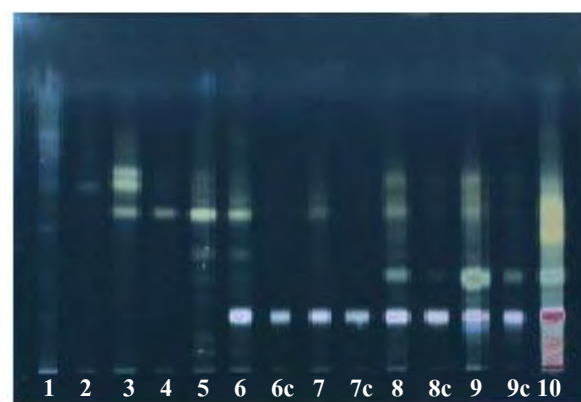
A



B



C



D

รูปที่ 37. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EN1-EN10

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

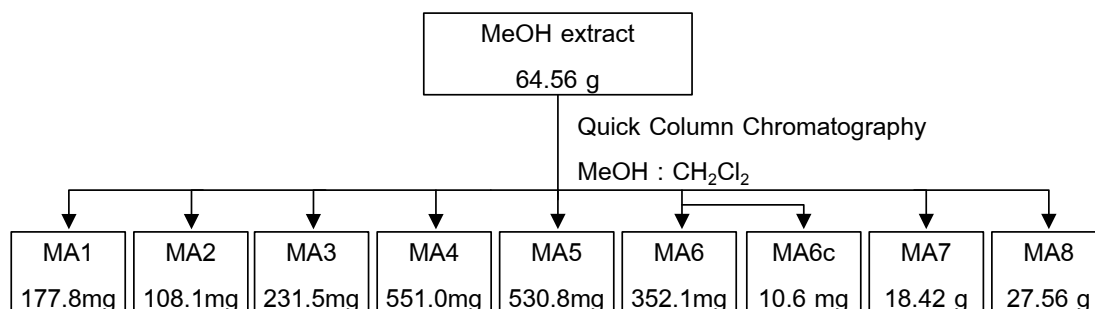
Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



### 4.3.2 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลของยอดเสม็ดชุม

#### 4.3.2.1 การแยกสารสกัดเมทานอล

แยกสารสกัดเมทานอลของยอดเสม็ดชุมน้ำหนัก 64.56 กรัม ด้วยวิธี quick column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 400 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  2.5 ลิตร, 5% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 30% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 50% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 70% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  อย่างละ 2 ลิตร และ 100% MeOH 4 ลิตร ตามลำดับ หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (MA1-MA8) ดังรูปที่ 38



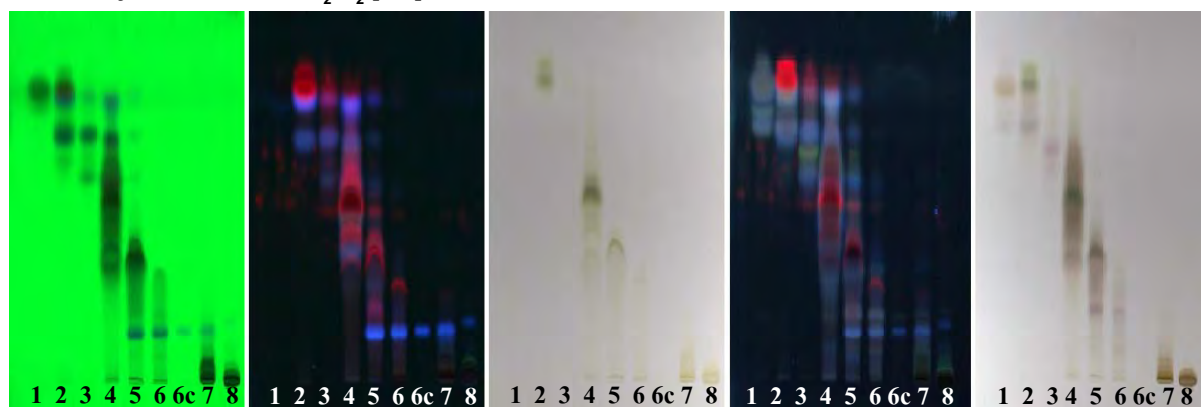
รูปที่ 38. การแยกสารของ MeOH extract ของยอดเสม็ดชุมด้วย quick column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MA1-MA8 และผลึกจากส่วนของสารสกัด MA6 (MA6c) แสดงในตารางที่ 25 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของส่วนของสารสกัดทั้ง 8 fractions และผลึก MA6c แสดงดังรูปที่ 39

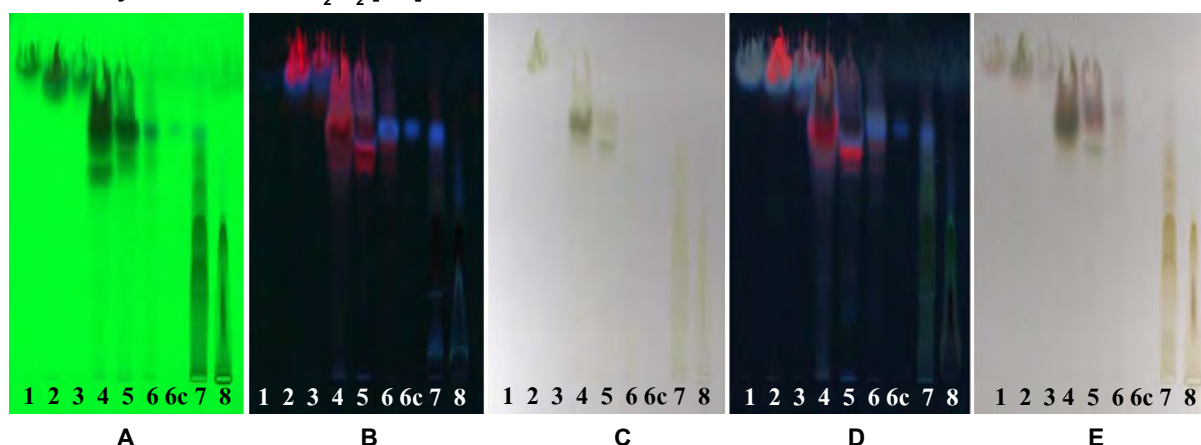
ตารางที่ 25. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MA1-MA8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MA1	100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.1778	น้ำมันสีเหลืองใส
MA2	5% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.1081	สารสีเขียวย่อน
MA3	10% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.2315	สารสีเขียวย่น
MA4	20% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ – 30% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 500 mL	0.5510	สารสีเขียวย่น
MA5	30% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1.5 L	0.5308	สารหนืดสีน้ำตาลอมเขียว
MA6	50% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.3521	สารสีเขียวย่นปนขาว
MA6c	50% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.0106	ผลึกสีขาวรูปเข็ม
MA7	70% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	18.42	สารหนืดสีเขียวย่น
MA8	100% MeOH	27.56	สารหนืดสีน้ำตาล

Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [3:7]

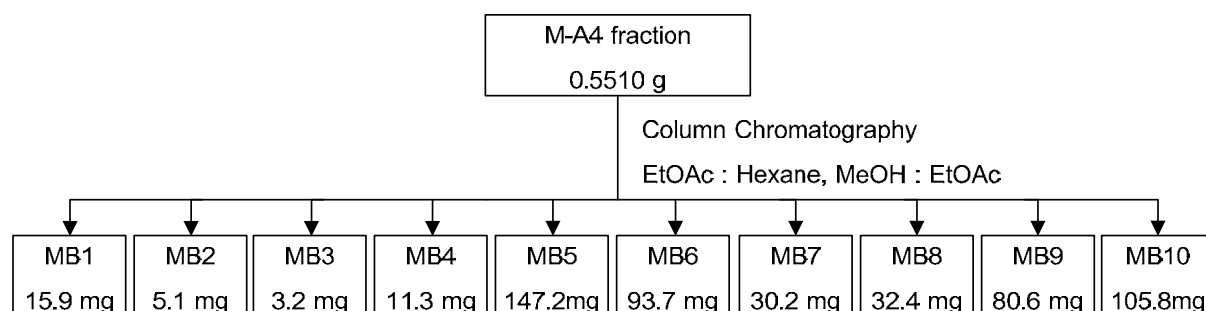


รูปที่ 39. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MA1-MA8

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm, E = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### 4.3.2.2 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-A4 (MA4)

แยกส่วนของสารสกัด MA4 น้ำหนัก 0.5510 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 55 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (100 mL), 10% EtOAc : Hexane (100 mL), 20% EtOAc : Hexane (100 mL), 30% EtOAc : Hexane (100 mL), 40% EtOAc : Hexane (200 mL), 50% EtOAc : Hexane (400 mL), 60% EtOAc : Hexane (400 mL), 70% EtOAc : Hexane (700 mL), 72% EtOAc : Hexane, 75% EtOAc : Hexane, 80% EtOAc : Hexane, 85% EtOAc : Hexane, 90% EtOAc : Hexane, 95% EtOAc : Hexane, 100% EtOAc (600 mL), 5% MeOH : EtOAc, 10% MeOH : EtOAc, 15% MeOH : EtOAc, 20% MeOH : EtOAc, 30% MeOH : EtOAc, 50% MeOH : EtOAc, 70% MeOH : EtOAc อย่างละ 200 mL และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 10 fractions (MB1-MB10) ดังรูปที่ 40



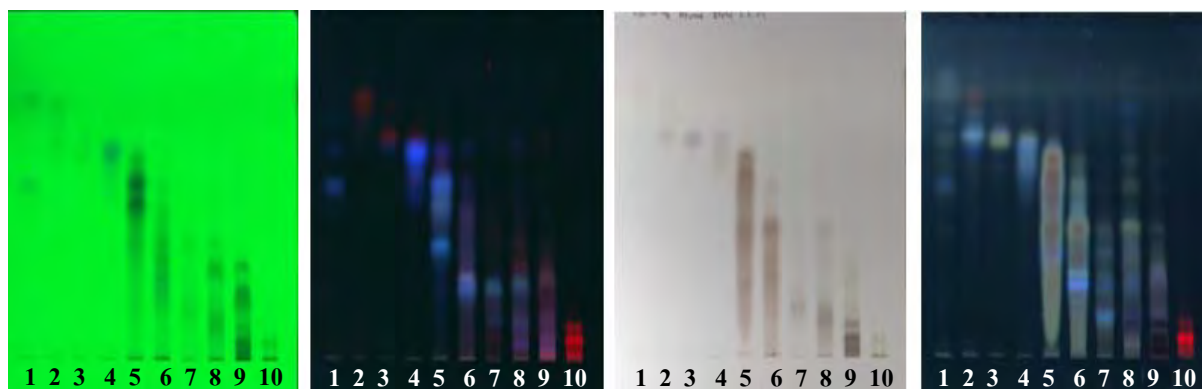
รูปที่ 40. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-A4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MB1-MB10 แสดงในตารางที่ 26 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 10 fractions แสดงดังรูปที่ 41

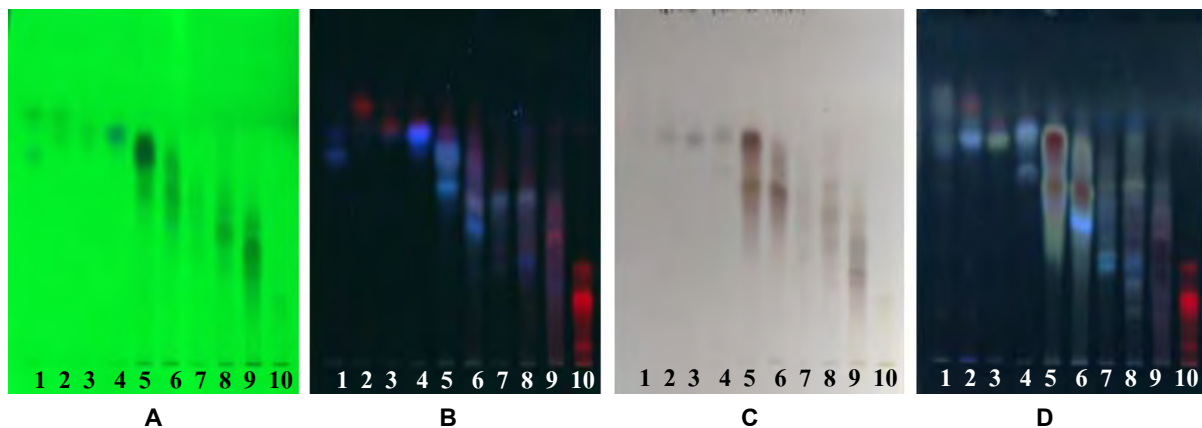
ตารางที่ 26. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MB1-MB10

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MB1	100% Hexane – 30% EtOAc : Hexane 0.1 L	0.0159	ของแข็งสีเขียวย่อน
MB2	40% EtOAc : Hexane 0.35 L	0.0051	คราบสีเขียวย่อน
MB3	40% EtOAc : Hexane 0.05 L	0.0032	คราบสีเขียวย่อน
MB4	40% EtOAc : Hexane 0.1 L	0.0113	ของแข็งสีเขียวย่อน
MB5	50% EtOAc : Hexane – 60% EtOAc : Hexane 0.25 L	0.1472	ของแข็งสีเขียวย่อน
MB6	60% EtOAc : Hexane 0.15 L – 70% EtOAc : Hexane 0.55 L	0.0937	ของแข็งสีเขียวย่อน
MB7	70% EtOAc : Hexane 0.15 L – 72% EtOAc : Hexane	0.0302	ของแข็งสีเขียวย่อน
MB8	75% EtOAc : Hexane – 95% EtOAc : Hexane	0.0324	ของแข็งสีเขียวย่อน
MB9	100% EtOAc – 10% : MeOH : EtOAc 100 mL	0.0806	ของแข็งสีเขียวย่อน
MB10	10% : MeOH : EtOAc 100 mL – 100% MeOH	0.1058	ของแข็งสีเขียวเข้ม

Solvent system : EtOAc : Hexane [7:3]



Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

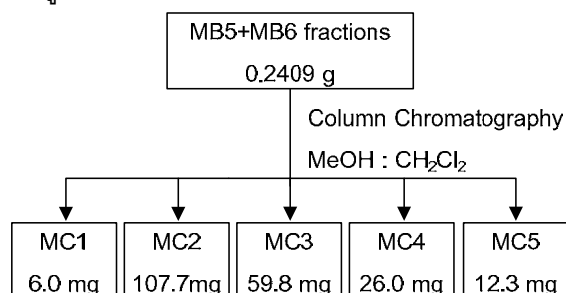


รูปที่ 41 TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MB1-MB10

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.3 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-B5 และ B6 (MB5+MB6)

แยกส่วนของสารสกัด MB5 น้ำหนัก 0.1472 กรัม และ MB6 น้ำหนัก 0.0937 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 25 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 mL), 1% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL), 3% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400 mL), 5% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 15% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 30% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 40% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 50% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 70% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 90% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  อย่างละ 300 mL และ 100% MeOH (800 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (MC1-MC5) ดังรูปที่ 42

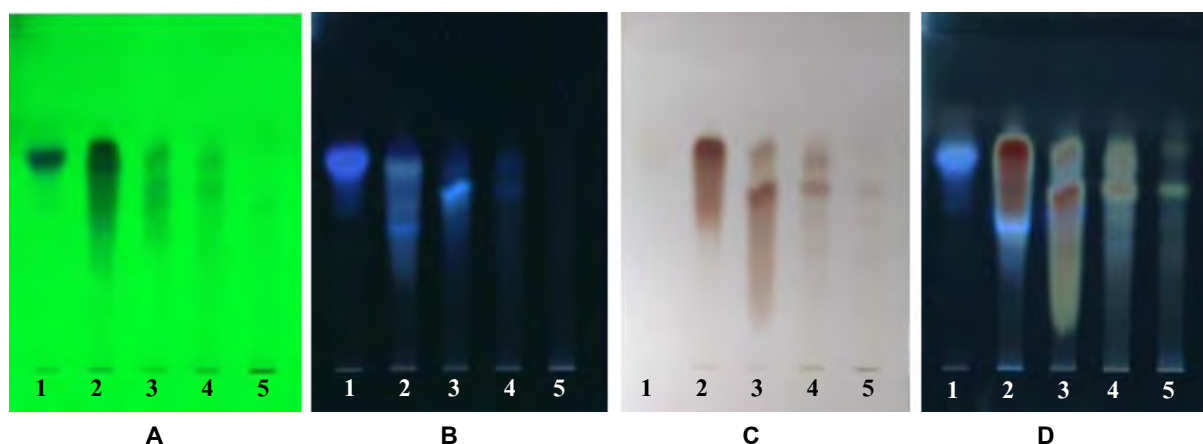


รูปที่ 42. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-B5 และ B6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MC1-MC5 แสดงในตารางที่ 27 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 43

ตารางที่ 27. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MC1-MC5

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MC1	100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ – 1% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.0060	คราบสีเขียวย่อมน
MC2	3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 200 mL	0.1077	ของแข็งสีเขียวย่อมน
MC3	3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 200 mL – 5% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.0598	ของแข็งสีเขียวย่อมน
MC4	10% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ – 15% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.0260	ของแข็งสีเขียวย่อมน
MC5	20% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ – 100% MeOH	0.0123	ของแข็งสีเขียวยืดหยุ่น



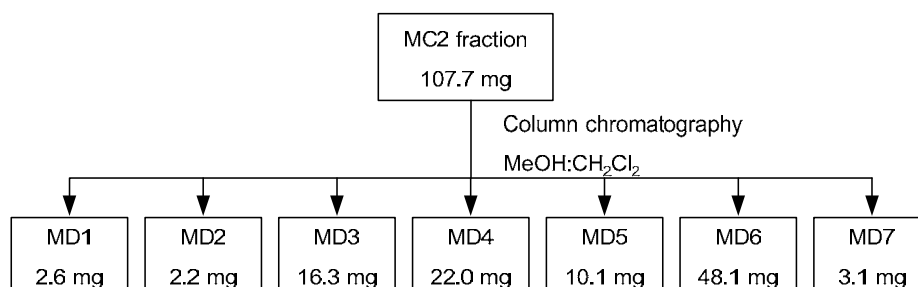
รูปที่ 43. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MC1-MC5

Solvent system : MeOH : EtOAc [0.5:9.5]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , D = 30%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ / UV 366 nm

#### 4.3.2.4 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของของส่วนของสารสกัด MeOH-C2 (MC2)

นำส่วนของสารสกัด MC2 น้ำหนัก 0.1077 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63 $\mu$ m, 230-400 mesh, 20 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 4% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mL), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mL), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mL), 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mL) และ 100% MeOH (200 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (MD1-MD7) ดังรูปที่ 44



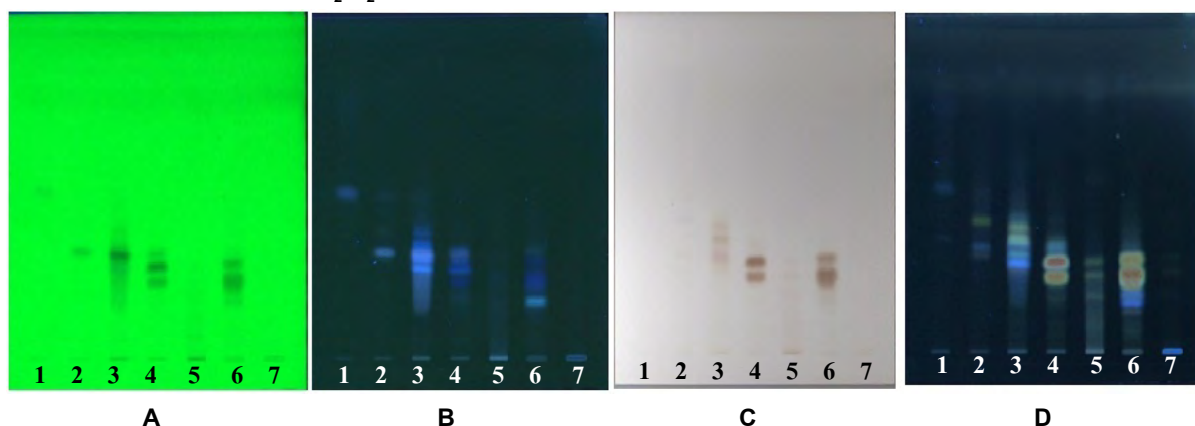
รูปที่ 44. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-C2 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MD1-MD7 แสดงในตารางที่ 28 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 45

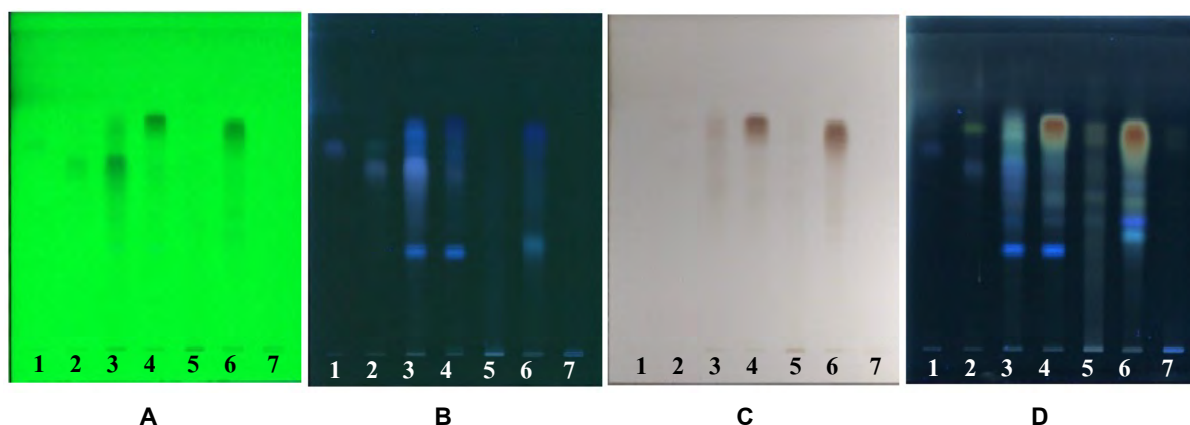
ตารางที่ 28. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MD1-MD7

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MD1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 300mL	0.0026	คราบสีเขียว
MD2	1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	0.0022	คราบสีเขียว
MD3	1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	0.0163	คราบสีเขียว
MD4	1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 300 mL	0.0220	ผงสีเขียวอ่อน
MD5	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0101	คราบสีเขียว
MD6	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0481	ผงสีขาวอมเขียว
MD7	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	0.0031	คราบสีเหลืองอ่อน

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [0.5:9.5]



Solvent system : MeOH : EtOAc [0.5:9.5]



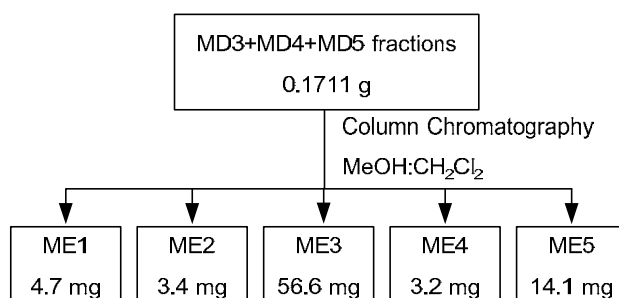
รูปที่ 45. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MD1-MD7

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.5 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-D3, D4 และ D5

(MD3+MD4+MD5)

นำส่วนของ สารสกัด MD4 น้ำหนัก 0.0220 กรัม และสารสกัด MD5 น้ำหนัก 0.101 กรัม สารสกัด MD6 น้ำหนัก 0.0481 กรัมมาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63µm, 230-400 mesh, 75g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400mL), 0.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 200 mL และ 100% MeOH (400 mL) หลังจากการรวมส่วนของ สารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (ME1-ME5) ดังรูปที่ 46

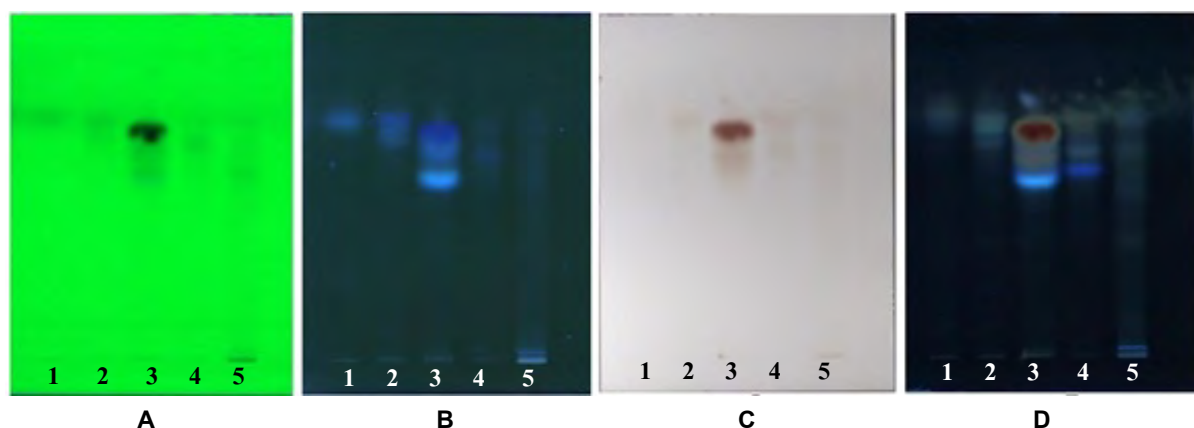


รูปที่ 46. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-D3, D4 และ D5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด ME1-ME5 แสดงในตารางที่ 29 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 47

ตารางที่ 29. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction ME1-ME5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
ME1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 1.5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0047	สารสีขาวเป็นคราบ
ME2	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2.5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0034	สารสีขาวเป็นคราบ
ME3	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 700mL	0.0566	สารผงสีขาวอมเขียว
ME4	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100mL – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0032	สารผงสีขาวอมเขียว
ME5	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	0.0141	สารผงสีเขียวอมน้ำตาลอ่อน



รูปที่ 47. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด ME1-ME5

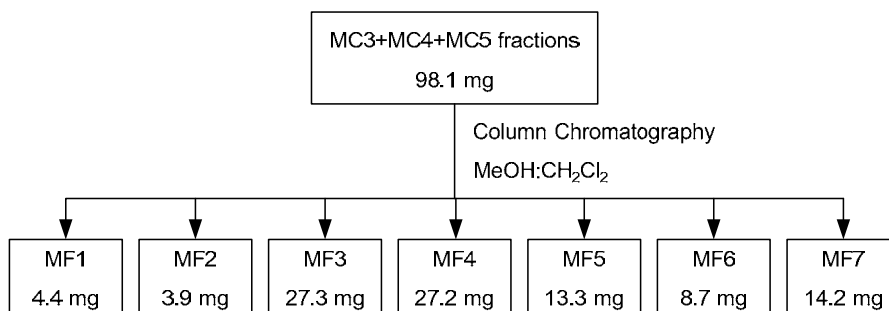
Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.6 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-C3, C4 และ C5 (MC3+MC4+MC5)

นำส่วนของสารสกัด MC3 น้ำหนัก 0.0598 กรัม สารสกัด MC4 น้ำหนัก 0.0260 กรัม และสารสกัด MC5 น้ำหนัก 0.0123 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63µm, 230-400 mesh, 30g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 0.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1200 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5.5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 8% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 13% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 200 mL และ 100% MeOH (800 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (MF1-MF7) ดังรูปที่ 48



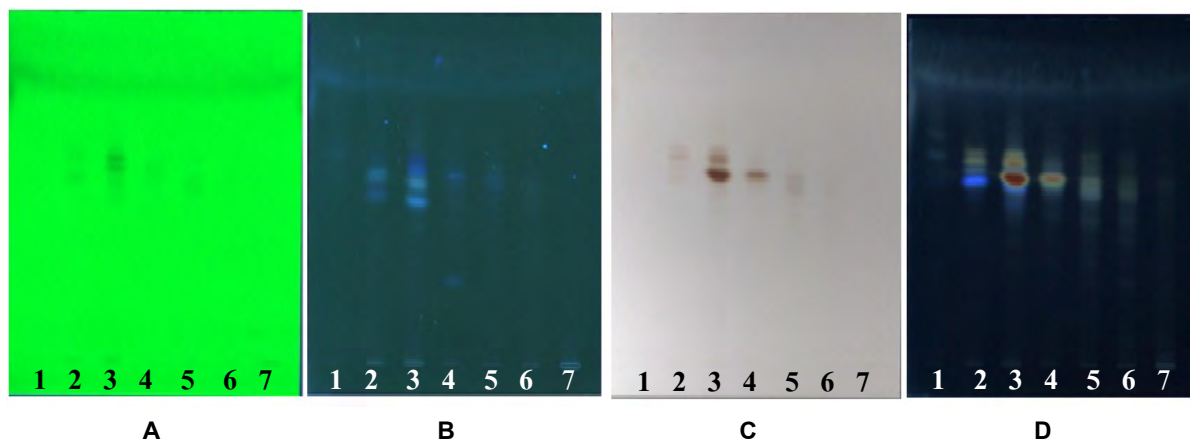


รูปที่ 48. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-C3, C4 และ C5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MF1-MF7 แสดงในตารางที่ 30 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 49

ตารางที่ 30. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MF1-MF7

Fraction	ภูมิภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MF1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 600 mL	0.0044	คราบสีเขียวย่อน
MF2	2.5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0039	ผงสีขาวอมเขียว
MF3	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0273	ผงสีขาวอมเขียว
MF4	3.5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 4.5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0272	ผงสีขาวอมเขียว
MF5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 6% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0133	ผงสีขาวอมเขียว
MF6	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0087	ของแข็งสารสีเขียวย
MF7	13% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	0.0142	สารหนืดสีน้ำตาล



รูปที่ 49. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MF1-MF7

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

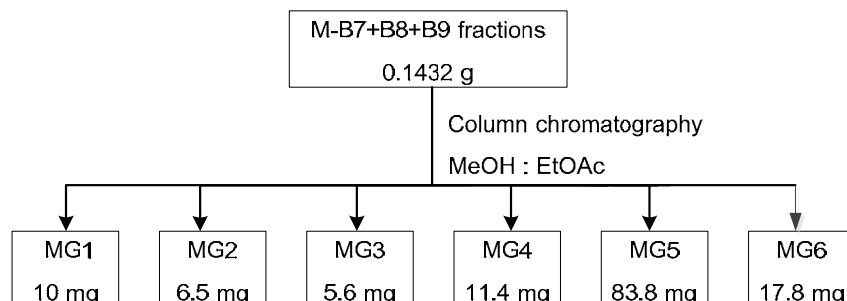
Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.7 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-B7, B8 และ B9 (MB7+MB8+MB9)

นำส่วนของสารสกัด MB7 น้ำหนัก 0.0302 กรัม สารสกัด MB8 น้ำหนัก 0.0324 กรัม และสารสกัด MB9 น้ำหนัก 0.0806 กรัม มาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ภูมิภาคคงที่เป็น silica gel (Particle size:



40-63 $\mu$ m, 230-400 mesh, 75g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(700mL), 1% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(800ml), 3% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> , 15% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 400 ml, 20% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(500ml), 30% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% EtOAc : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 200 mL, 100% EtOAc (400 mL), 50% MeOH : EtOAc (400 mL) และ 100% MeOH 500ml หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (MG1-MG6) ดังรูปที่ 50

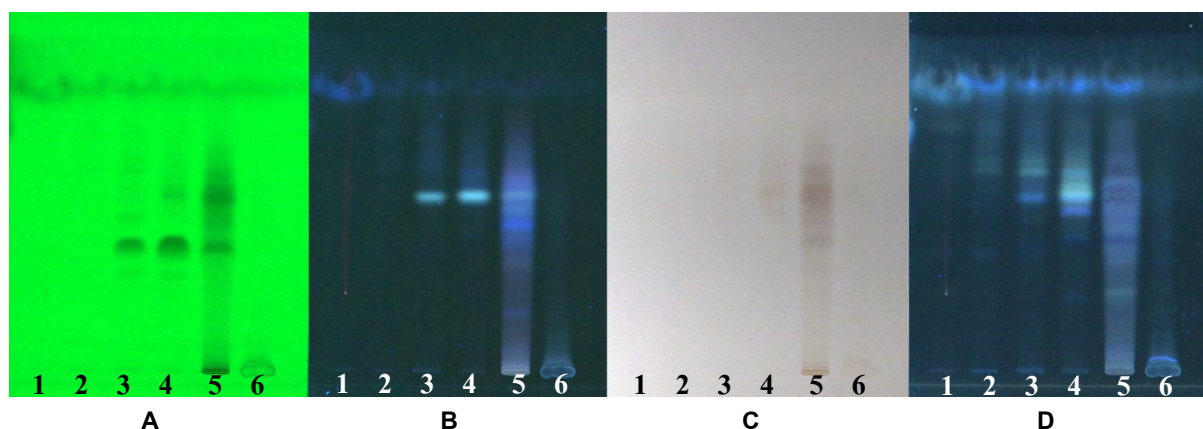


รูปที่ 50. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-B7, B8 และ B9 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MG1-MG6 แสดงในตารางที่ 31 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 51

ตารางที่ 31. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MG1-MG6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MG1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 1% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0100	ผงสีขาวอมเขียวอ่อน
MG2	3% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 15% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0065	ผงสีขาวอมเขียวอ่อน
MG3	20% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0056	ผงสีขาวอมเขียวอ่อน
MG4	30% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 70% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0114	ผงสีขาวอมเขียวอ่อน
MG5	90% EtOAc : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 50% MeOH : EtOAc	0.0838	สารหนืดสีเขียว
MG6	100% MeOH	0.0178	สารหนือสีน้ำตาล



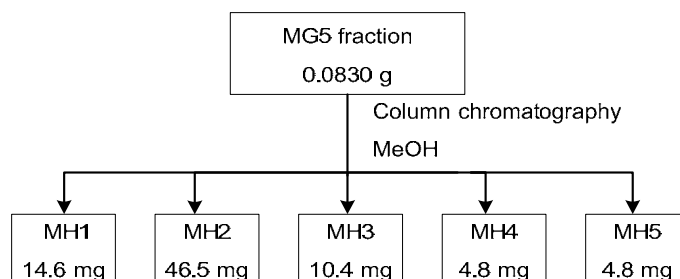
รูปที่ 51. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MG1-MG6

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.8 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-G5 (MG5)

นำส่วนของสารสกัด MG5 น้ำหนัก 0.0830 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคกรองที่เป็น Sephadex LH-20 (40 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 100% MeOH (300 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (MH1-MH5) ดังรูปที่ 52

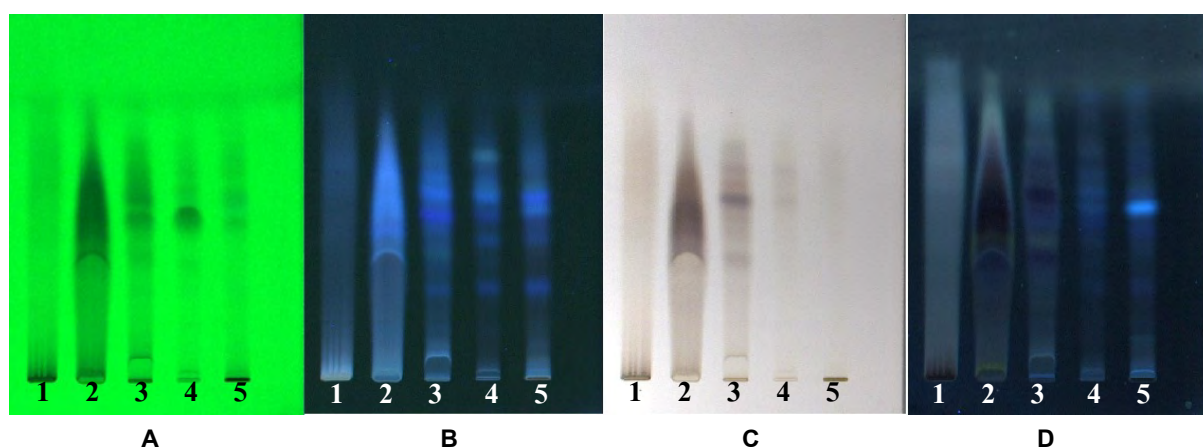


รูปที่ 52. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-G5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MH1-MH5 แสดงในตารางที่ 32 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 53

ตารางที่ 32. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MH1-MH5

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MH1	100% MeOH	0.0146	สารหนืดสีเขียวอมเหลือง
MH2	100% MeOH	0.0465	สารหนืดสีเขียวอมเหลือง
MH3	100% MeOH	0.0104	สารหนืดสีเขียวอมเหลือง
MH4	100% MeOH	0.0048	สารหนืดสีเขียวอมเหลือง
MH5	100% MeOH	0.0048	สารหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล



รูปที่ 53. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MH1-MH5

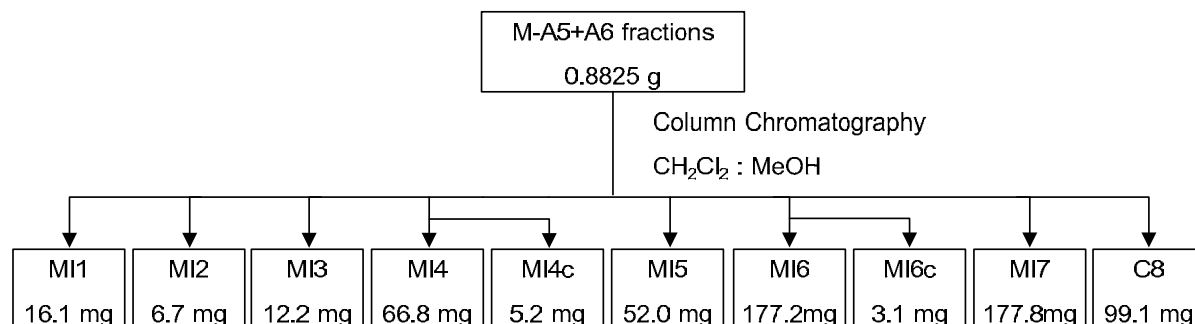
Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.9 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-A5 และ A6 (MA5+MA6)

แยกส่วนของสารสกัด M-A5 น้ำหนัก 0.5304 กรัม และ M-A6 น้ำหนัก 0.3521 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคกรองที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 55 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่

ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 L), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 L), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.2 L), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 L), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL) และ 100% MeOH (1.0 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (MI1-MI8) ดังรูปที่ 54

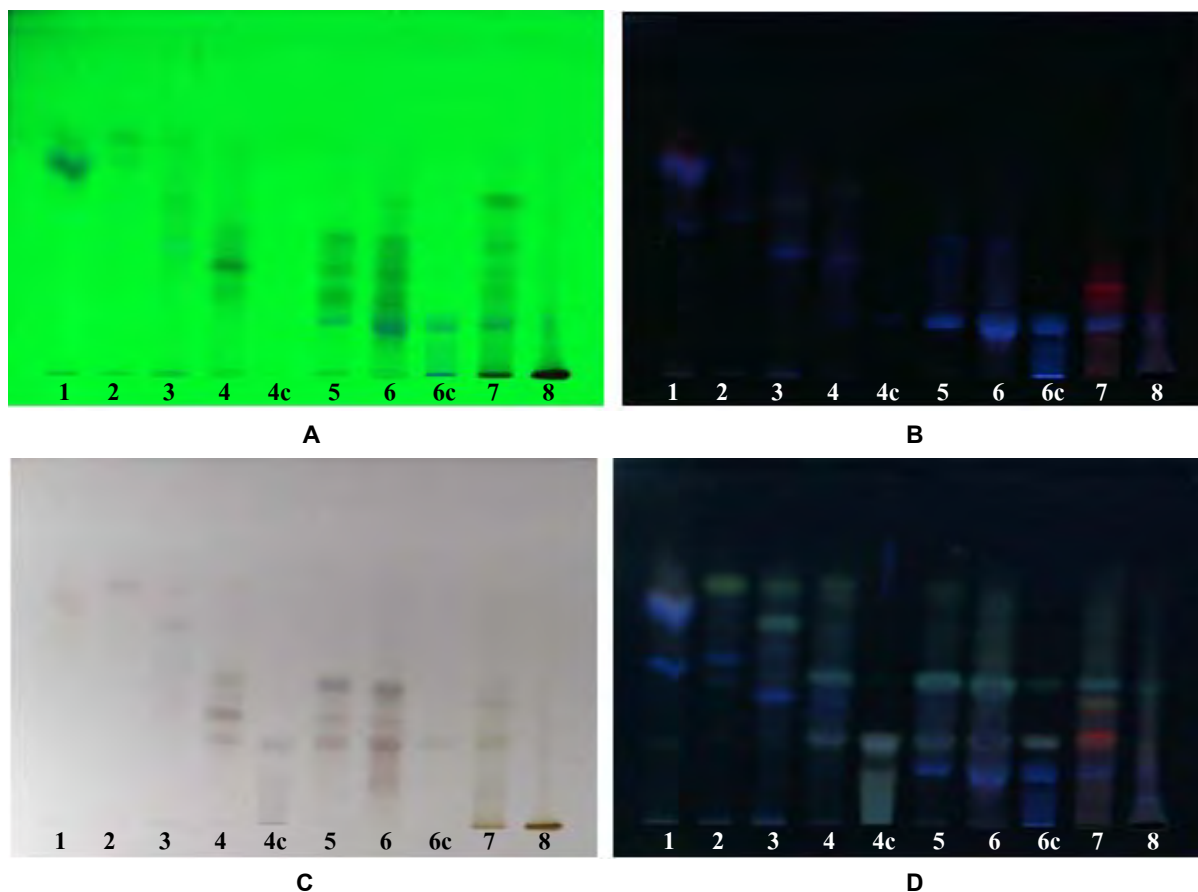


รูปที่ 54. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-A5 และ A6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MI1-MI8 แสดงในตารางที่ 33 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 55

ตารางที่ 33. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MI1-MI8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MI1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0161	สารหนืดสีเขียว
MI2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 700 mL	0.0067	ของแข็งสีเขียวย่อน
MI3	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 300 mL – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL	0.0122	ของแข็งสีเขียว
MI4	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL	0.0668	ของแข็งสีเขียวย่อน
MI4c	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL	0.0052	ของแข็งสีขาว
MI5	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL	0.0520	ของแข็งสีเขียว
MI6	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.1772	ของแข็งสีเขียวย่อน
MI6c	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0031	ของแข็งสีขาว
MI7	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 50 % MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.1778	สารหนืดสีเขียว
MI8	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100 % MeOH	0.0991	สารหนืดสีน้ำตาล



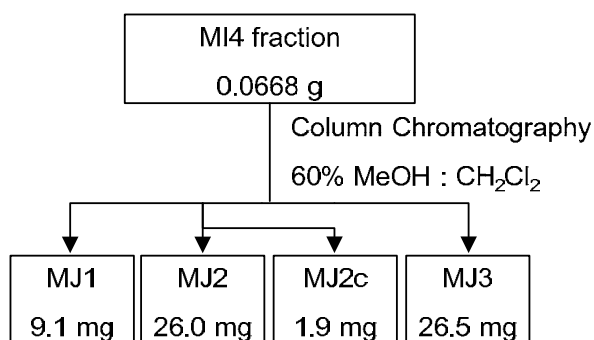
รูปที่ 55. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MI1-MI8

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.10 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-I4 (MI4)

นำส่วนของสารสกัด MI4 น้ำหนัก 0.0668 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 60% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 3 fractions (MJ1-MJ3) ดังรูปที่ 56

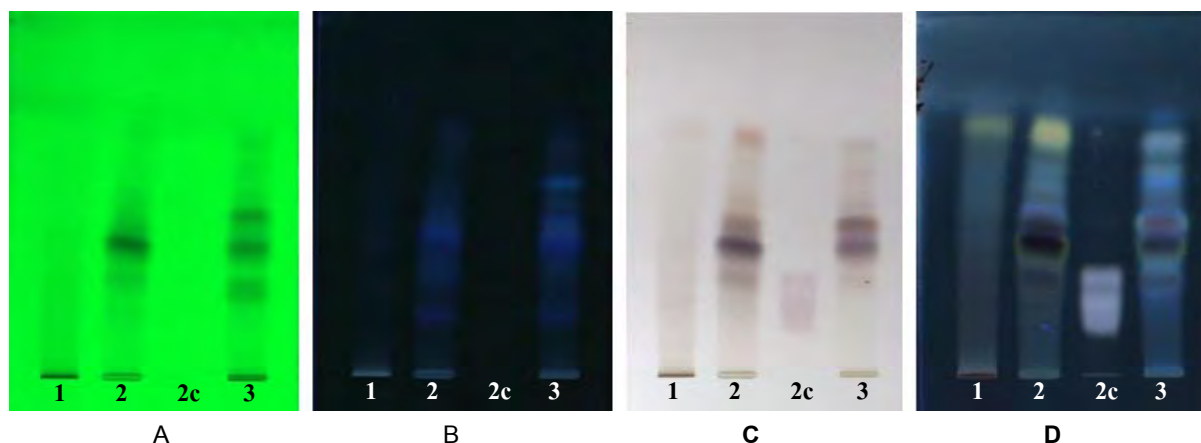


รูปที่ 56. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-I4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MJ1-MJ3 และตะกอน MJ2p แสดงในตารางที่ 34 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 3 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 57

ตารางที่ 34. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MJ1-MJ3

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MJ1	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 70 mL	0.0091	ของแข็งสีเขียวเข้ม
MJ2	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 30 mL	0.0260	ของแข็งสีเขียว
MJ2p	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 30 mL	0.0019	คราบสีขาว
MJ3	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL	0.0265	ของแข็งเขียวอ่อน



รูปที่ 57. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MJ1-MJ3

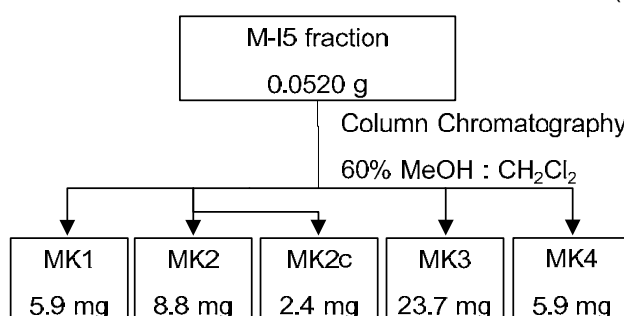
Adsorbent : Silica gel 60 F<sub>254</sub>

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.11 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-I5 (MI5)

นำส่วนของสารสกัด MI5 น้ำหนัก 0.0520 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 60% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 4 fractions (MK1-MK4) ดังรูปที่ 58

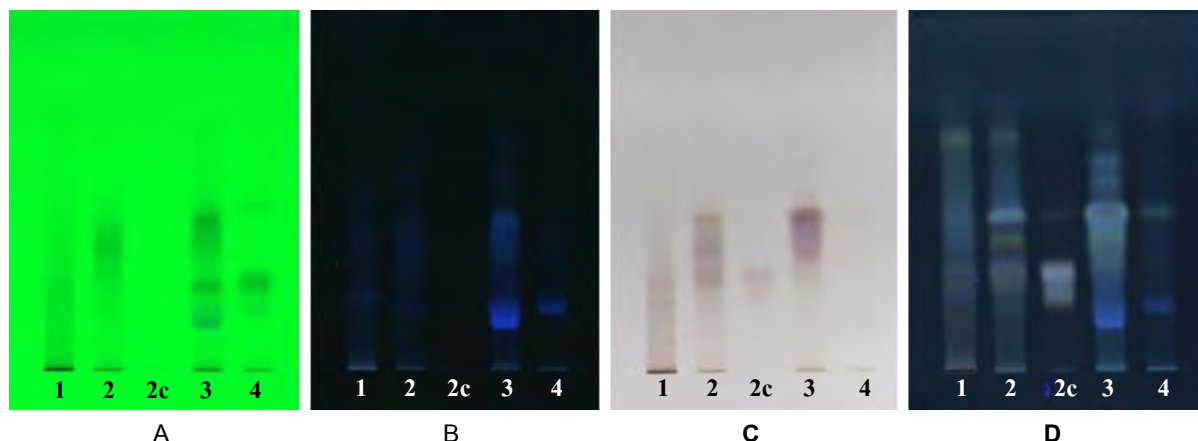


รูปที่ 58. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-I5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MK1-MK4 และตะกอน MK2p แสดงในตารางที่ 35 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 4 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 59

ตารางที่ 35. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MK1-MK4

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MK1	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 80 mL	0.0059	ของแข็งสีเขียวเข้ม
MK2	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 35 mL	0.0088	ของแข็งสีเขียวย่อมน
MK2p	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 35 mL	0.0024	คราบสีขาว
MK3	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 55 mL	0.0237	ของแข็งขาวปนเขียว
MK4	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 130 mL	0.0059	ของแข็งสีเขียวย่อมน



รูปที่ 59. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MK1-MK4

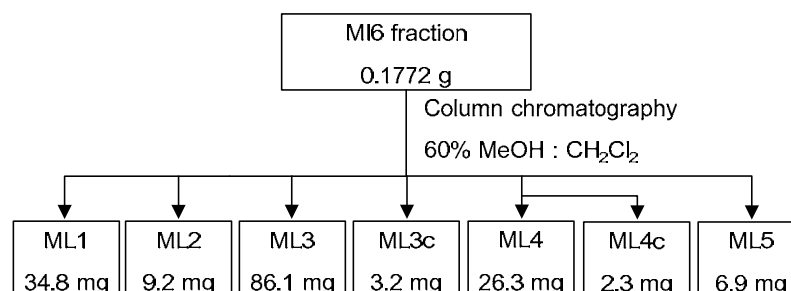
Adsorbent : Silica gel 60 F<sub>254</sub>

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.12 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-I6 (MI6)

นำส่วนของสารสกัด MI6 น้ำหนัก 0.1772 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคกที่เป็น Sephadex LH-20 และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 60% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (ML1-ML5) ดังรูปที่ 60

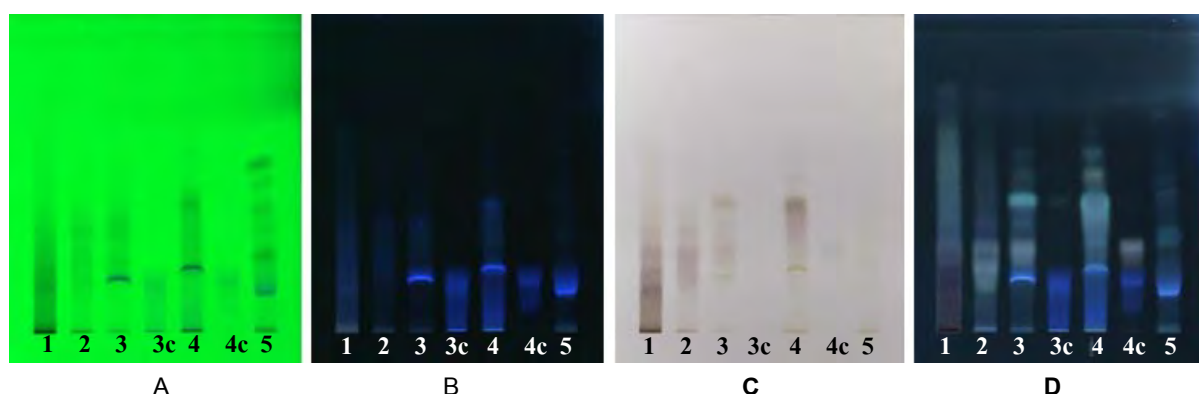


รูปที่ 60. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-I6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด ML1-ML5 และตะกอน ML3p และ ML4p แสดงในตารางที่ 36 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 61

ตารางที่ 36. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction ML1-ML5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
ML1	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 140 mL	0.0348	ของแข็งสีเขียวเข้ม
ML2	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 5 mL	0.0092	ของแข็งสีเขียวย่อน
ML3	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 15 mL	0.0861	ของแข็งเขียวเหลือง
ML3p	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 15 mL	0.0032	คราบสีขาว
ML4	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 25 mL	0.0263	ของแข็งสีเขียวย่อน
ML4p	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 25 mL	0.0023	คราบสีขาว
ML5	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 115 mL	0.0069	คราบสีเขียวเข้ม



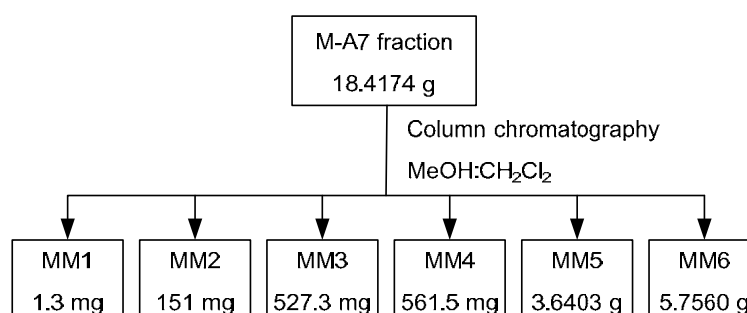
รูปที่ 61. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด ML1-ML5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.13 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-A7 (MA7)

แยกส่วนของสารสกัด M-A7 น้ำหนัก 18.4174 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63µm, 230-400 mesh, 300.92 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 L), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 55% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 60% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 65% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 75% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 80% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 85% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 800 mL และ 100% MeOH (2 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่า ได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (MM1-MM6) ดังรูปที่ 62



รูปที่ 62. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-A7 ด้วย column chromatography

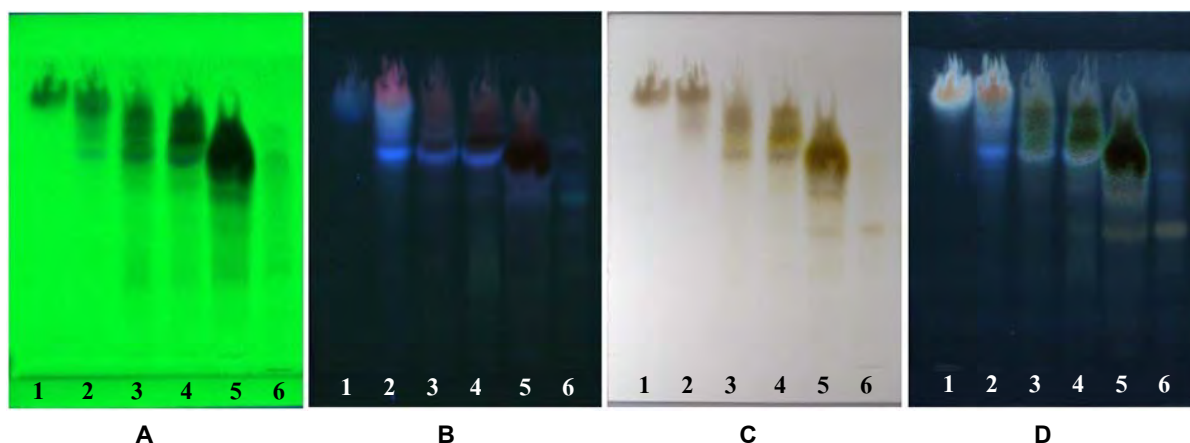


น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MM1-MM6 แสดงในตารางที่ 37 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 63 และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH บน TLC แสดงดังรูปที่ 64

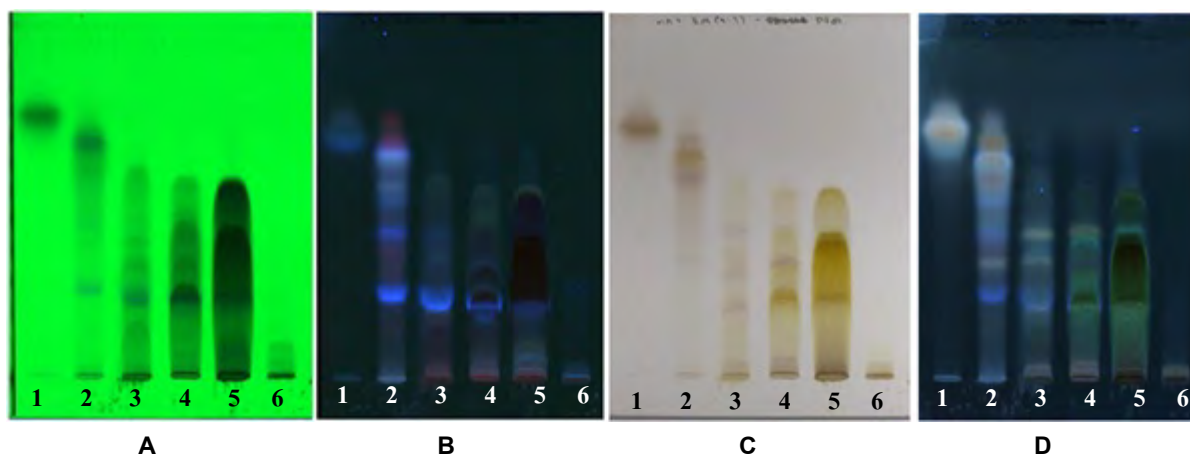
ตารางที่ 37. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MM1-MM6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MM1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0013	เป็นน้ำมัน
MM2	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.1510	สารหนืดสีเขียวเข้ม
MM3	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.5273	สารหนืดสีเขียวเข้ม
MM4	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 400 mL	0.5615	สารหนืดสีเขียวเข้ม
MM5	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 400 mL	3.6403	สารหนืดสีเขียวเข้ม
MM6	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	5.7560	สารหนืดสีเขียวเข้ม

Solvent system : n-butanol : n-propanol : acetic acid : water [30 : 10 : 10 : 10]



Solvent system : EtOAc : MeOH [9:1]

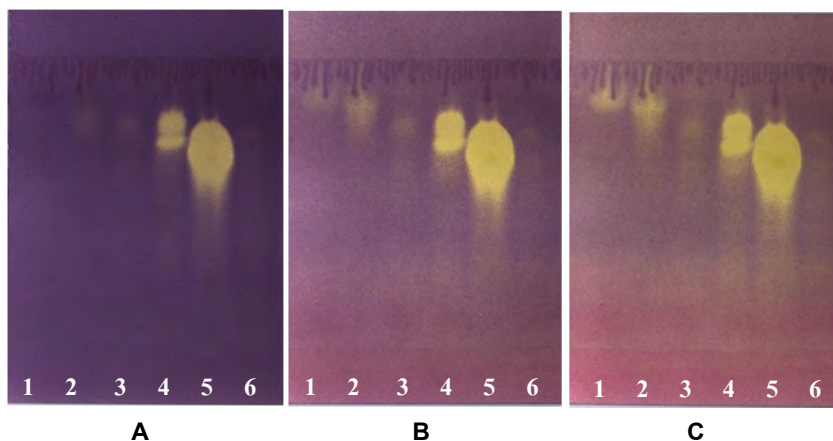


รูปที่ 63. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MM1-MM6

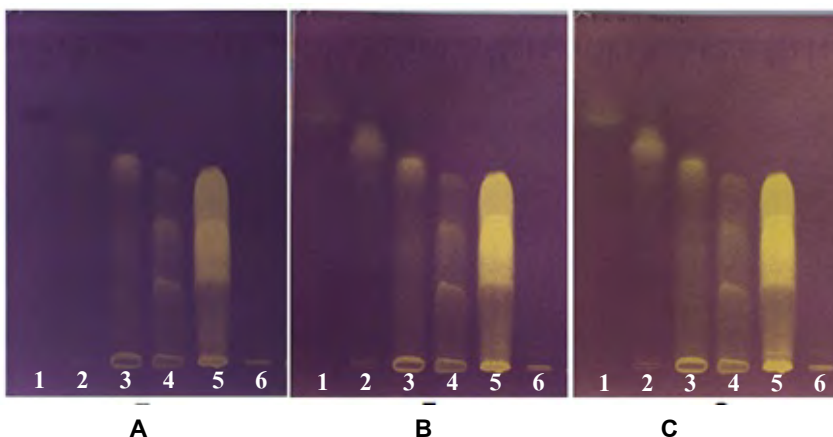
Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



Solvent system : n-butanol : n-propanol : acetic acid : water [30 : 10 : 10 : 10]



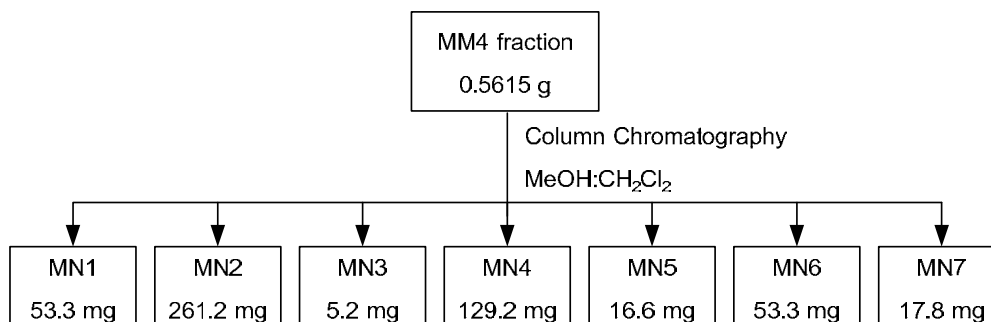
Solvent system : EtOAc : MeOH [9:1]



รูปที่ 64. TLC chromatogramsฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด MM1-MM6  
Detector : A = DPPH/0hr., B = DPPH/8hrs., C = DPPH/24hrs.

#### 4.3.2.14 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-M4 (MM4)

แยกส่วนของสารสกัด MM4 น้ำหนัก 0.5615 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 (40 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 100% MeOH (2.5 L) โดยแบ่งแยกสกัดทั้งหมด 3 รอบ หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (MN1-MN7) ดังรูปที่ 65

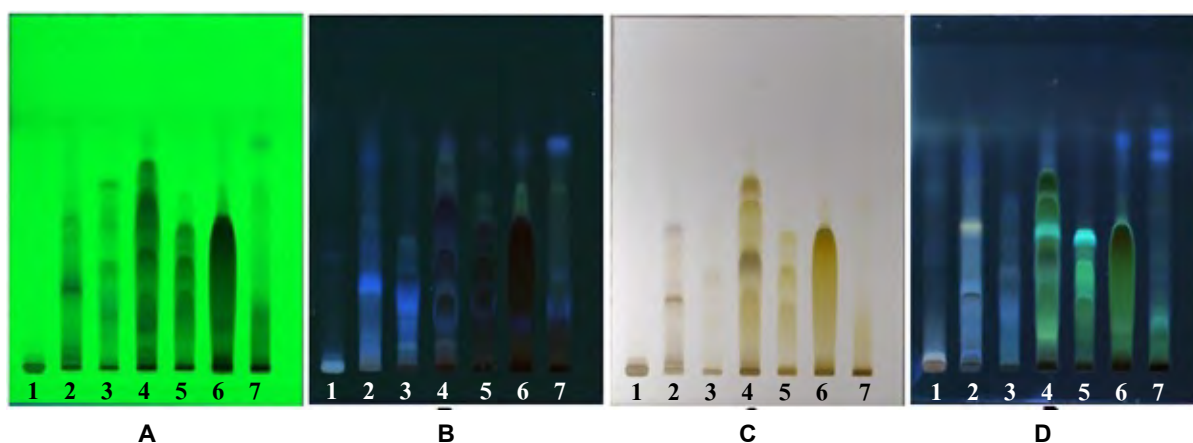


รูปที่ 65. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-M4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MN1-MN7 แสดงในตารางที่ 38 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 66 และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH บน TLC แสดงดังรูปที่ 67

ตารางที่ 38. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MN1-MN7

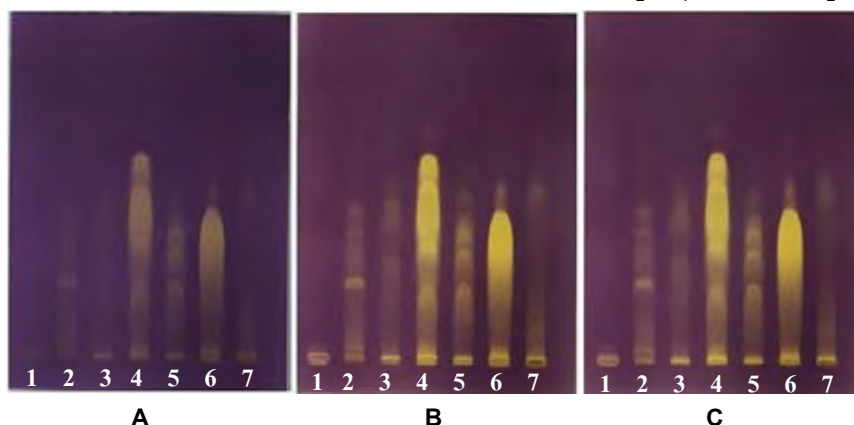
Fraction	วิฤภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MN1	100% MeOH	0.0533	สารหนืดสีขาวเขียวอมเขียว
MN2	100% MeOH	0.2612	สารหนืดสีอมน้ำตาล
MN3	100% MeOH	0.0052	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MN4	100% MeOH	0.1292	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MN5	100% MeOH	0.0166	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MN6	100% MeOH	0.0533	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MN7	100% MeOH	0.0178	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล



รูปที่ 66. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MN1-MN7

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



รูปที่ 67. TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด MN1-MN7

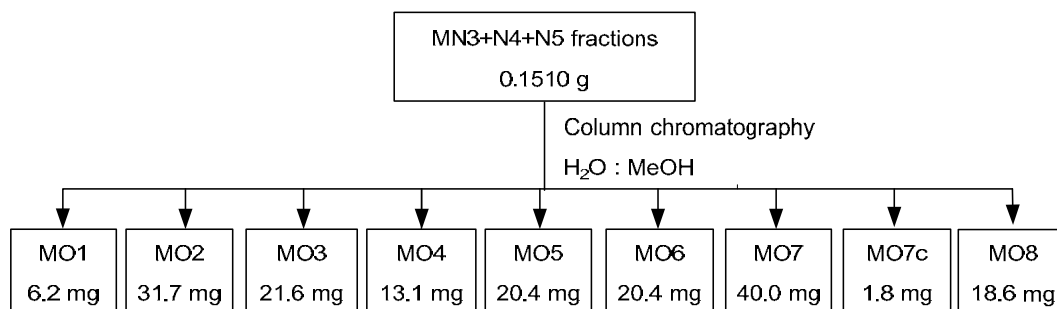
Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = DPPH/0hr., B = DPPH/8hrs., C = DPPH/24hrs.

#### 4.3.2.15 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-N3, N4 และ N5 (MN3+MN4+MN5)

นำส่วนของสารสกัด MN3 น้ำหนัก 0.0052 กรัม, MN4 น้ำหนัก 0.1292 กรัม และ MN5 น้ำหนัก 0.0166 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิฤภาคคองที่เป็น Sephadex C18 (40 g) และใช้วิฤภาคภาค

เคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O:MeOH (50 mL), 40% H<sub>2</sub>O:MeOH (50 mL), 30% H<sub>2</sub>O:MeOH (200 mL), 20% H<sub>2</sub>O:MeOH (100 mL), 10% H<sub>2</sub>O:MeOH (100 mL) และ 100%MeOH (50 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (MO1-MO8) ดังรูปที่ 68

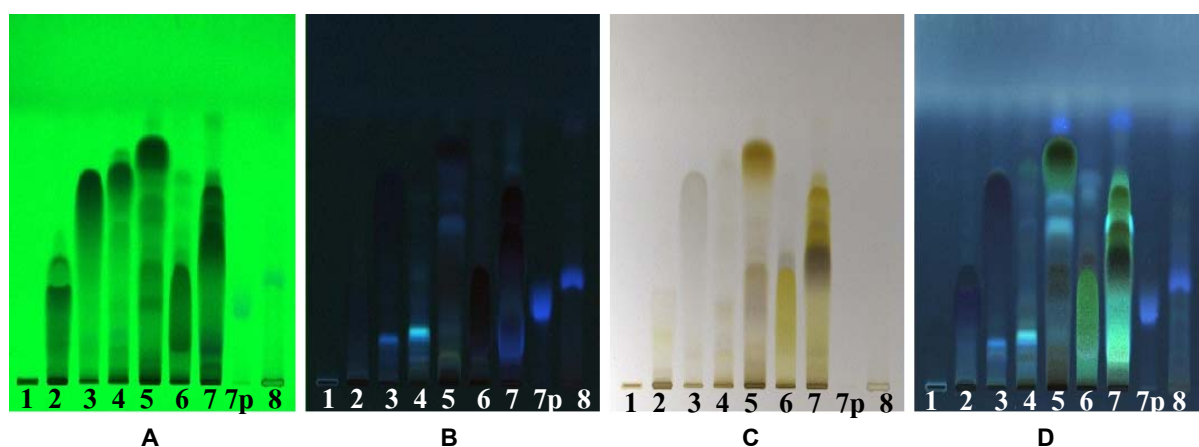


รูปที่ 68. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-N3, N4 และ N5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MO1-MO8 และตะกอน MO7p แสดงในตารางที่ 39 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 69

ตารางที่ 39. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MO1-MO8

Fraction	ภูมิภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MO1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH 30 mL	0.0062	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MO2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH 6 ML	0.0317	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MO3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH 6 mL	0.0216	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MO4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH 18 mL	0.0131	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MO5	40% H <sub>2</sub> O : MeOH 15 mL	0.0204	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MO6	40% H <sub>2</sub> O : MeOH 25 mL	0.0204	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MO7	40% H <sub>2</sub> O : MeOH 40 mL	0.0400	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
MO7p	40% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0018	คราบสีขาว
MO8	40% H <sub>2</sub> O : MeOH (20ml) – 100% MeOH	0.0186	สารหนืดสีเขียวอมน้ำตาล



รูปที่ 69. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MO1-MO8

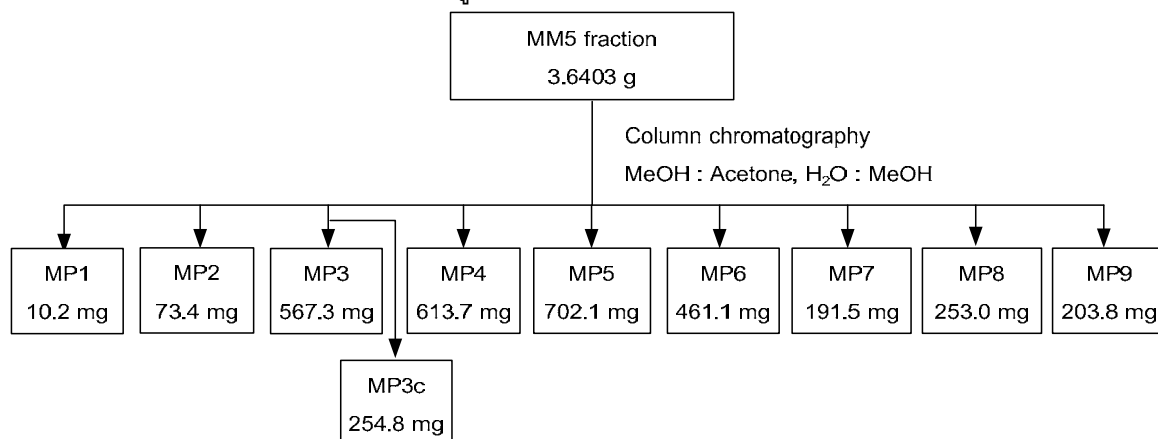
Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.16 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-M5 (MM5)

นำส่วนของสารสกัด MM5 น้ำหนัก 3.6403 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63 $\mu$ m, 230-400 mesh, 70.64 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 10% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 20% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 30% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 40% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 50% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 60% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 65% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 70% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 75% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 80% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 90% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 100% Acetone, 5% MeOH : Acetone (200mL), 10% MeOH : Acetone (200mL), 15% MeOH : Acetone (400mL), 20% MeOH : Acetone (300mL), 25% MeOH : Acetone (300mL), 30% MeOH : Acetone (300mL), 40% MeOH : Acetone (300mL), 50% MeOH : Acetone (300mL), 60% MeOH : Acetone (300 mL), 70% MeOH : Acetone (300mL), 80% MeOH : Acetone (300mL), 90% MeOH : Acetone (300mL), 100% MeOH (300mL), 5% H<sub>2</sub>O : MeOH (300mL), 10% H<sub>2</sub>O : MeOH (300mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 9 fractions (MP1-MP9) ดังรูปที่ 70

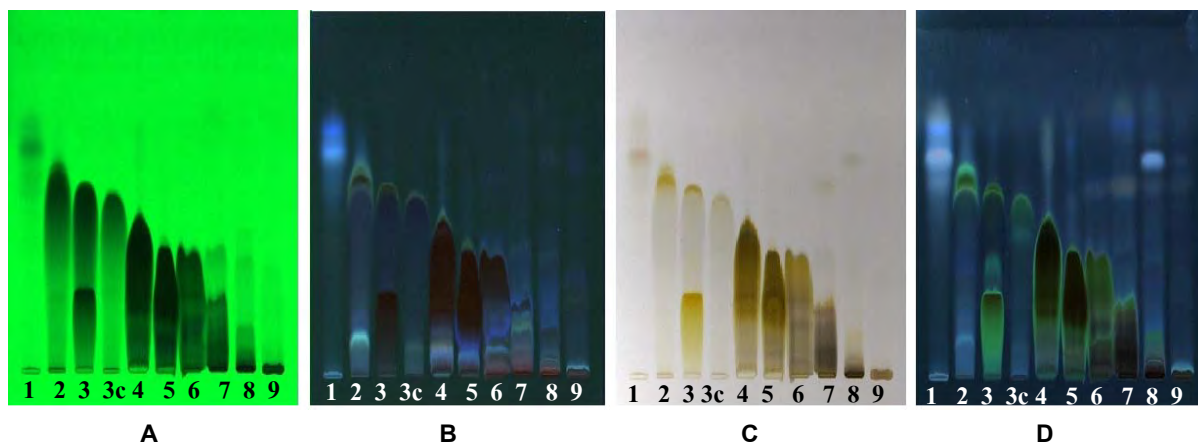
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MP1-MP9 และผลึก MP3c แสดงในตารางที่ 40 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 9 fractions และผลึกที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 71



รูปที่ 70. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-M5 ด้วย column chromatography

ตารางที่ 40. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MP1-MP9

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MP1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 80% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone 0.1 L	0.0102	คราบสีน้ำตาล
MP2	80% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone 0.1 L – 70% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone 0.2 L	0.0734	คราบสีน้ำตาล
MP3	60% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone 0.2 L	0.5673	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MP3c	60% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone	0.2548	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง
MP4	50% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone – 40% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone	0.6137	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MP5	35% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone	702.1	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MP6	30% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone – 25% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone	461.1	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MP7	20% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : Acetone – 100% Acetone	191.5	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MP8	95% Acetone : MeOH – 80% Acetone : MeOH	253.0	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
MP9	70% Acetone : MeOH – 100% MeOH	203.8	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม



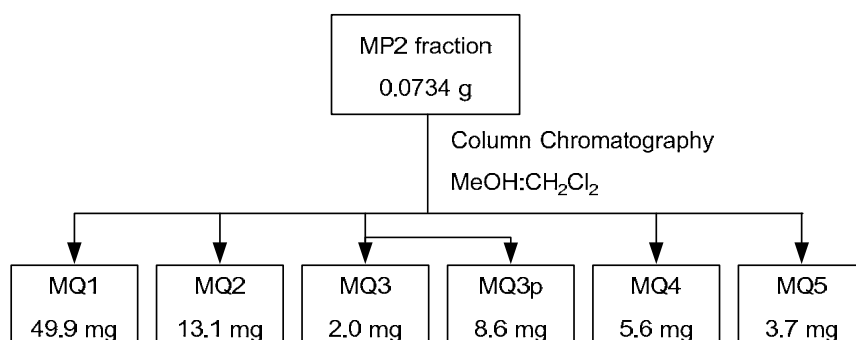
รูปที่ 71. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MP1-MP9

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.17 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-P2 (MP2)

นำส่วนของสารสกัด MP2 น้ำหนัก 0.0734 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคที่เป็น octadecyl silane (C18, 40 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O:MeOH (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (MQ1-MQ5) ดังรูปที่ 72

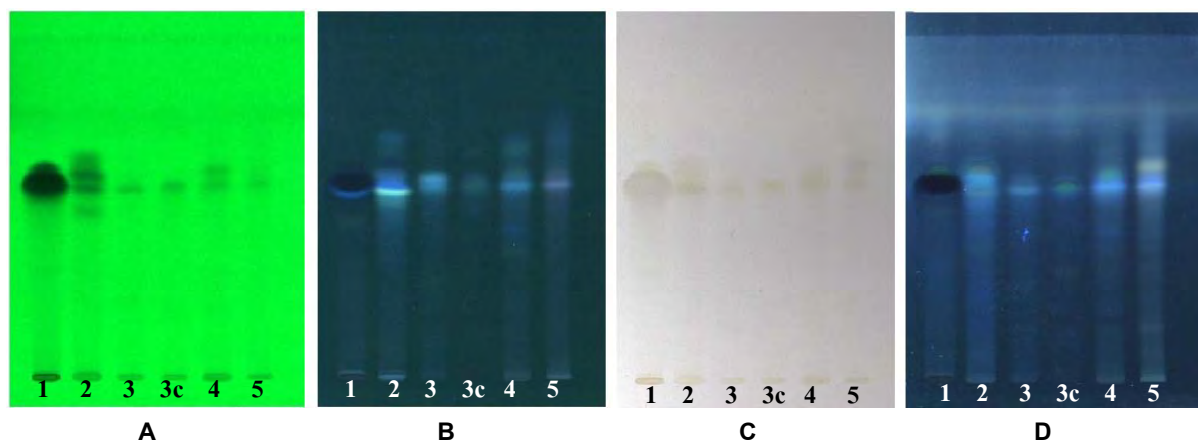


รูปที่ 72. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P2 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MQ1-MQ5 และตะกอน MQ3p แสดงในตารางที่ 41 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 73

ตารางที่ 41. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MQ1-MQ5

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MQ1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0499	ผงสีขาวอมน้ำตาล
MQ2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0131	คราบสีน้ำตาลอมเขียว
MQ3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0020	คราบสีน้ำตาล
MQ3p	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0086	คราบสีน้ำตาล
MQ4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0056	คราบสีน้ำตาล
MQ5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0037	คราบสีน้ำตาล



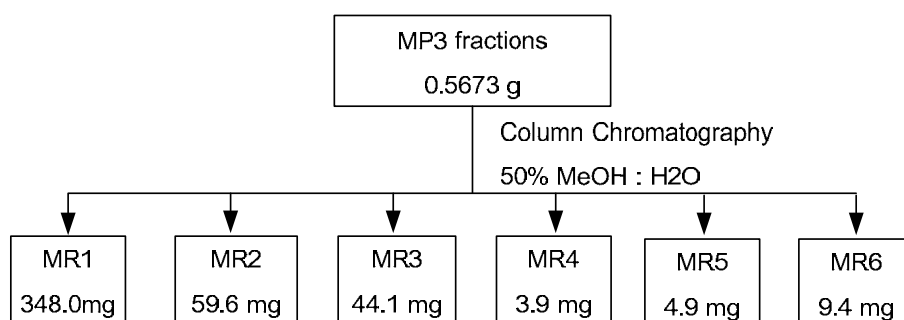
รูปที่ 73. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MQ1-MQ5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.18 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-P3 (MP3)

นำส่วนของสารสกัด MP3 น้ำหนัก 0.5673 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคที่เป็น octadecyl silane (C18, 40 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O:MeOH (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (MR1-MR6) ดังรูปที่ 74



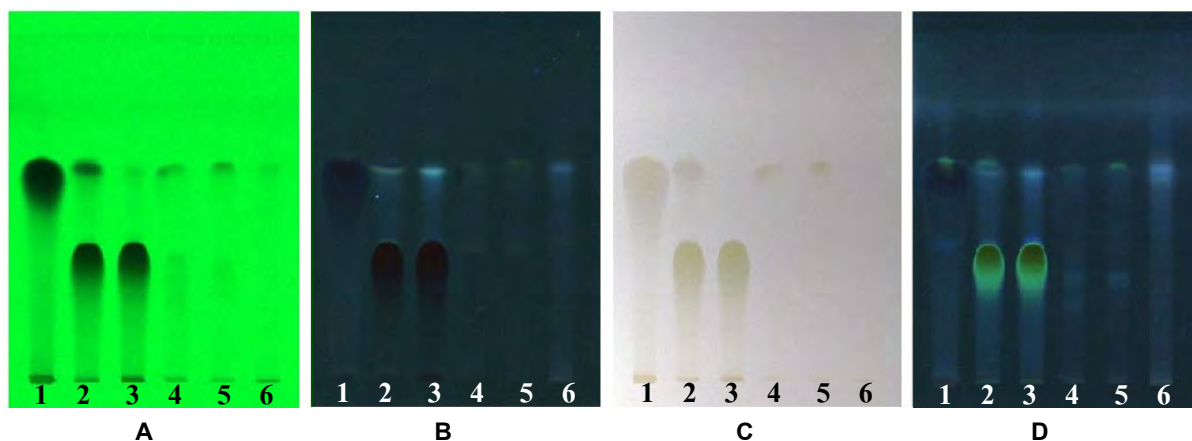
รูปที่ 74. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P3 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MR1-MR6 แสดงในตารางที่ 42 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 75

ตารางที่ 42. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MR1-MR6

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MR1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.3480	สารหนืดสีน้ำตาล
MR2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0596	เม็ดกลมสีน้ำตาลเหลือง
MR3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0441	เม็ดกลมสีน้ำตาลเหลือง
MR4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0039	คราบสีน้ำตาลเหลือง
MR5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0049	คราบสีน้ำตาลเหลือง
MR6	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0094	คราบสีน้ำตาลเหลือง





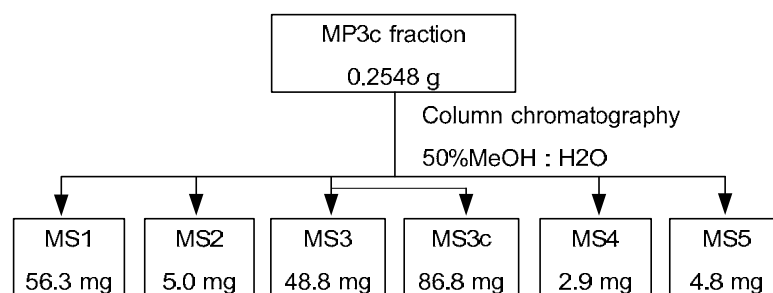
รูปที่ 75. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MR1-MR6

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.19 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-P3c (MP3c)

นำส่วนของสารสกัด MP3c น้ำหนัก 0.2548 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคที่เป็น octadecyl silane (C18, 40 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O:MeOH (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (MS1-MS5) ดังรูปที่ 76



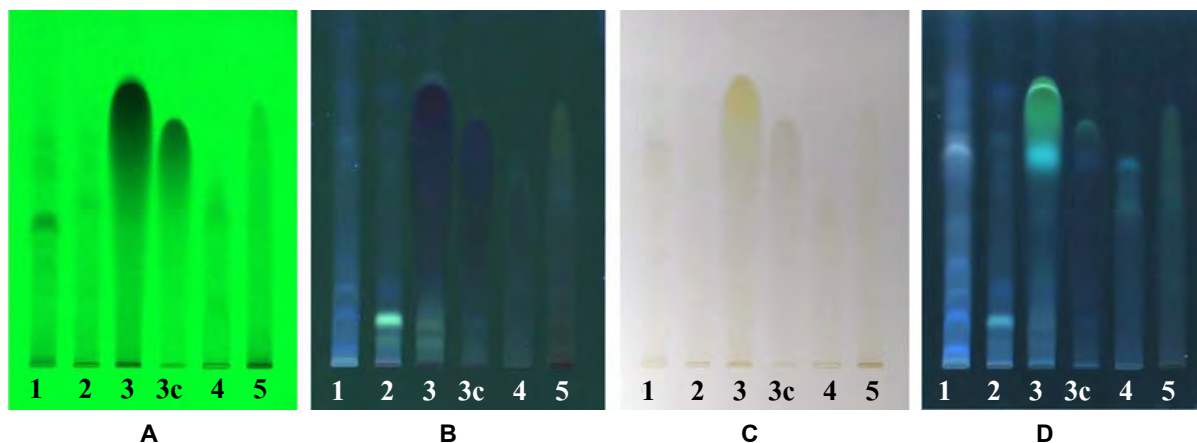
รูปที่ 76. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P3c ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MS1-MS5 และตะกอน MS3c แสดงในตารางที่ 43 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions และตะกอนที่แยกได้แสดงดังรูปที่ 77

ผลึกที่ได้จากส่วนของสารสกัด MS3 (MS3c) น้ำหนัก 86.8 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว จึงให้เป็น compound 6

ตารางที่ 43. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MS1-MS5

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MS1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	56.3	ผงสีเหลืองอ่อน
MS2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	5.0	ผงสีเหลือง
MS3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	48.8	ผงสีเหลือง
MS3c	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	86.8	ผลึกสีขาว
MS4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	2.9	สารสีเหลืองอมน้ำตาล
MS5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	4.8	สารสีน้ำตาล



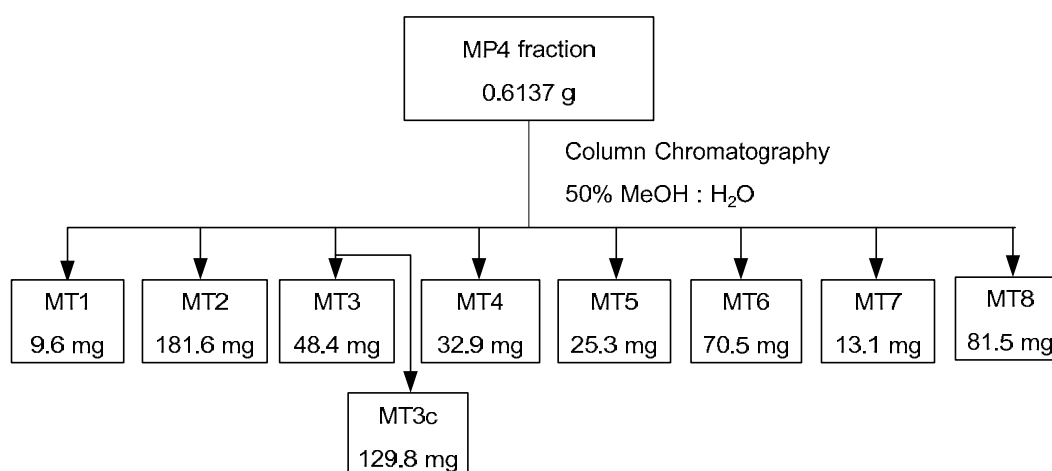
รูปที่ 77. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MS1-MS5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.20 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-P4

นำส่วนของสารสกัด MP4 น้ำหนัก 0.6137 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคที่เป็น octadecyl silane (C18) (40 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O : MeOH (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (MT1-MT8) ดังรูปที่ 78



รูปที่ 78. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MT1-MT8 และผลึก MT3c แสดงในตารางที่ 44 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions และผลึกที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 79

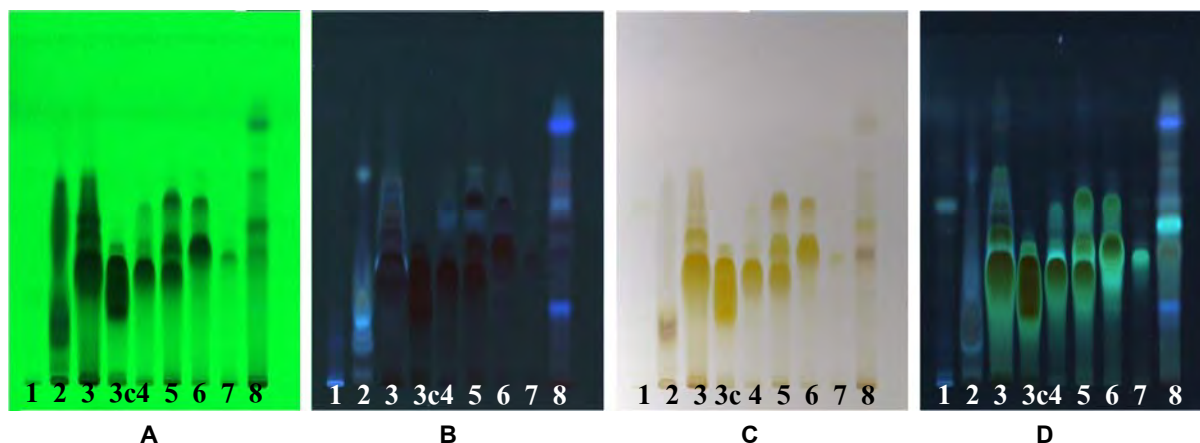
ผลึกที่ได้จากส่วนของสารสกัด MT3 (MT3c) น้ำหนัก 129.8 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน จึงให้เป็น compound 7

ตารางที่ 44. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MT1-MT8

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MT1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	9.6	ผงสีขาวปนเขียว
MT2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	181.6	สารหนืดสีน้ำตาล
MT3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	48.4	ของแข็งสีน้ำตาลเหลือง



Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MT3c	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	129.8	ผลึกสีเหลืองอ่อน
MT4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	32.9	ผงสีเหลือง
MT5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	25.3	ผงสีเหลือง
MT6	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	70.5	สารหนืดสีน้ำตาล
MT7	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	13.1	สารหนืดสีน้ำตาล
MT8	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	81.5	ผงสีเหลือง



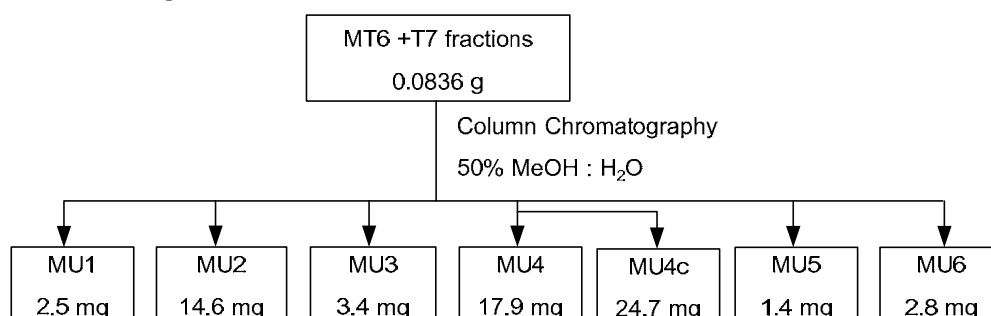
รูปที่ 79. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MT1-MT8

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.21 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-T6 และ T7 (MT6+MT7)

นำส่วนของสารสกัด MT6 น้ำหนัก 0.0705 กรัม MT7 น้ำหนัก 0.0131 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น octadecyl silane (C18) (40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O : MeOH (400 mL) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (MU1-MU6) ดังรูปที่ 80



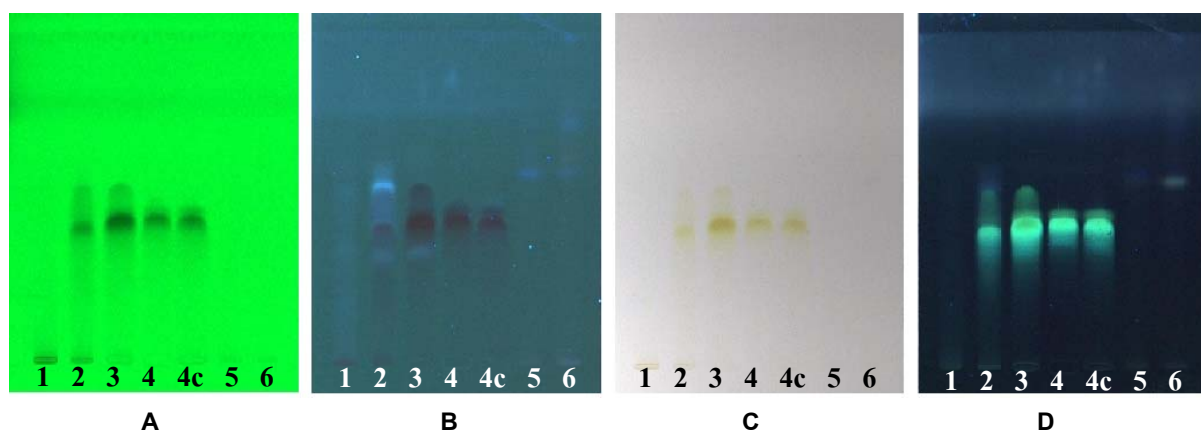
รูปที่ 80. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-T6 และ T7 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MU1-MU6 และตะกอน MU4c แสดงในตารางที่ 45 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 81

ผลึกที่ได้จากส่วนของสารสกัด MU3 (MU3c) น้ำหนัก 24.7 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองจึงให้เป็น compound 8

ตารางที่ 45. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MU1-MU6

Fraction	วิฤภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MU1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	2.5	สารหนืดสีน้ำตาล
MU2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	14.6	สารหนืดสีน้ำตาล
MU3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	3.4	ผงสีเหลือง
MU4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	17.9	ผงสีเหลือง
MU4c	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	24.7	ผงสีเหลือง
MU5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	1.4	ผงสีเหลือง
MU6	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	2.8	ผงสีขาว



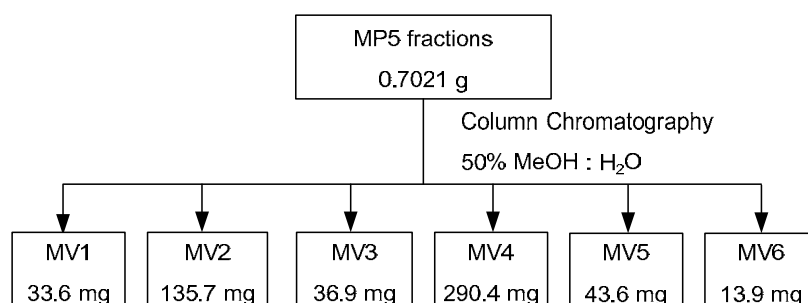
รูปที่ 81. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MU1-MU6

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.22 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-P5

นำส่วนของสารสกัด MP5 น้ำหนัก 0.7021 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิฤภาคที่เป็น octadecyl silane (C18, 40 g) และใช้วิฤภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O:MeOH (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (MV1-MV6) ดังรูปที่ 82

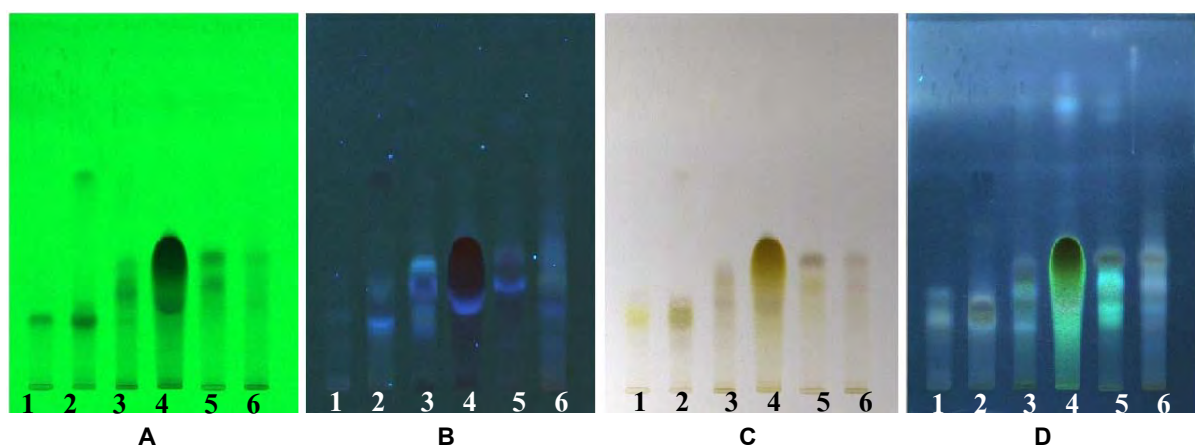


รูปที่ 82. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MV1-MV6 แสดงในตารางที่ 46 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 83

ตารางที่ 46. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MV1-MV6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MV1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	33.6	สารหนืดสีน้ำตาล
MV2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	135.7	สารหนืดสีน้ำตาล
MV3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	36.9	สารหนืดสีน้ำตาล
MV4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	290.4	เมือกกลมสีน้ำตาลเหลือง
MV5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	43.6	สารหนืดสีน้ำตาล
MV6	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	13.9	สารหนืดสีน้ำตาล



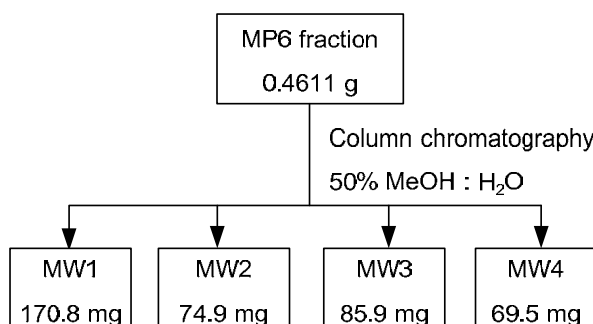
รูปที่ 83. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MV1-MV6

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.23 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-P6 (MP6)

นำส่วนของสารสกัด MP6 น้ำหนัก 0.4611 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคที่เป็น octadecyl silane (C18, 40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O:MeOH (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 4 fractions (MW1-MW4) ดังรูปที่ 84

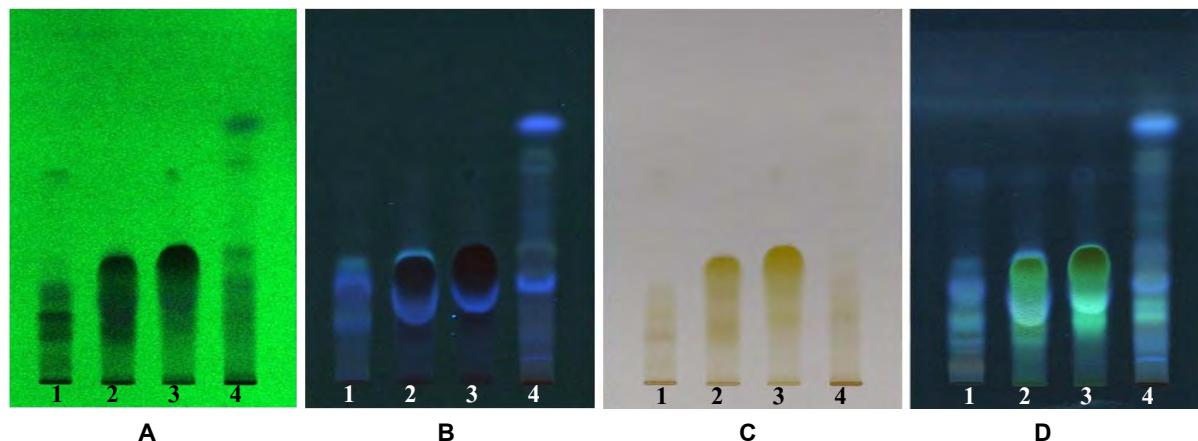


รูปที่ 84. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-P6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MW1-MW4 แสดงในตารางที่ 47 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 4 fractions แสดงดังรูปที่ 85

ตารางที่ 47. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MW1-MW4

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MW1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	170.8	สารหนืดสีน้ำตาล
MW2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	74.9	สารหนืดสีน้ำตาล
MW3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	85.9	สารหนืดสีน้ำตาล
MW4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	69.5	สารหนืดสีน้ำตาล



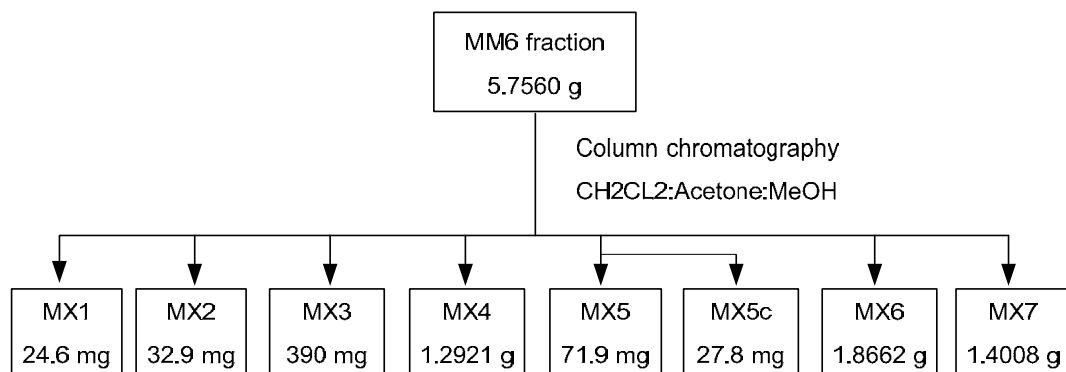
รูปที่ 85. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MV1-MV4

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.24 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-M6 (MM6)

นำส่วนของสารสกัด MM6 น้ำหนัก 5.7560 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Particle size: 40-63  $\mu$ m, 230-400 mesh, 70.64g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 10% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 20% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 30% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 40% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 50% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 60% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 65% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 70% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 75% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 80% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 90% Acetone : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 100% Acetone (400 mL), 5% MeOH : Acetone (400 mL), 10% MeOH : Acetone (400 mL), 15% MeOH : Acetone (400 mL), 20% MeOH : Acetone (400 mL), 25% MeOH : Acetone (400 mL), 30% MeOH : Acetone (400 mL), 40% MeOH : Acetone (400 mL), 50% MeOH : Acetone (400 mL), 60% MeOH : Acetone (400 mL), 70% MeOH : Acetone (400 mL), 80% MeOH : Acetone (400 mL), 90% MeOH : Acetone (400 mL), 100% MeOH (400 mL), 5% H<sub>2</sub>O : MeOH (400 mL), 10% H<sub>2</sub>O : MeOH (400 mL), หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (MX1-MX7) ดังรูปที่ 86

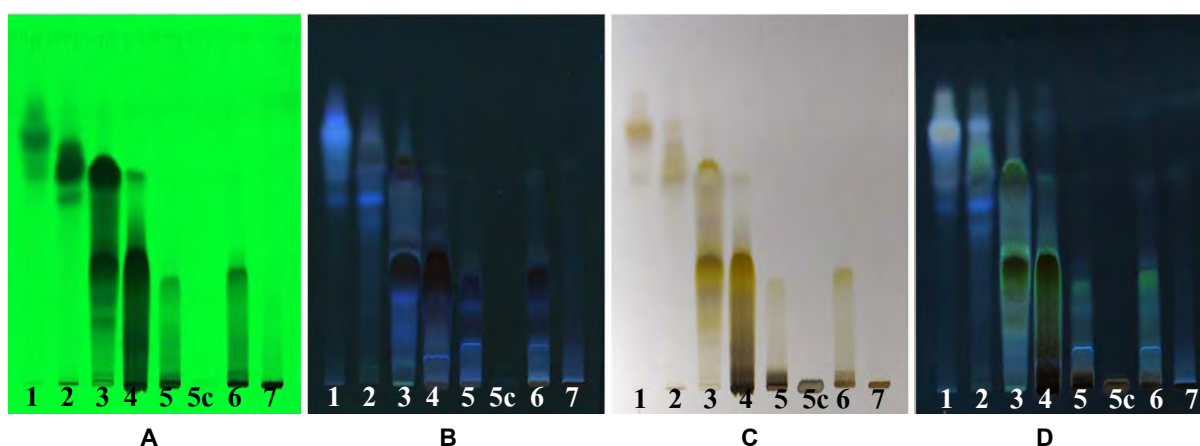


รูปที่ 86. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-M6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MX1-MX7 และผลึก MX5c แสดงในตารางที่ 48 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions และผลึกที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 87

ตารางที่ 48. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MX1-MX7

Fraction	ภูมิภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MX1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 20% Acetone : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0246	คราบสีเหลือง
MX2	20% Acetone : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 30% Acetone : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0329	สารหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล
MX3	40% Acetone : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 60% Acetone : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.3900	สารหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล
MX4	70% Acetone : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 10% MeOH : Acetone	1.2921	สารหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล
MX5	15% MeOH : Acetone	0.0719	สารหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล
MX5c	15% MeOH : Acetone	0.0278	ผลึกสีขาวนวล
MX6	20% MeOH : Acetone – 35% MeOH : Acetone	1.8662	สารหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล
MX7	40% MeOH : Acetone – 100% MeOH	1.4008	สารหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล



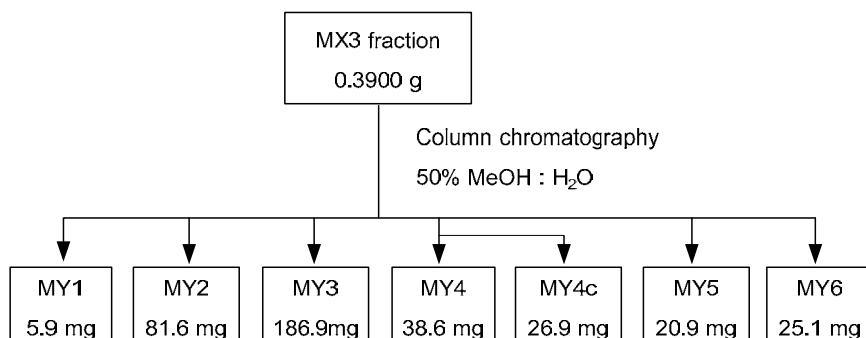
รูปที่ 87. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MX1-MX7

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.25 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-X3 (MX3)

นำส่วนของสารสกัด MX3 น้ำหนัก 0.3900 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคที่เป็น octadecyl silane (C18) (40 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O : MeOH (400 mL), หลังจาก รวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (MY1-MY6) ดังรูปที่ 88

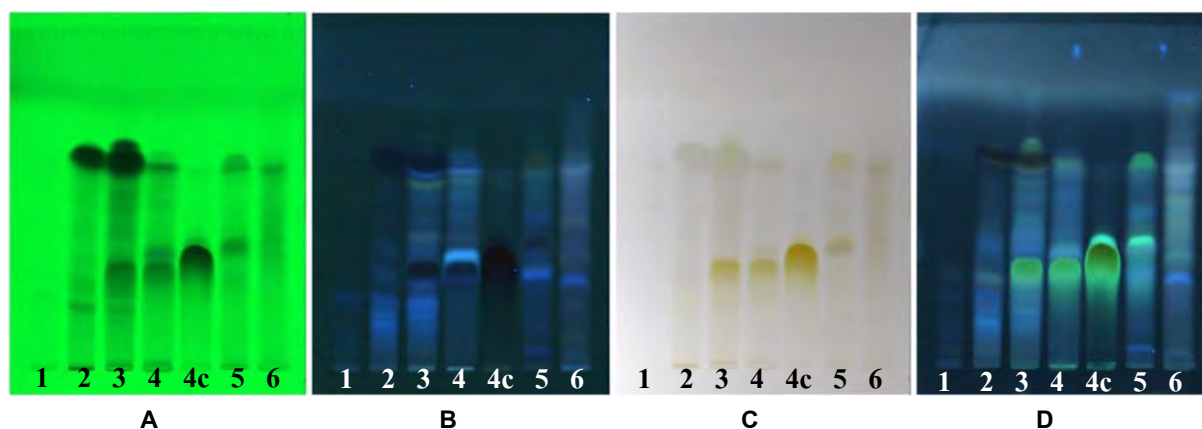


รูปที่ 88. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-X3 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MY1-MY6 และผลึก MY4c แสดงในตารางที่ 49 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions และผลึกที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 89

ตารางที่ 49. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MY1-MY6

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MY1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	5.9	สารหนืดสีน้ำตาล
MY2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	81.6	สารหนืดสีน้ำตาล
MY3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	186.9	ผงสีเหลือง
MY4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	38.6	ผงสีเหลือง
MY4c	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	26.9	ผลึกสีเหลือง
MY5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	20.9	ผงสีเหลือง
MY6	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	25.1	สารหนืดสีน้ำตาล



รูปที่ 89. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MY1-MY6

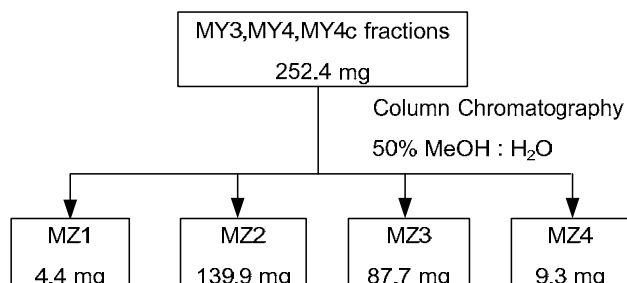
Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



#### 4.3.2.26 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของของส่วนของสารสกัด MeOH-Y3, Y4 และ Y4c (MY3+MY4+MY4c)

นำส่วนของสารสกัด MY3, MY4 และ MY4c น้ำหนักรวม 252.4 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น octadecyl silane (C18, 40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O : MeOH (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 4 fractions (MZ1-MZ4) ดังรูปที่ 90

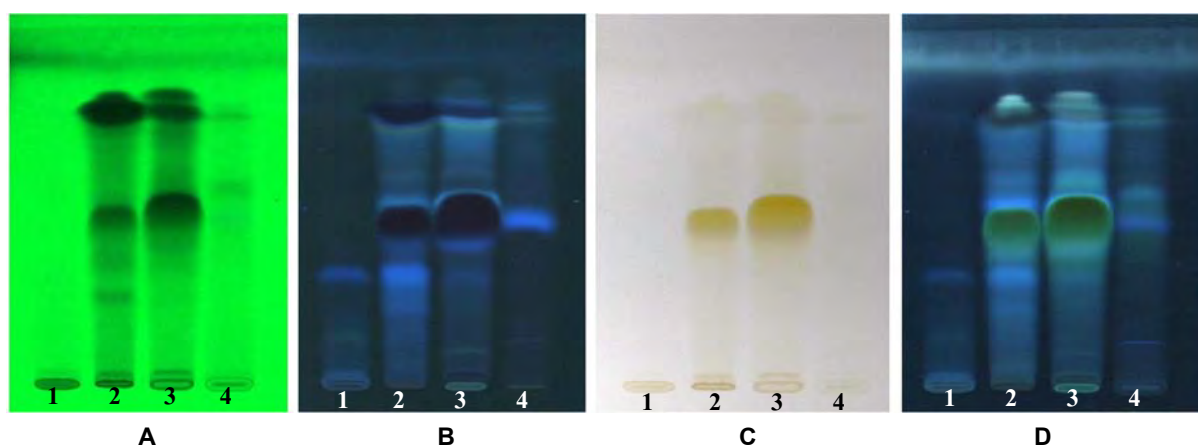


รูปที่ 90. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-Y3, Y4 และ Y4c ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MZ1-MZ4 แสดงในตารางที่ 50 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 4 fractions แสดงดังรูปที่ 91

ตารางที่ 50. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MZ1-MZ4

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MZ1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	4.4	สารเหนียวสีน้ำตาล
MZ2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	139.9	สารเหนียวสีน้ำตาล
MZ3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	87.7	สารเหนียวสีน้ำตาล
MZ4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	9.3	สารเหนียวสีน้ำตาล



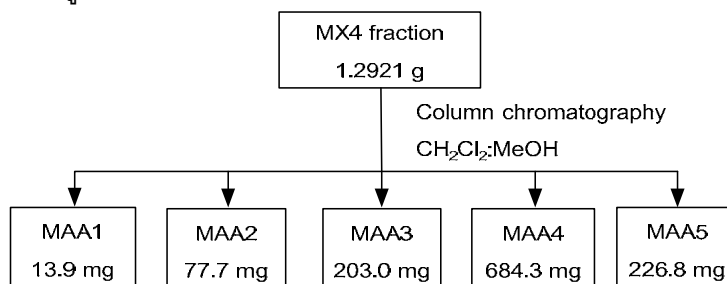
รูปที่ 91. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MZ1-MZ4

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.27 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-X4 (MX4)

นำส่วนของสารสกัด MX4 น้ำหนัก 1.2921 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 25 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1200 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1200 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 300 mL และ 100% MeOH (800 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (MAA1-MAA5) ดังรูปที่ 92

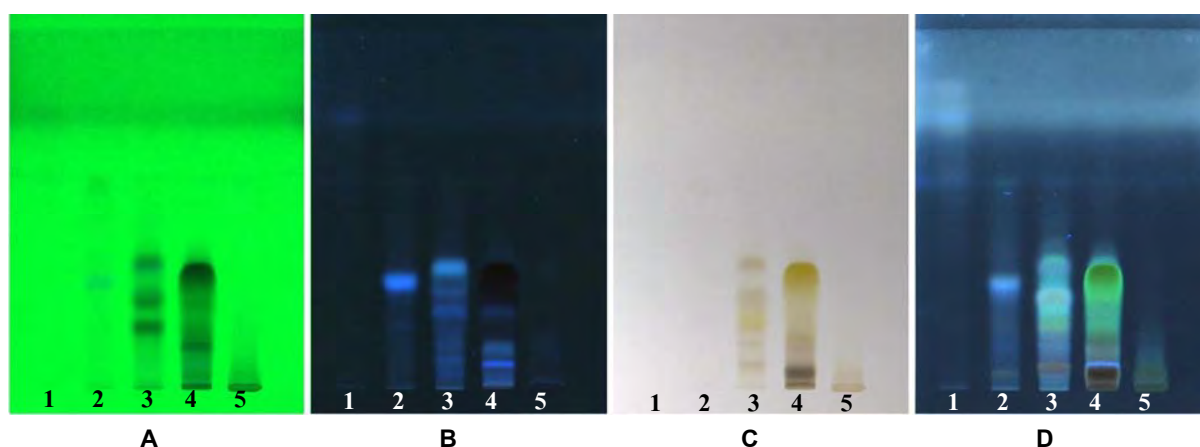


รูปที่ 92. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-X4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MAA1-MAA5 แสดงในตารางที่ 51 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 93

ตารางที่ 51. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MAA1-MAA5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MAA1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 400 ml	13.9	สารหนืดสีน้ำตาล
MAA2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L	77.7	สารหนืดสีน้ำตาล
MAA3	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	203	สารหนืดสีน้ำตาล
MAA4	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.3 L – 30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.15 L	684.3	สารหนืดสีน้ำตาล
MAA5	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L – 100% MeOH	226.8	สารหนืดสีน้ำตาลเขียว



รูปที่ 93. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MAA1-MAA5

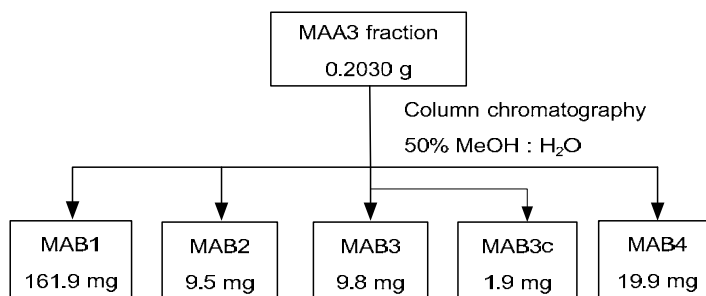
Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



#### 4.3.2.28 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-AA3

นำส่วนของสารสกัด MZ3 น้ำหนัก 0.2030 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น octadecyl silane (C18) (40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O : MeOH (400 mL) หลังจากการรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 4 fractions (MAB1-MAB4) ดังรูปที่ 94

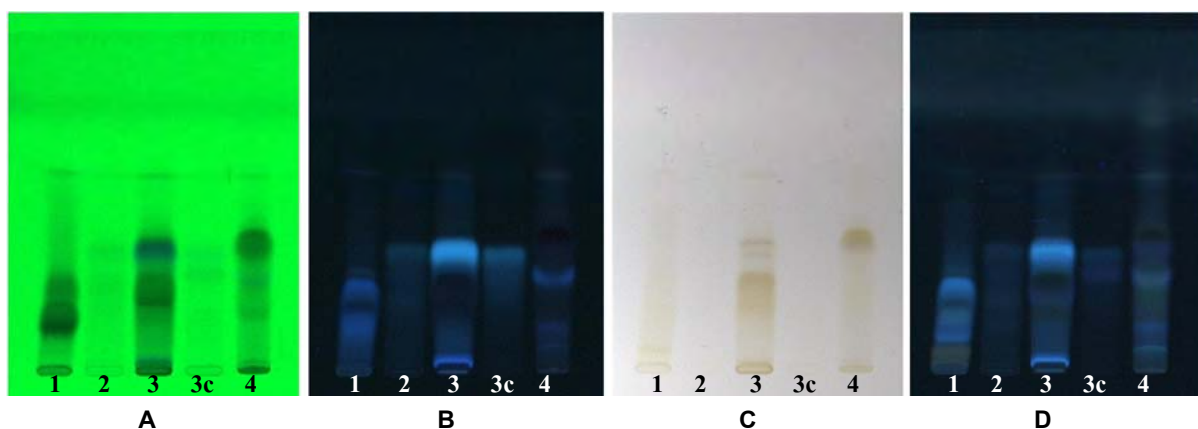


รูปที่ 94. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-AA3 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MAB1-MAB4 และผลึก MAB3c แสดงในตารางที่ 52 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 4 fractions และผลึกที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 95

ตารางที่ 52. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MAB1-MAB4

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MAB1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	161.9	สารเหนียวสีน้ำตาล
MAB2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	9.5	ผงสีเหลืองอ่อน
MAB3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	9.8	ผงสีเหลืองอ่อน
MAB3c	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	1.9	ผลึกสีเหลืองอ่อน
MAB4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	19.9	ผงสีเหลืองอ่อน



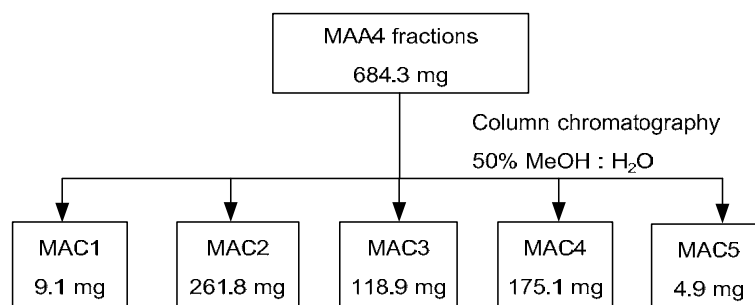
รูปที่ 95. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MAB1-MAB4

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.29 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-AA4

นำส่วนของสารสกัด MAA4 น้ำหนัก 0.6843 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น octadecyl silane (C18, 40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O:MeOH (400 mL) หลังจากการรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (MAC1-MAC5) ดังรูปที่ 96

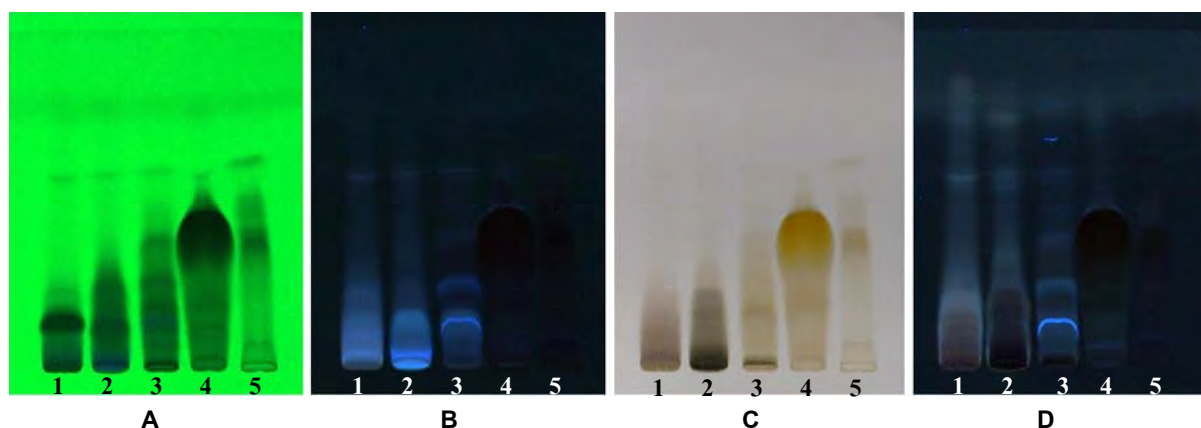


รูปที่ 96. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-AA4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MAC1-MAC5 แสดงในตารางที่ 53 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 97

ตารางที่ 53. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MAC1-MAC5

Fraction	ภูมิภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะสารสกัด
MAB1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	9.1	สารหนืดสีน้ำตาล
MAB2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	261.8	สารหนืดสีน้ำตาล
MAB3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	118.9	สารหนืดสีน้ำตาล
MAB4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	175.1	สารหนืดสีน้ำตาลมีตะกอน
MAB5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	4.9	ผงสีเหลืองอ่อน



รูปที่ 97. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MAC1-MAC5

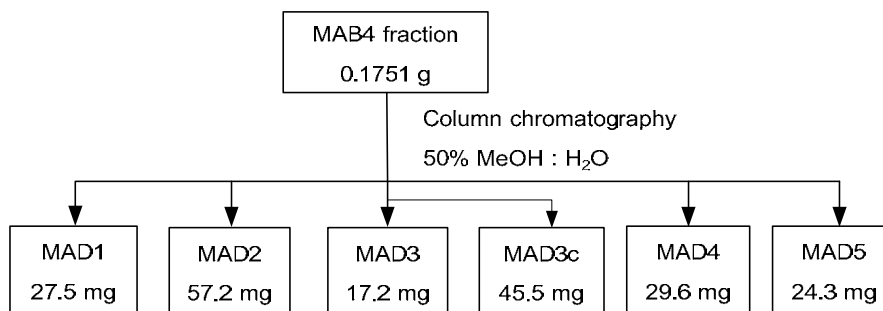
Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 4.3.2.30 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-AC4

นำส่วนของสารสกัด MAC4 น้ำหนัก 175.1 กรัม มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ภูมิภาคคงที่เป็น octadecyl silane (40 g) และใช้ภูมิภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 50% H<sub>2</sub>O : MeOH (400 mL) หลังจากการรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (MAD1-MAD5) ดังรูปที่ 98

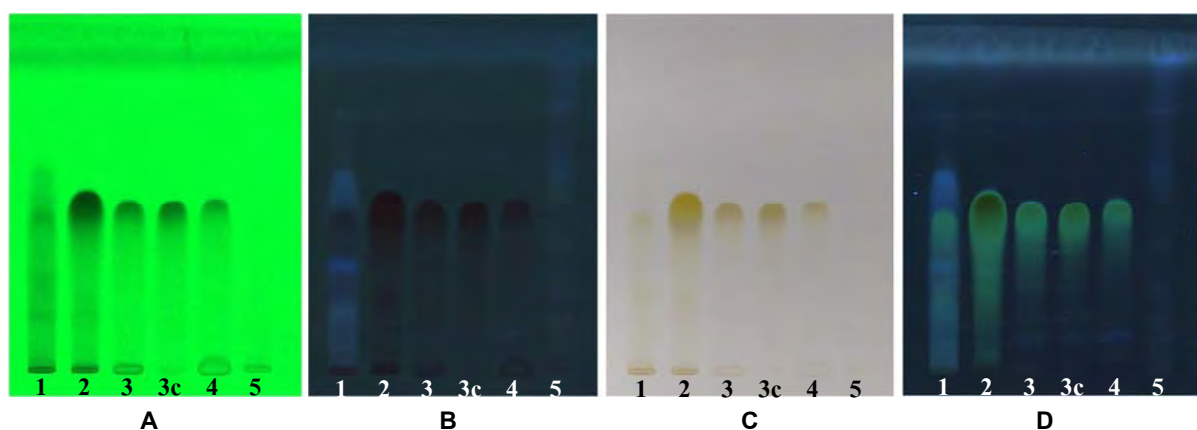
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MAD1-MAD5 และผลึก MAD3c แสดงในตารางที่ 54 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions และผลึกที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 99



รูปที่ 98. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-AC4 ด้วย column chromatography

ตารางที่ 54. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MAD1-MAD5

Fraction	วิฤภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MAD1	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0275	คราบสีน้ำตาล
MAD2	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0572	คราบสีน้ำตาล
MAD3	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0172	ผงสีเหลืองอ่อน
MAD3c	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0454	ผลึกสีเหลือง
MAD4	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0296	ผงสีเหลือง
MAD5	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.0243	ผงสีเหลืองเข้ม



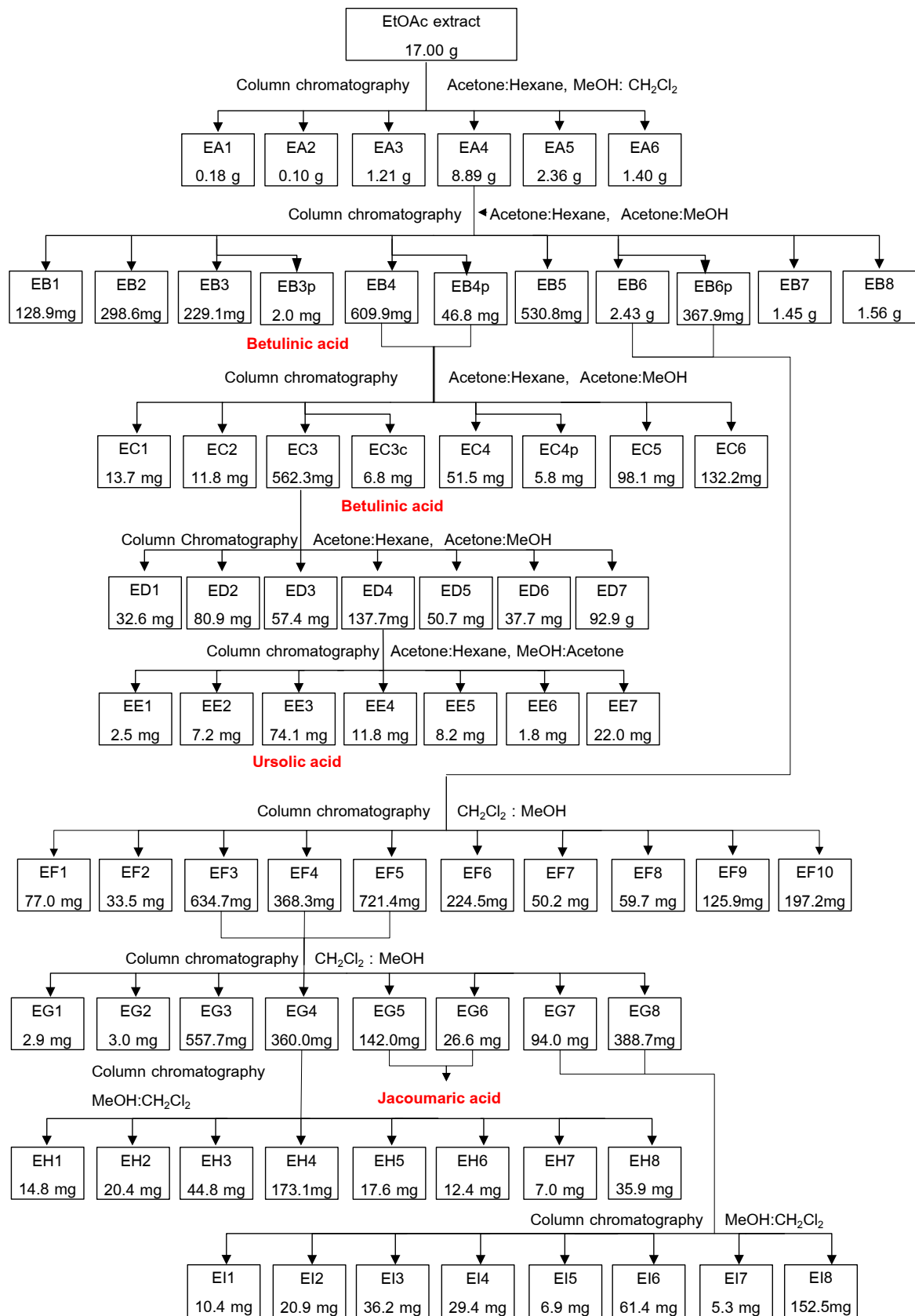
รูปที่ 99. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MAD1-MAD5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 0.1% formic acid

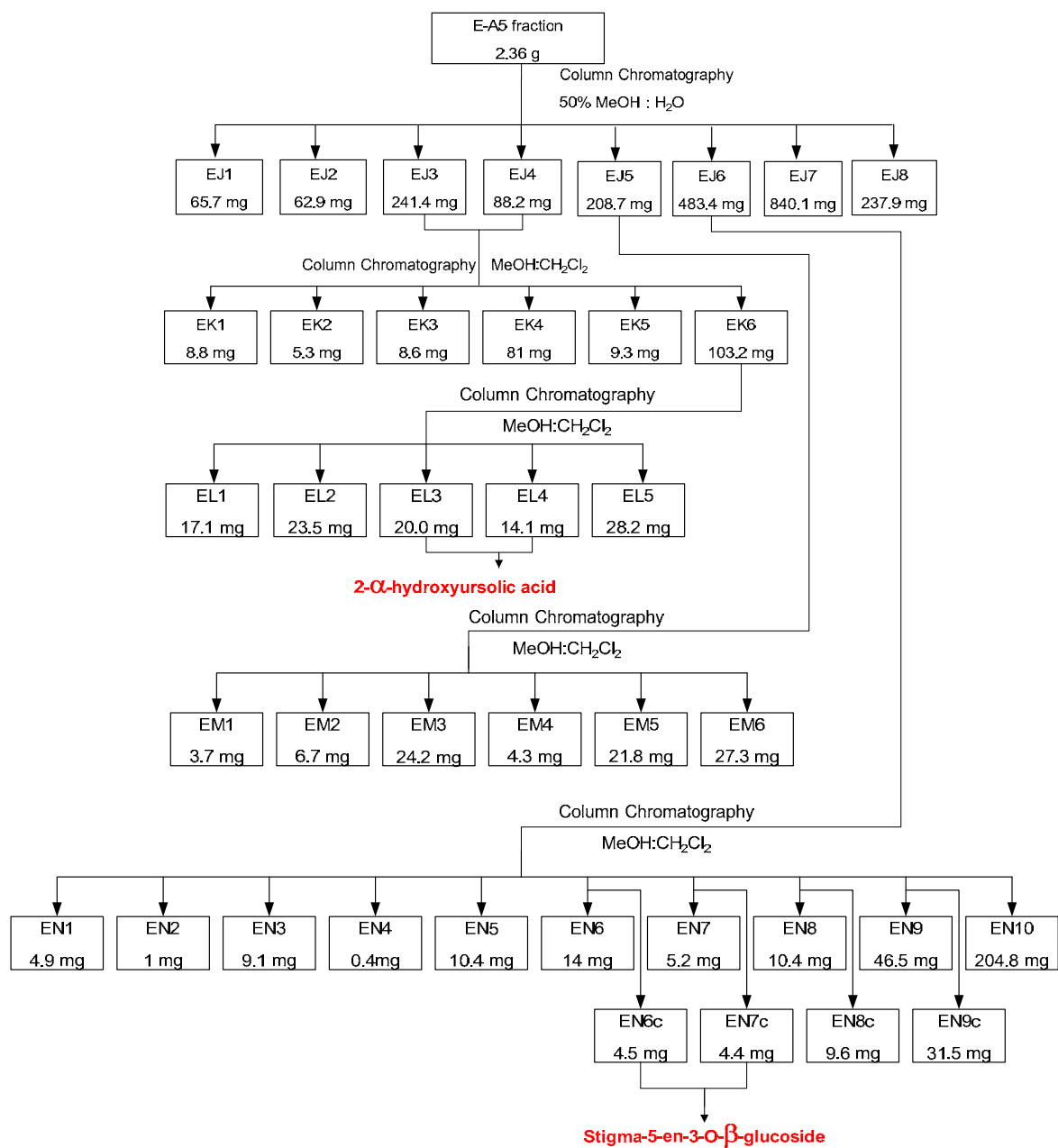
Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

ผลึกสีเหลืองที่ได้จากส่วนของสารสกัด MAD3 (MAD3c) น้ำหนัก 45.4 มิลลิกรัม มีลักษณะบน NMR spectra และ TLC เหมือนกับ MT3c มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน จึงให้เป็น compound 7

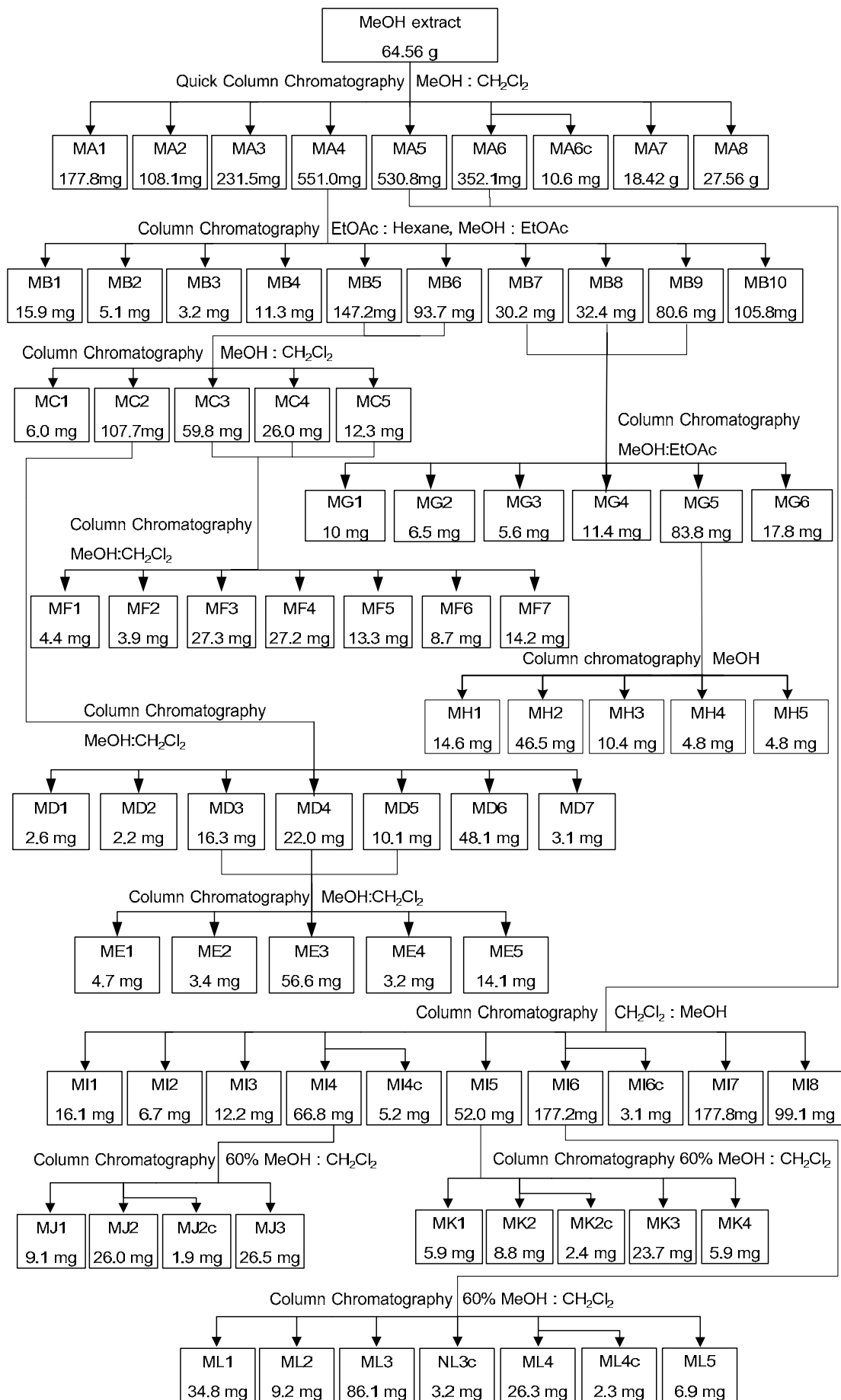
ดังนั้นการสกัดแยกสารจากยอดเสม็ดขุนได้สารบริสุทธิ์ 8 ชนิด ดังแสดงแผนผังการแยกรูปที่ 100-101 โดยสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต สามารถแยกได้สารในกลุ่ม terpenoid 5 ชนิด คือ betulinic acid (1), ursolic acid (2), jacoumaric acid (3), 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid (4) และ stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (5) และสารสกัดชั้นเมทานอลสามารถแยกได้สารในกลุ่ม polyphenol อีก 3 ชนิด คือ gallic acid (6), myricetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (7) และ quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (8)



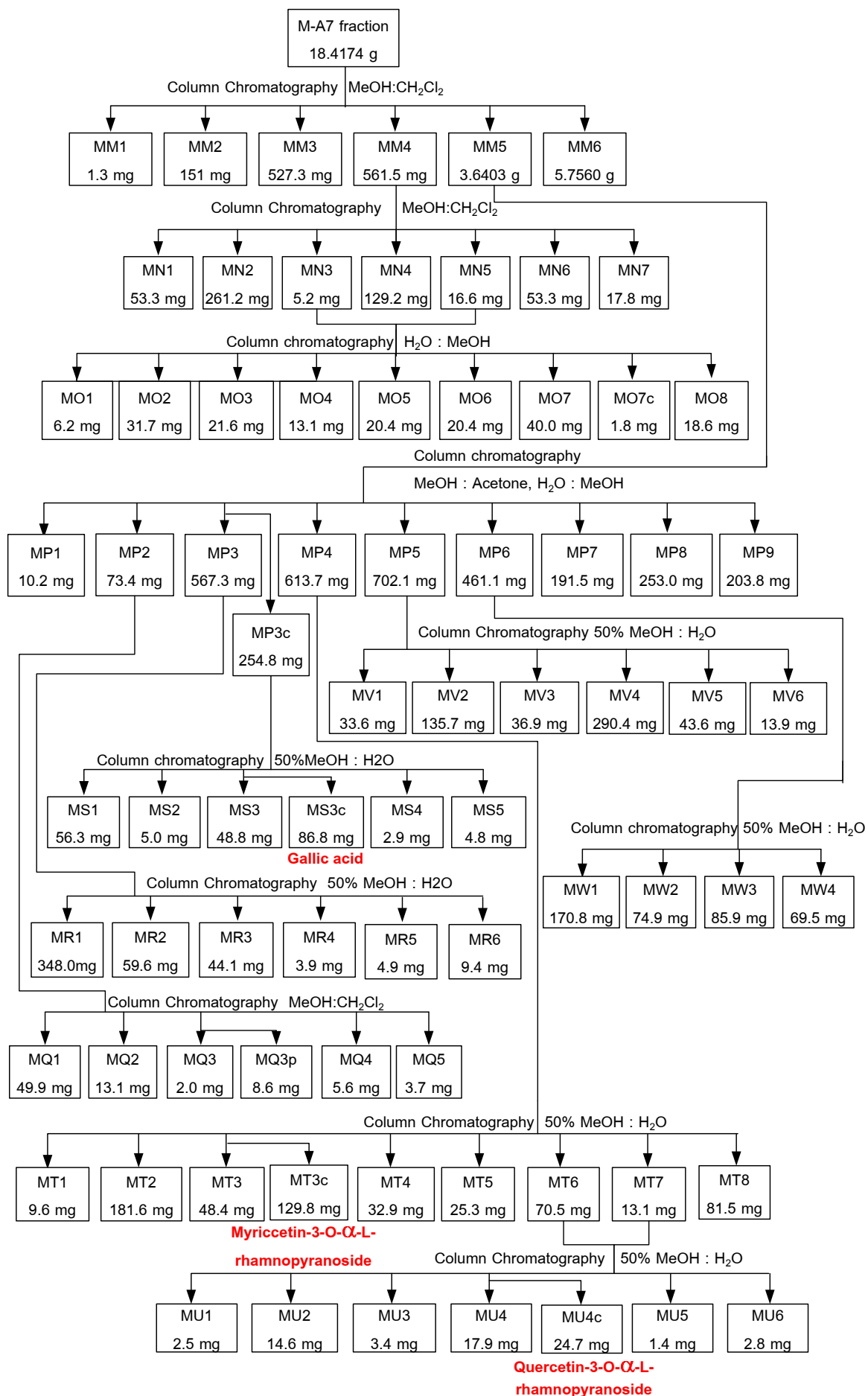
รูปที่ 100. แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของยอดเสม็ดชัน



รูปที่ 100. (ต่อ) แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของยอดเสม็ดชุม



รูปที่ 101. แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลของยอดเสม็ดชุน



รูปที่ 101. (ต่อ) แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลของยอดเสมีดชุมชน





Physical characteristics: white needles from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, m.p. 278.0-279.0 °C

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3600-3200 (3451), 2942, 2869, 1687, 1639, 1579, 1453, 1376, 1321, 1299, 1236, 1188, 1108, 1044, 984, 972, 944, 887, 741.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ : +5.16° (c 1.0, pyridine) [(Lee, 2003)  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : +7.8° (c 0.9, pyridine)]

EIMS  $m/z$  (% relative intensity): 456 [M]<sup>+</sup> (4), 411 (8), 381 (8), 248 (39), 219 (15), 203 (55), 189 (100).

HR-ESI-MS:  $m/z$  found: 479.3498 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>Na, 479.3501.

ตารางที่ 55. <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic data of compound 1 และ betulinic acid (Peng, 1998)

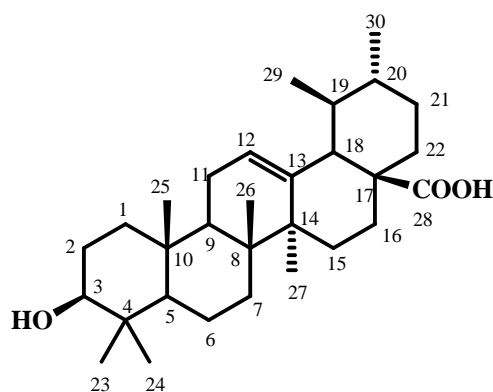
Positions	EtOAc-B3p <sup>*</sup>		Betulinic acid <sup>**</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))
1	39.34	1.65 (1H, dt, 13.0, 3.3) 0.97 (1H, m)	39.3	0.99 (m) 1.67 (br d, 12.9)
2	28.34	1.85 (2H, m)	28.3	1.85 (m)
3	78.19	3.45 (1H, dd, 8.9, 7.2)	78.1	3.45 (t, 7.2)
4	39.57	-	39.5	-
5	55.98	0.81 (1H, m)	56.0	0.82 (m)
6	18.83	1.54 (1H, m) 1.40 (1H, m)	18.8	1.56 (m) 1.38 (m)
7	34.88	1.39 (2H, m)	34.9	1.45 (m) 1.38 (m)
8	41.17	-	41.1	-
9	51.01	1.40 (1H, m)	51.0	1.38 (m)
10	37.57	-	37.6	-
11	21.26	1.42 (1H, m) 1.20 (1H, m)	21.2	1.43 (m) 1.21 (m)
12	26.17	1.93 (1H, m) 1.20 (1H, m)	26.2	1.21 (m) 1.94 (m)
13	38.67	2.73 (1H, td, 11.5, 3.3)	38.7	2.74 (m)
14	42.90	-	42.9	-
15	30.33	1.87 (1H, m) 1.25 (1H, m)	30.3	1.26 (m) 1.88 (m)
16	32.93	2.62 (1H, br. dt, 12.7, 3.3) 1.54 (1H, m)	32.9	1.55 (m) 2.63 (m)
17	56.69	-	56.6	-
18	49.82	1.75 (1H, t, 11.5)	49.8	1.77 (t, 11.5)
19	47.82	3.53 (1H, m)	47.8	3.52 (m)
20	151.38	-	151.3	-
21	31.26	2.23 (1H, m) 1.54 (1H, m)	31.2	1.53 (m) 2.24 (m)
22	37.63	2.23 (1H, m) 1.54 (1H, m)	37.6	1.57 (m) 2.25 (m)

Positions	EtOAc-B3p <sup>*</sup>		Betulinic acid <sup>**</sup>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))
23	28.72	1.22 (3H, s)	28.7	1.22 (s)
24	16.39	1.00 (3H, s)	16.3	1.00 (s)
25	16.47	0.81 (3H, s)	16.4	0.83 (s)
26	16.47	1.05 (3H, s)	16.4	1.06 (s)
27	14.95	1.06 (3H, s)	14.9	1.07 (s)
28	178.93	-	178.8	-
29	110.00	4.77 (1H, br. s)	109.9	4.95 (s)
		4.94 (1H, br. s)		4.77 (s)
30	21.26	1.78 (3H, s)	19.5	1.79 (s)

<sup>\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub>.

<sup>\*\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (181.05 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (719.95 MHz) were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub>.

4.4.2 ของแข็งสีขาวที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด EtOAc-E3 สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น ursolic acid ดังรูปที่ 103 โดยเปรียบเทียบข้อมูล <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR (ใน DMSO-*d*<sub>6</sub>) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Kriwacki, 1989) ดังตารางที่ 56



รูปที่ 103. โครงสร้าง ursolic acid

Physical characteristics: white powder from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, m.p. 235.0-240.0 °C

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3600-3200 (3432), 2950, 2871, 1690, 1457, 1388, 1285, 1028, 998.

$[\alpha]_D^{24}$ : +40.1 ° (c 0.5, methanol) [(Taketa, 2004)  $[\alpha]_D^{20}$ : +21.4 ° (c 0.4, methanol)]

EIMS *m/z* (% relative intensity): 456 [M]<sup>+</sup> (2), 248 (100), 219 (24), 203 (71), 189 (22), 161 (16), 133 (2), 119 (18), 91(26), 55 (11)

HR-ESI-MS: *m/z*found: 479.3505 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>Na, 456.3591.

ตารางที่ 56. <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic data of compound 2 และ ursolic acid (Kriwacki, 1989)

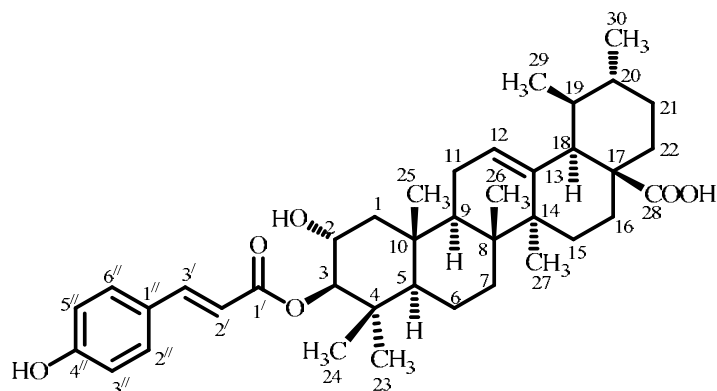
Positions	EtOAc-E3 C <sup>*</sup>		ursolic acid <sup>**</sup>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))
1	38.26	0.90 (1H, m)	39.1	0.95
		1.51 (1H, m)		1.52
2	26.98	1.45 (2H, m)	28.1	1.82
3	76.87	2.99 (1H, m)	78.1	3.46
4	38.38	-	39.5	-

Positions	EtOAc-E3 C <sup>*</sup>		ursolic acid <sup>**</sup>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))
5	54.81	0.65 (1H, m)	55.8	0.88
6	18.00	1.45 (1H, m)	18.8	1.56
		1.28 (1H, m)		1.33
7	32.72	1.43 (1H, m)	33.6	1.55
		1.25 (1H, m)		1.35
8	41.65	-	39.5	-
9	47.04	1.45 (1H, m)	48.1	1.62
10	36.33	-	37.3	-
11	22.86	1.84 (2H, m)	23.6	1.94
12	124.58	5.11 (1H, t, 3.0)	125.7	5.50
13	138.20	-	139.3	-
14	41.65	-	42.5	-
15	27.55	0.98 (1H, m)	28.7	1.20
		1.79 (1H, m)		2.33
16	23.82	1.90 (1H, m)	24.9	2.12
		1.51 (1H, m)		1.97
17	46.84	-	48.1	-
18	52.40	2.09 (1H, d, 11.0)	53.6	2.62
19	38.46	1.51 (1H, m)	39.5	1.45
20	38.55	0.97 (1H, m)	39.4	0.93
21	30.20	1.43 (2H, m)	31.1	1.40
22	36.53	1.53 (2H, m)	37.5	1.95
23	28.26	0.88 (3H, s)	28.8	1.23
24	16.10	0.73 (3H, s)	16.5	1.01
25	15.22	0.85 (3H, s)	15.7	0.87
26	17.00	0.66 (3H, s)	17.5	1.04
27	23.27	1.02 (3H, s)	23.9	1.21
28	178.28		179.8	
29	16.92	0.79 (3H, d, 6.4)	17.5	0.98
30	21.10	0.98 (3H, d, 9.8)	21.4	0.93

<sup>\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

<sup>\*\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub>.

4.4.3 ของแข็งสีขาวที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด EtOAc-G5 และ EtOAc-G6 สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น 3β-O-trans-p-Coumaroyl-2α-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid (Jacoumaric acid) ดังรูปที่ 104 โดยเปรียบเทียบข้อมูล <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR (ใน DMSO-*d*<sub>6</sub>) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Lee, 2005) ดังตารางที่ 57



รูปที่ 104. โครงสร้าง Jacoumaric acid

Physical characteristics: white powder from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, m.p. 243.0-245.0 °C

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3550-3100 (3325), 2970, 2944, 2870, 1695, 1634, 1606, 1515, 1455, 1368, 1310, 1268, 1202, 1169, 1108, 1045, 982, 960, 944, 830 (ref 2)

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 209 (sh, 4.48), 225 (4.41), 301 (sh, 4.58), 312 (4.62),

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$  : +13.3 ° (c 0.5, methanol), [(Numata,1989),  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  : +18 ° (c 0.4, methanol)].

EIMS  $m/z$  (% relative intensity): 454(5), 409(5), 248(40), 133(100)

HR-ESI-MS:  $m/z$  found: 641.3816  $[M+Na]^+$

ตารางที่ 57. <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic data of compound 3 และ Jacoumaric acid (Lee, 2005)

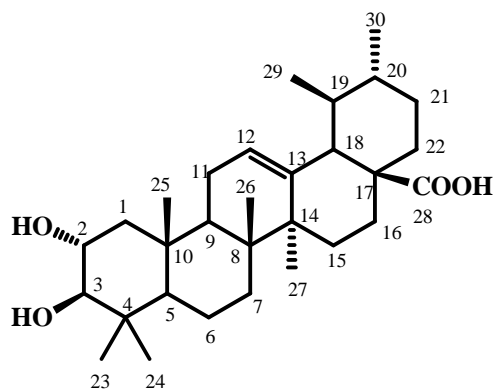
Positions	EtOAc-G5 *		Jacoumaric acid **	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J (Hz))	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J (Hz))
1	47.62	0.96 (1H, m) 1.87 (1H, m)	48.3	
2	64.78	3.68 (1H, m)	66.7	4.32 (1H, dt, 4.0, 10.0)
3	83.61	4.51 (1H, d, 9.0)	85.4	5.28 (1H, d, 10.0)
4	39.00	-	40.2	-
5	54.39	0.91 (1H, m)	55.9	
6	17.88	1.45 (1H, m) 1.35 (1H, m)	19.0	
7	32.47	1.25 (2H, m)	33.7	
8	41.71	-	40.3	-
9	46.87	1.55 (1H, m)	48.9	
10	37.48	-	38.7	-
11	22.94	1.87 (1H, m) 1.84 (1H, m)	24.1	
12	124.35	5.14 (1H, br t, 3.4)	125.8	5.49 (1H, br s)
13	138.31	-	139.9	-
14	41.71	-	42.9	-
15	27.48	1.78 (1H, m) 0.98 (1H, m)	29.0	
16	23.78	1.93 (1H, m)	25.3	

Positions	EtOAc-G5 *		Jacoumaric acid **	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))
17	46.87	-	48.4	-
18	52.36	2.11 (1H, d, 11.3)	53.9	2.65 (1H, d, 11.0)
19	38.40	0.91 (1H, m)	39.9	
20	38.48	0.91 (1H, m)	39.8	
21	30.15	1.41 (2H, m)	31.5	
22	36.29	1.57 (1H, m)	37.9	
		1.53 (1H, m)		
23	28.47	0.79 (3H, s)	29.4	1.08 (3H, s)
24	17.83	0.84 (3H, s)	18.7	1.06 (3H, s)
25	16.38	0.96 (3H, s)	17.3	1.01 (3H, s)
26	16.88	0.74 (3H, s)	18.0	1.06 (3H, s)
27	23.23	1.06 (3H, s)	24.4	1.24 (3H, s)
28	178.25	-	180.5	-
29	17.02	0.82 (3H, d, 6.3)	17.8	1.06 (3H, d, 6.0)
30	21.05	0.91 (3H, s)	21.9	0.98 (3H, d, 6.0)
1'	166.65	-	168.4	-
2'	115.11	6.38 (1H, d, 15.9)	117.3	6.69 (1H, d, 15)
3'	143.96	7.52 (1H, d, 15.9)	145.3	8.02 (1H, d, 15)
1''	125.24	-	126.6	-
2''	130.09	7.53 (1H, d, 8.8)	131.1	7.57 (1H, d, 7.5)
3''	115.75	6.78 (1H, d, 8.8)	116.5	7.18 (1H, d, 7.5)
4''	159.60	-	161.8	-
5''	115.75	6.78 (1H, d, 8.8)	116.5	7.57 (1H, d, 7.5)
6''	130.09	7.53 (1H, d, 8.8)	131.1	7.18 (1H, d, 7.5)
2-OH		4.54 (1H, d, 5.6)		
4''-OH		10.00 (1H, s)		

\* Both  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) and  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz) were recorded in DMSO- $d_6$ .

\*\* Both  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz) and  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz) were recorded in pyridine- $d_5$ .

4.4.4 ของแข็งสีขาวที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด EtOAc-L3c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid (corosolic acid) ดังรูปที่ 105 โดยเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H}$ -NMR และ  $^{13}\text{C}$ -NMR (ใน DMSO- $d_6$ ) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Jang, 2006) ดังตารางที่ 58



รูปที่ 105. โครงสร้าง 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid

Physical characteristics: white powder from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, m.p. 238.1-240.3 °C

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3600-3200 (3448), 2927, 1701, 1459, 1378, 1243, 1050

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ : +16.75 ° (c 1.0, methanol) [(Thuong, 2006)  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ : +45.6 ° (c 0.1, methanol)]

EIMS  $m/z$ : 248.01 (100), 219 (32), 203 (75), 133 (87)

HR-ESI-MS:  $m/z$  found: 495.3700  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>Na, 472.3540

ตารางที่ 58. <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic data of compound 4 and 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid (Jang, 2006)

Positions	EtOAc-L3 C <sup>+</sup>		2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid <sup>**</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))
1	47.10	0.75 (1H, m) 1.76 (1H, m)	48.4	
2	67.24	3.46 (1H, m)	69.0	4.09 (1H, ddd, 11.4, 9.3, 4.5)
3	82.33	2.72 (1H, d, 9.4)	84.2	3.40 (1H, d, 9.3)
4	39.83	-	40.2	-
5	54.80	0.74 (1H, m)	56.3	
6	18.08	1.44 (1H, m) 1.30 (1H, m)	19.2	
7	32.69	1.44 (1H, m) 1.27 (1H, m)	33.9	
8	41.76	-	40.4	-
9	47.05	1.49 (1H, m)	48.5	
10	37.60	-	38.8	-
11	23.00	1.85 (2H, dd, 6.9, 3.5)	25.3	
12	124.54	5.12 (1H, br t, 3.5)	125.9	5.48 (1H, t, )
13	138.32	-	139.7	-
14	41.76	-	42.9	-
15	27.56	0.97 (1H, br d, 13.4) 1.78 (1H, m)	29.0	
16	23.86	1.91 (1H, m) 1.52 (1H, m)	24.1	
17	46.90	-	48.5	-

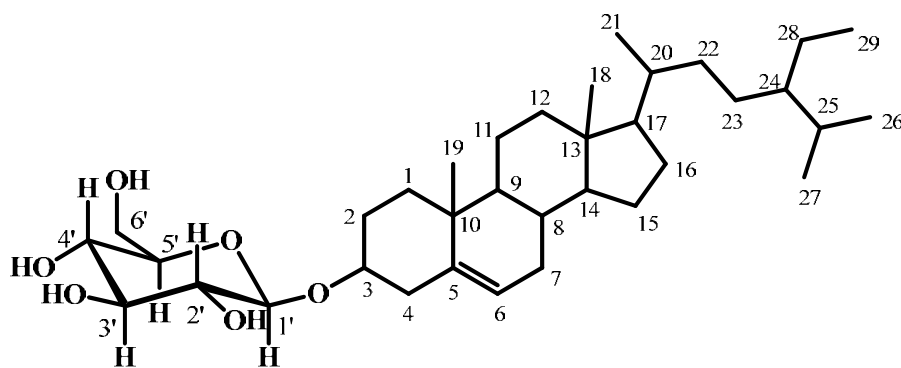


Positions	EtOAc-L3 C <sup>*</sup>		2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid <sup>**</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))
18	52.45	2.09 (1H, d, 11.1)	53.9	2.64 (1H, d, 11.1)
19	38.50	0.90 (1H, m)	39.9	
20	38.56	0.90 (1H, m)	39.8	
21	30.24	1.42 (2H, m)	31.5	
22	36.83	1.56 (1H, m) 1.50 (1H, m)	37.8	
23	28.88	0.90 (3H, s)	29.8	1.29 (3H, s)
24	17.06	0.72 (3H, s)	17.2	1.09 (3H, s)
25	16.48	0.90 (3H, s)	17.9	1.02 (3H, s)
26	17.01	0.68 (3H, s)	18.1	1.00 (3H, s)
27	23.33	1.02 (3H, s)	24.3	1.23 (3H, s)
28	178.41	-	180.3	-
29	17.22	0.80 (3H, d, 6.4)	17.4	0.97 (3H, d, 6.0)
30	21.13	0.90 (3H, br s)	21.8	1.01 (3H, d, 6.6)

\* Both <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

\*\* Both <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub>.

4.4.5 ของแข็งสีขาวที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด EtOAc-N9c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside ดังรูปที่ 106 โดยเปรียบเทียบข้อมูล <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR (ใน pyridine-*d*<sub>5</sub>) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Faizi, 2007) ดังตารางที่ 59



รูปที่ 106. โครงสร้าง stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside

Physical characteristics: white powder from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, m.p. 280-285.0 °C

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3600-3200 (3410.87), 2950, 2920, 1635.88, 1465.25, 1367.07, 11074.35, 1023.53.

$[\alpha]_D^{23}$ : -48.37(c 1, MeOH) [(Faizi, 2001)]  $[\alpha]_D^{27}$ : -40.2° (c 0.35, pyridine)]

EIMS *m/z* (% relative intensity): 576.53 [M]<sup>+</sup> (2), 414.36(9), 397.40(76), 396.34(100), 381.39(26), 255.25(27)

HR-ESI-MS: *m/z* found: 599.4285 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>Na, 559.4288.

ตารางที่ 59.  $^1\text{H}$ -NMR และ  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopic data of compound 5 และ stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (Faizi, 2001)

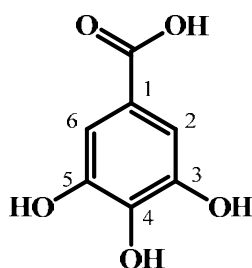
Positions	MeOH-N9c <sup>*</sup>		stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside <sup>**</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))
1	37.56	1.00 (1H, m) 1.75 (1H, m)	37.64	0.98 (1H, m) 1.72 (1H, m)
2	30.33	1.76 (1H, m) 2.14 (1H, br d, 10.7)	30.21	1.75 (1H, m) 2.14 (1H, m)
3	78.23	3.98 (1H, m)	78.38	3.98 (1H, m)
4	39.42	2.49 (1H, br t, 11.1) 2.76 (1H, br d, 11.1)	39.31	2.49 (1H, dt, 1.98, 12.94) 2.72 (1H, ddd, 1.98, 4.69, 12.94)
5	141.00	-	140.95	-
6	121.97	5.37 (1H, br s)	121.90	5.35 (1H, t, 2.5)
7	32.25	1.66 (1H, m) 1.91 (1H, m)	32.15	1.60 (1H, ddd, 2.5, 7.0, 16.0) 1.95 (1H, ddd, 2.5, 7.0, 16.0)
8	32.14	1.39 (1H, m)	32.04	1.36 (1H, m)
9	50.43	0.90 (1H, m)	50.34	0.85 (1H, m)
10	37.00	-	36.08	-
11	21.36	1.45 (2H, m)	21.26	1.42 (2H, m)
12	40.04	1.12 (1H, m) 1.98 (1H, m)	39.95	1.10 (1H, m) 1.98 (1H, dd, 4.3, 12.37)
13	42.56	-	42.47	-
14	56.92	0.98 (1H, m)	56.83	0.95 (1H, m)
15	24.58	1.03 (1H, m) 1.56 (1H, m)	24.48	1.05 (1H, m) 1.57 (1H, m)
16	28.60	1.26 (1H, m) 1.86 (1H, m)	28.50	1.25 (1H, m) 1.85 (1H, m)
17	56.34	1.12 (1H, m)	56.25	1.10 (1H, m)
18	12.05	0.68 (3H, s)	11.95	0.66 (3H, s)
19	19.49	0.96 (3H, s)	19.39	0.94 (3H, s)
20	36.46	1.41 (1H, m)	36.36	1.40 (1H, m)
21	19.09	1.01 (3H, d, 6.3)	18.99	0.98 (3H, d, 2.5)
22	34.30	1.10 (1H, m) 1.41 (1H, m)	34.20	1.10 (1H, m) 1.40 (1H, m)
23	26.50	1.26 (2H, m)	26.40	1.25 (2H, m)
24	46.14	1.01 (1H, m)	46.04	1.00 (1H, m)
25	29.57	1.70 (1H, m)	29.47	1.68 (1H, m)
26	19.30	0.88 (3H, d, 6.4)	19.20	0.84 (3H, d, 7.0)
27	20.04	0.90 (3H, d, 6.4)	19.94	0.86 (3H, d, 7.0)
28	23.48	1.31 (2H, m)	23.38	1.30 (2H, m)
29	12.23	0.93 (3H, t, 7.5)	12.13	0.88 (3H, d, 7.5)
1'	102.65	5.09 (1H, d, 7.7)	102.57	5.04 (1H, d, 7.69)

Positions	MeOH-N9c <sup>*</sup>		stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside <sup>**</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))
2'	75.39	4.09 (1H, br t, 7.6)	75.27	4.04 (1H, dd, 7.5, 7.69)
3'	78.51	4.32 (1H, m)	78.54	4.27 (1H, t, 7.5)
4'	71.79	4.32 (1H, m)	71.67	4.27 (1H, t, 7.5)
5'	78.51	4.01 (1H, m)	78.13	4.91 (1H, d, <i>J</i> = 9.70 Hz)
6'	62.92	4.45 (1H, dd, 11.2, 4.7)	62.82	4.40 (1H, dd, 5.2, 11.77)
		4.60 (1H, br d, 11.2)		4.55 (1H, dd, 2.5, 11.77)

<sup>\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub>.

<sup>\*\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) were recorded in pyridine-*d*<sub>5</sub>.

4.4.6 ผลึกสีขาวที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด MeOH-S3c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น gallic acid ดังรูปที่ 107 โดยเปรียบเทียบข้อมูล <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR (ใน DMSO-*d*<sub>6</sub>) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Said, 2009) ดังตารางที่ 60



รูปที่ 107. โครงสร้าง gallic acid

Physical characteristics: white needles from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, m.p. 258.7 °C

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 270.40(4.08), 227.60(4.14)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3400, 3286, 1701, 1617, 1541, 1450, 1339, 1247, 1026, 866

EIMS *m/z* (% relative intensity): 169.93[M]<sup>+</sup>(100), 148.97(97), 125.04(27)

HR-ESI-MS: *m/z* found: 193.0139 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Na, 193.0113

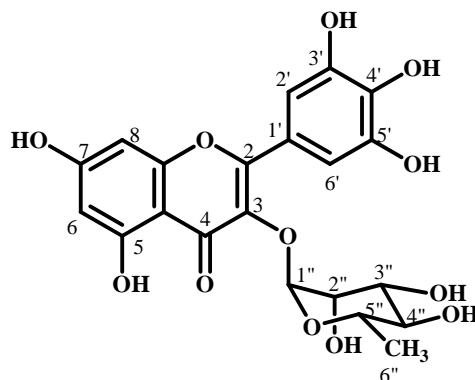
ตารางที่ 60. <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic data of compound 6 และ gallic acid (Said, 2009)

Positions	MeOH-X3C <sup>*</sup>		Gallic acid <sup>**</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))
1	120.6	-	121.0	-
2, 6	108.9	6.91 (2H, s)	109.1	7.15 (2H, s)
3, 5	145.6	-	145.0	-
4	138.2	-	137.7	-
1-COOH	167.7	-	167.2	-

<sup>\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

<sup>\*\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

4.4.7 ผลิตภัณฑ์ที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด MeOH-T3c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น myricetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (myricitrin) ดังรูปที่ 108 โดยเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (ใน DMSO- $d_6$ ) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Sidana, 2013) ดังตารางที่ 61



รูปที่ 108. โครงสร้าง myricitrin

Physical characteristics: yellow powder from MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , m.p. 220.1-221.7

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 353(5.29), 235(5.21)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3600-3400 (3386), 1654, 1604, 1499, 1453, 1345, 1291, 1198, 1164, 1039, 968

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ : -126.16 (c 1.0, methanol) [(De Leo, 2006)  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -120.0° (c 0.6, methanol)]

EIMS  $m/z$  (% relative intensity): 453.55 [ $\text{M}^+$ ] (1), 318.07(100), 153.08(25), 69.07(10)

HR-ESI-MS:  $m/z$  found: 487.0780 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{Na}$   $m/z$  487.0852

ตารางที่ 61.  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  spectroscopic data ของ compound 7 และ myricitrin (Sidana, 2013)

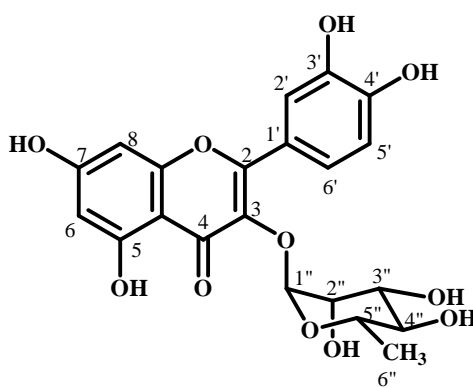
Positions	MeOH-T3C <sup>+</sup>		myricetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside <sup>++</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))
2	156.42	-	158.0	-
3	136.46	-	134.9	-
4	177.80	-	178.2	-
5	161.32	-	161.8	-
6	98.66	6.19 (1H, d, 1.9)	98.4	6.19 (s)
7	164.17	-	164.5	-
8	93.53	6.36 (1H, d, 1.9)	93.3	6.36 (s)
9	157.50	-	157.1	-
10	104.06	-	104.4	-
1'	119.64	-	120.5	-
2'	107.93	6.85 (1H, s)	108.1	7.00 (1H, s)
3'	145.77	-	145.4	-
4'	134.30	-	136.5	-
5'	145.77	-	145.4	-
6'	107.93	6.85 (1H, s)	108.1	7.00 (1H, s)
1''	101.95	5.18 (1H, s)	102.2	5.32 (1H, s)
2''	70.02	3.97 (1H, s)	70.5	4.23 (1H, s)

Positions	MeOH-T3C <sup>*</sup>		myricetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside <sup>**</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))
3''	70.40	3.54 (1H, d, 7.5)	70.6	3.79 (1H, d, 8.4)
4''	71.30	3.24 (1H, t, 9.5)	71.9	3.34 (1H, m)
5''	70.55	3.34 (1H, m)	70.7	3.52 (1H, m)
6''	17.5	0.82 (3H, d, 6.1)	16.3	0.98 (3H, d, 6.4)

\*Both <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) were recorded in DMSO-d<sub>6</sub>.

\*\* Both <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) were recorded in CD<sub>3</sub>OD

4.4.8 ผลึกสีเหลืองที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด MeOH-U4c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) ดังรูปที่ 109 โดยเปรียบเทียบข้อมูล <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR (ใน DMSO-d<sub>6</sub>) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Sidana, 2013) ดังตารางที่ 62



รูปที่ 109. โครงสร้าง quercitrin

Physical characteristics: yellow powder from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 350(5.65), 253(5.73)

FTIR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3600-3400 (3428), 1653, 1610, 1507, 1383, 1203

$[\alpha]_D^{23}$ : -31.28° (c 1, methanol) [(Kiem, 2003)  $[\alpha]_D^{25}$ : -147.0° (c 0.5, methanol)]

EIMS  $m/z$  (% relative intensity): 448.96 [M+H]<sup>+</sup> (0.45), 301.78 [M-rhamnosyl] (100)

HR-ESI-MS:  $m/z$  found: 471.0777 [M+Na]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>Na  $m/z$  471.0903

ตารางที่ 62. <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic data of compound 8 และ quercitrin (Sidana, 2013)

Positions	MeOH-U4C <sup>*</sup>		Quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside <sup>**</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))
2	158.55	-	157.1	-
3	136.25	-	134.8	-
4	179.66	-	179.6	-
5	163.21	-	157.9	-
6	99.85	6.19 (1H, d, 2.0)	98.4	6.20 (1H, s)
7	165.91	-	164.5	-
8	94.74	6.35 (1H, d, 2.0)	93.3	6.37 (1H, s)
9	159.31	-	161.8	-

Positions	MeOH-U4C <sup>*</sup>		Quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside <sup>**</sup>	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., J (Hz))
10	105.92	-	104.5	-
1'	123.02	-	121.4	-
2'	116.40	7.33 (1H, d, 2.1)	114.9	7.33 (1H, s)
3'	146.42	-	145.0	-
4'	149.80	-	148.4	-
5'	116.98	6.90 (1H, d, 8.3)	115.5	6.90 (1H, d, 8.0)
6'	122.88	7.30 (1H, dd, 8.3, 2.1)	121.5	7.30 (1H, d, 8.4)
1''	103.56	5.3 (1H, d, 1.6)	102.1	5.34 (1H, s)
2''	72.03	4.21 (1H, dd, 3.28, 1.6)	70.5	4.21 (1H, s)
3''	72.17	3.74 (1H, dd, 9.4, 3.4)	70.6	3.74 (1H, dd, 9.2, 1.2)
4''	73.30	3.41 (1H, m)	71.8	3.45-3.38 (1H, m)
5''	71.92	3.33 (1H, m)	70.7	3.45-3.38 (1H, m)
6''	17.65	0.93 (3H, d, 6.1)	16.2	0.94, (3H, d, 6.0)

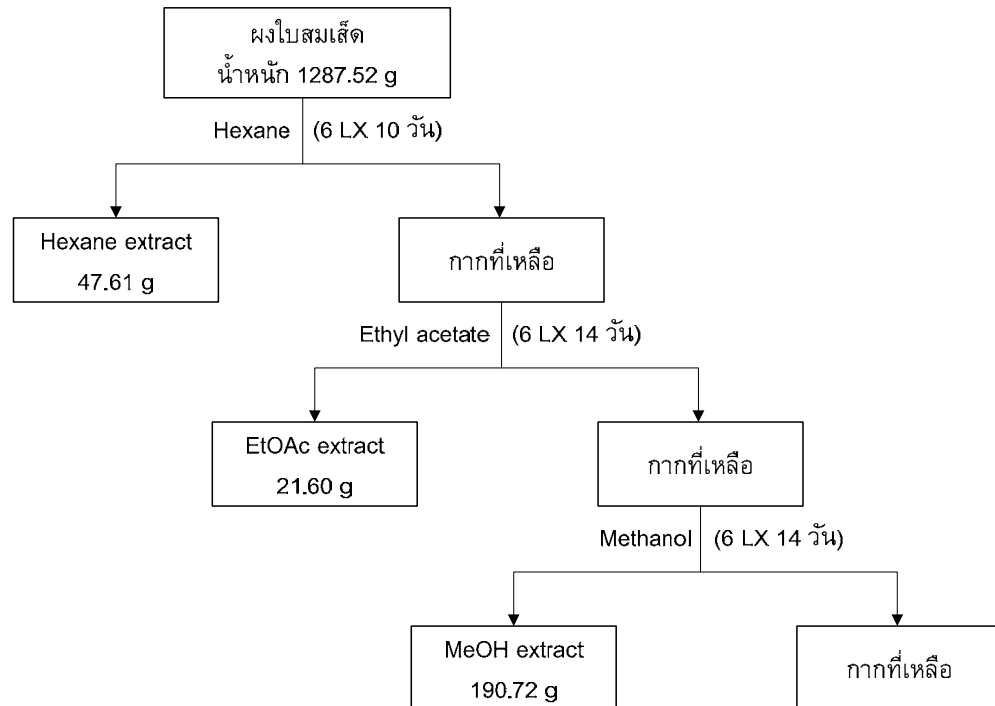
\*Both <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

\*\* Both <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) and 1H-NMR (400 MHz) were recorded in CD<sub>3</sub>OD

## บทที่ 5 ผลการสกัดและแยกสารออกฤทธิ์จากใบสมเล็ด (*Glochidion hypoleucum*)

### 5.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

สกัดผงใบสมเล็ดน้ำหนัก 1287.52 กรัม โดยวิธี Soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 110 แล้วระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดที่ได้ด้วยเครื่อง Rotary evaporator และหลังจากทำให้แห้งมากขึ้นด้วยเครื่อง Freeze dryer ได้สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอลตามลำดับ ซึ่งปริมาณและลักษณะสารสกัดแสดงดังตารางที่ 63



รูปที่ 110. ขั้นตอนการสกัดใบสมเล็ดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล

ตารางที่ 63. ปริมาณและลักษณะสารสกัดใบสมเล็ดที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

พืช	น้ำหนักพืชแห้ง (g)	ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัด (g)	% yield	ลักษณะสารสกัด
สมเล็ด	1287.52	เฮกเซน	47.61	3.70	ของแข็งสีเขียวปนขาว
		เอทิลอะซิเตต	21.60	1.16	ของแข็งสีเขียว
		เมทานอล	190.72	14.81	ของแข็งสีน้ำตาลแดง

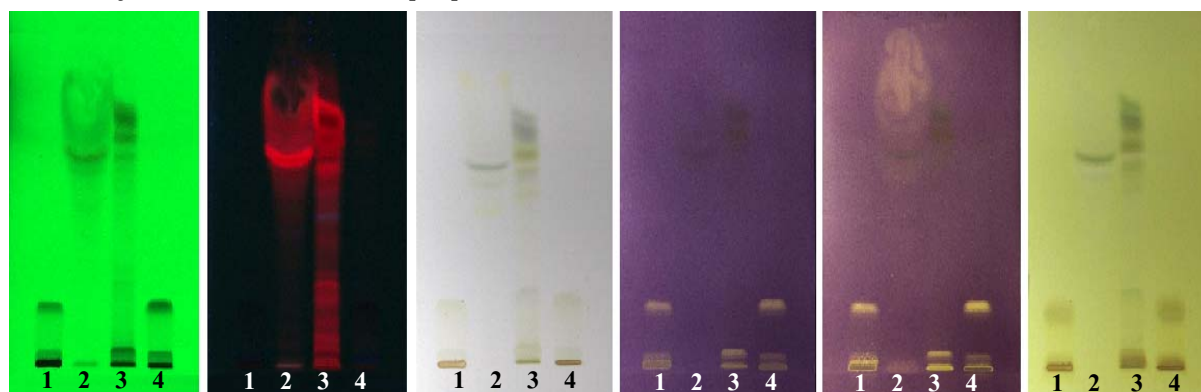
### 5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบสมเล็ดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดด้วยวิธี TLC โดยใช้สารละลายของสารสกัดความเข้มข้น 50 mg/mL ปริมาตร 5  $\mu$ L ขีดบนวัสดุภาคกรองที่คือ Silica gel 60 F<sub>254</sub> ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแสดงในรูปที่ 111

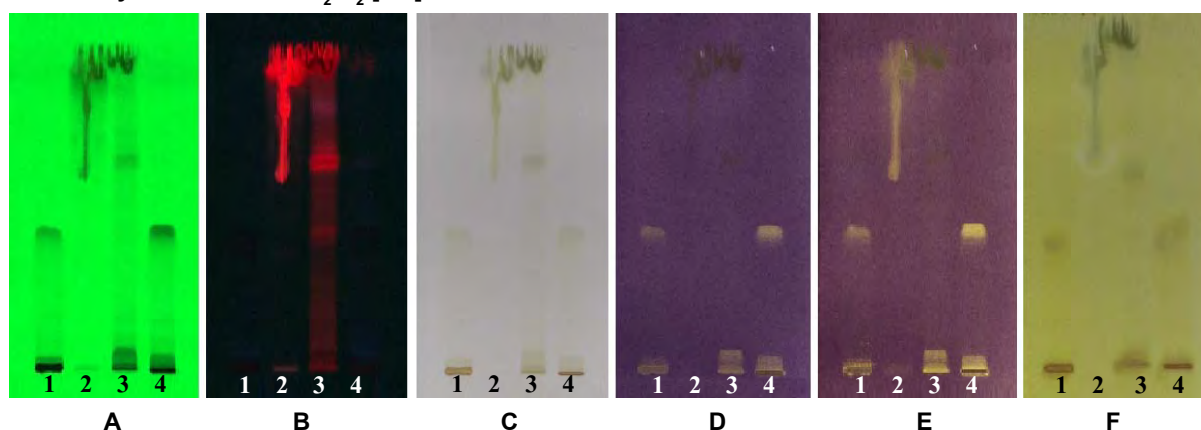
การทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ด้วยวิธี Ellman's method และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบสมเล็ดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยทดสอบใน microplate (ทดสอบฤทธิ์โดยโครงการย่อยอื่น) และหาค่าร้อยละของการยับยั้งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบสมเล็ดที่ความเข้มข้น 300  $\mu$ g/mL และ 50  $\mu$ g/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 64



Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]



รูปที่ 111. TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบสมเล็ด 1 = 80% MeOH extract, 2 = Hexane extract, 3 = EtOAc extract, 4 = MeOH extract, Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = Anti-DPPH at 0 hr, E = Anti-DPPH at 24 hr, F = Anti-AChE

ตารางที่ 64. ค่าร้อยละการยับยั้งของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดใบสมเล็ด

สารสกัด ใบสมเล็ด	% inhibition ของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดใบสมเล็ด ที่ความเข้มข้น 300 µg/mL	% inhibition อนุมูลอิสระ DPPH ที่ ความเข้มข้น 50 µg/mL
เฮกเซน	*	*
เอทิลอะซิเตต	*	74.38 ± 0.58
เมทานอล	76.98 ± 2.84	87.82 ± 0.79

\* ไม่สามารถหาค่าร้อยละของการยับยั้งได้เนื่องจากมีปัญหาด้านการละลายของสารสกัด

จากรูปที่ 111 พบว่าสารสกัดใบสมเล็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารที่มีขั้วสูงของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและเมทานอลมีฤทธิ์ดี โดยเปลี่ยนสีม่วงอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสีเหลืองทันที (รูป 111 D) และสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและเมทานอลที่ความเข้มข้น 50 µg/mL มีค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 74.38 และ 87.82 ตามลำดับ ส่วนสารที่มีขั้วต่ำของสารสกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์น้อยกว่าเนื่องจากต้องใช้เวลาในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH นานกว่า (รูป 111 E) การทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ของสารสกัดใบสมเล็ดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ด้วย TLC พบว่าไม่ปรากฏแถบสีขาวยบนแผ่น TLC (รูปที่ 111 F) แต่การทดสอบด้วย microplate พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 300 µg/mL มีค่าร้อยละของการต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 76.98 ส่วนสารสกัดด้วยเฮกเซน และเอทิลอะซิเตตไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากมีปัญหาด้านการละลาย

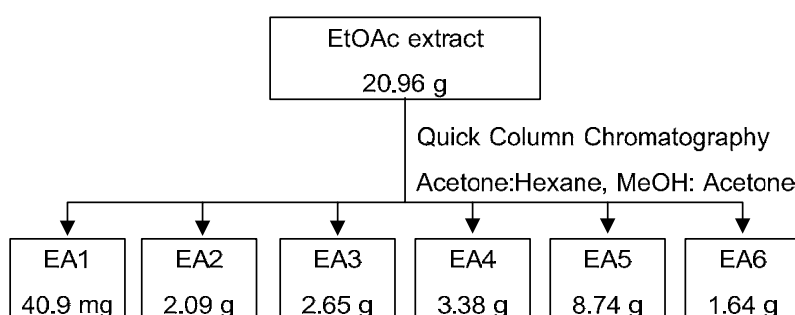
### 5.3 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี

สารสกัดด้วยตัวทำเอทิลอะซิเตตและเมทานอลของใบสมเส็ดมีฤทธิ์ดีในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากการทดสอบด้วย TLC และ microplate และสารสกัดด้วยเมทานอลยังแสดงฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase จากการทดสอบด้วย microplate จึงเลือกสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และเมทานอลมาทำการแยกต่อ

#### 5.3.1 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอทิลอะซิเตต

##### 5.3.1.1 การแยกสารสกัดเอทิลอะซิเตต

แยกสารสกัดเอทิลอะซิเตตของยอดเสม็ดชุนน้ำหนัก 20.96 กรัม ด้วยวิธี quick column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 400 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Hexane, 5% Acetone : Hexane, 10% Acetone : Hexane, 20% Acetone : Hexane, 30% Acetone : Hexane, 50% Acetone : Hexane, 70% Acetone : Hexane, 100% Acetone, 30% MeOH : Acetone, 50% MeOH : Acetone อย่างละ 1 ลิตร และ 100% MeOH 2 ลิตร ตามลำดับ หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (EA1-EA6) ดังรูปที่ 112



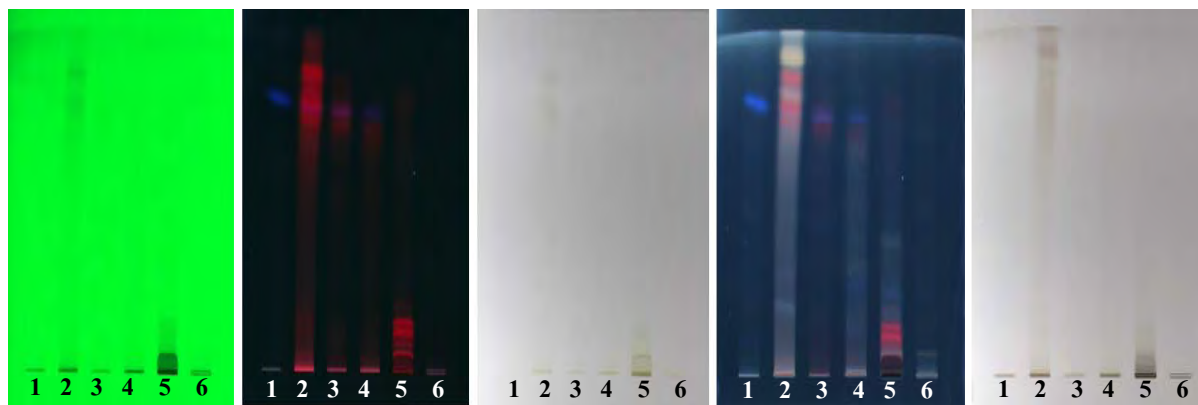
รูปที่ 112. การแยกสารของ EtOAc extract ของใบสมเส็ดด้วย quick column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EA1-EA6 แสดงในตารางที่ 65 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 113

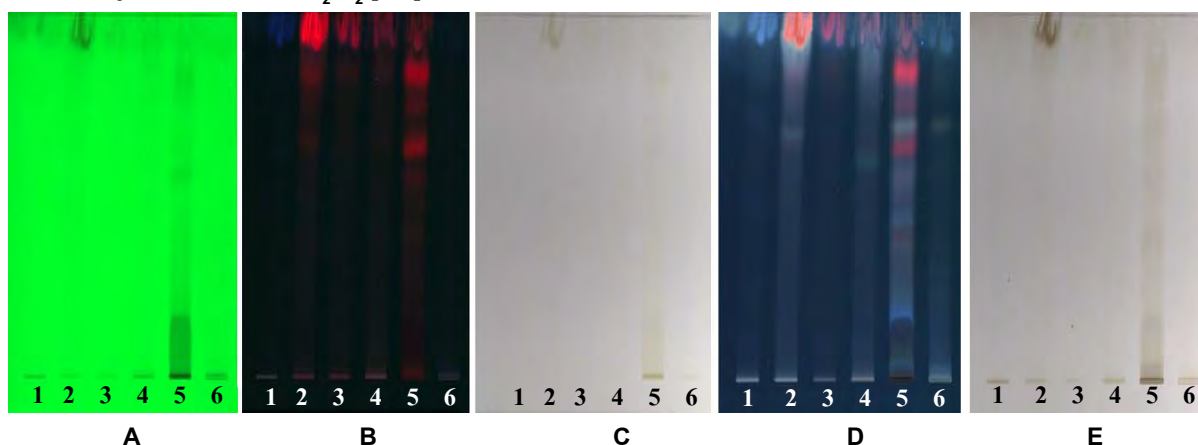
ตารางที่ 65. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EA1-EA6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EA1	100% Hexane - 10% Acetone : Hexane 500 mL	0.0409	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล
EA2	10% Acetone : Hexane 0.5 L - 20% Acetone : Hexane 0.5 L	2.0916	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล
EA3	20% Acetone : Hexane 0.5 L - 30% Acetone : Hexane 0.5 L	2.6514	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล
EA4	30% Acetone : Hexane 0.5 L - 50% Acetone : Hexane	3.3778	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล
EA5	70% Acetone : Hexane - 30% MeOH : Acetone	8.7380	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล
EA6	50% MeOH : Acetone - 100% MeOH	1.6392	สารหนืดสีเขียวน้ำตาล

Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [2:8]



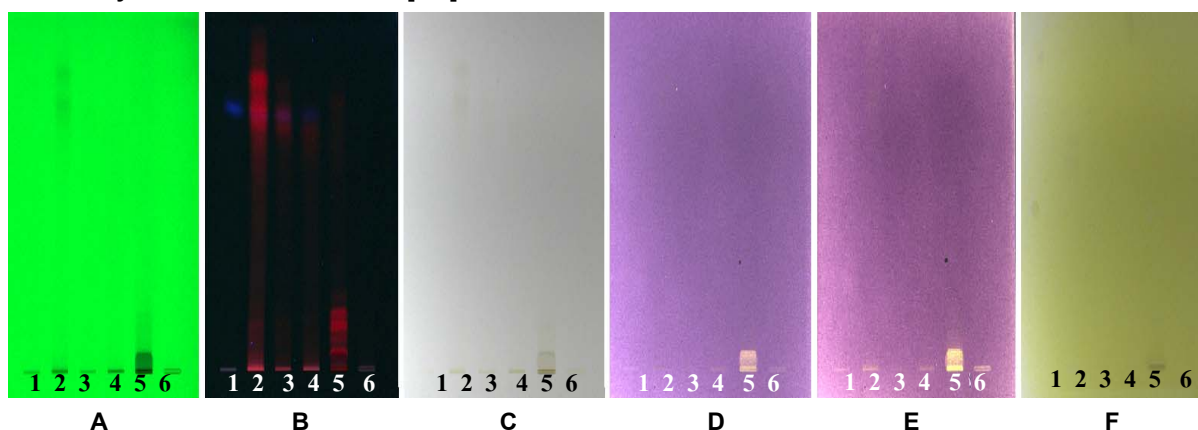
รูปที่ 113. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EA1-EA6

Detector: A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm, E = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 5.3.1.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นของส่วนของสารสกัดที่แยกจากสารสกัดเอทิลอะซิเตตของใบสมเล็ด

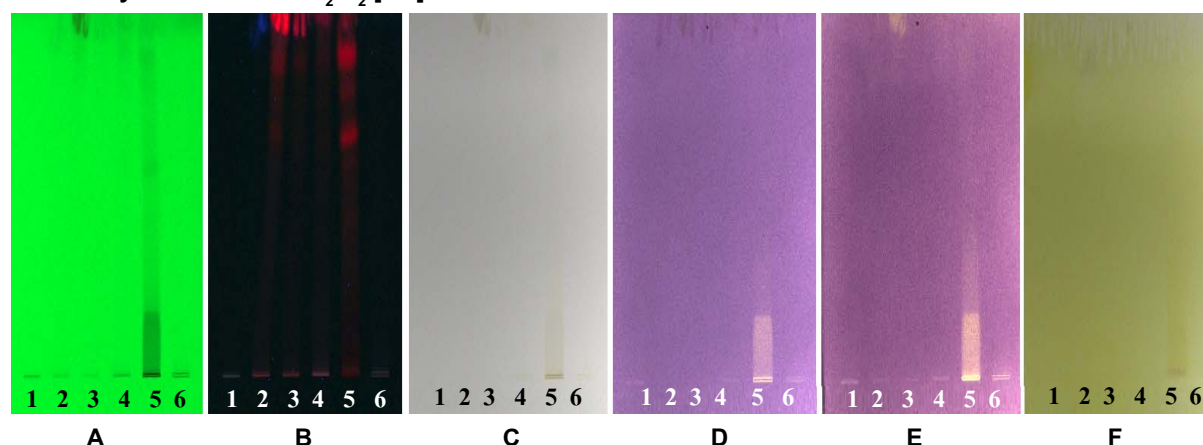
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด 6 fractions (EA1-EA6) ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตของใบสมเล็ดด้วยวิธี TLC ดังแสดงในรูปที่ 114

Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]



รูปที่ 114. TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสาร EA1-EA6 ของใบสมเล็ด, Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = Anti-DPPH at 0 hr, E = Anti-DPPH at 24 hr, F = Anti-AChE

Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [2:8]

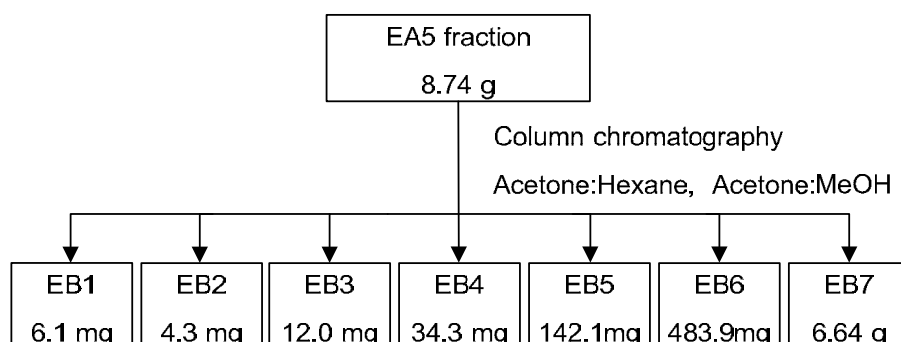


รูปที่ 114. (ต่อ) TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสาร EA1-EA6 ของใบสมเ็ด็ด, Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = Anti-DPPH at 0 hr, E = Anti-DPPH at 24 hr, F = Anti-AChE

จากรูปที่ 114 แสดงให้เห็นว่าส่วนของสารสกัด EA5 ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตของใบสมเ็ด็ด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยเปลี่ยนสีม่วงอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสีเหลืองทันที (รูป 114 D) และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้น (รูป 114 E) ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ไม่ปรากฏแถบสีขาวยบนแผ่น TLC (รูปที่ 114 F)

### 5.3.1.3 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-A5 (EA5)

แยกส่วนของสารสกัด EA5 น้ำหนัก 8.74 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 400 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (900 mL), 5% Acetone : Hexane (1 L), 10% Acetone : Hexane (1.5 L), 20% Acetone : Hexane (1.5 L), 30% Acetone : Hexane (2 L), 35% Acetone : Hexane (500 mL), 40% Acetone : Hexane (1 L), 70% Acetone : Hexane (1 L), 100% Acetone (1 L), 10% MeOH : Acetone (1 L), 15% MeOH : Acetone (1 L), 20% MeOH : Acetone (1 L), 50% MeOH : Acetone (500 mL), 70% MeOH : Acetone (500 mL), 100% MeOH (2 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (EB1-EB7) ดังรูปที่ 115

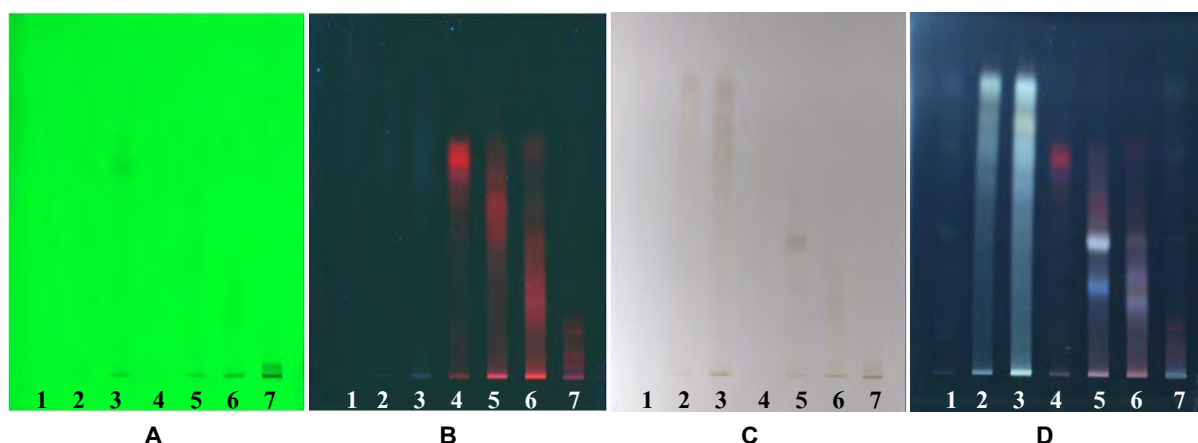


รูปที่ 115. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-A5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EB1-EB7 แสดงในตารางที่ 66 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 116

ตารางที่ 66. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EB1-EB7

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EB1	100% Hexane 400 mL	0.0061	สารสีเหลืองส้มปนขาว
EB2	100% Hexane 100 mL	0.0043	สารสีเขียวปนขาว
EB3	100% Hexane 200 mL	0.0120	สารหนืดสีเขียวเข้ม
EB4	100% Hexane 100 mL – 5% Acetone : Hexane 300 mL	0.0343	สารสีน้ำตาลเหลือง
EB5	5% Acetone : Hexane 700 mL – 20% Acetone : Hexane	0.1421	สารหนืดสีเขียวเข้ม
EB6	30% Acetone : Hexane – 35% Acetone : Hexane 200 mL	0.4839	สารหนืดสีเขียวเข้ม
EB7	35% Acetone : Hexane 300 mL – 100% MeOH	6.6439	สารหนืดสีเขียวเข้ม



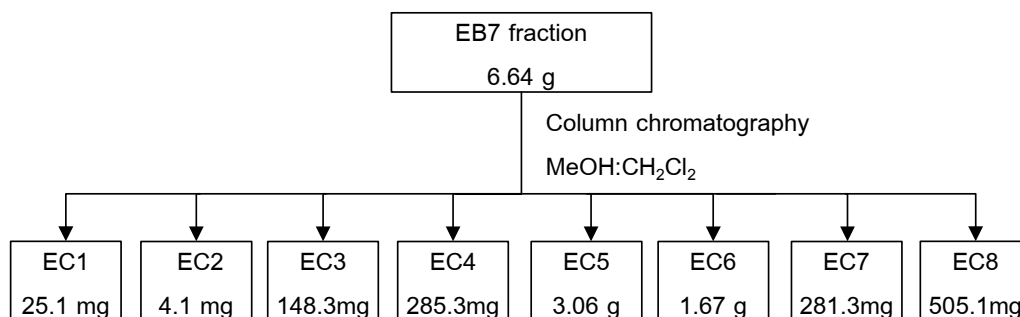
รูปที่ 116. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัดที่ EB1-EB7

Solvent system : Acetone : Hexane [2:3]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 5.3.1.4 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-B7 (EB7)

แยกส่วนของสารสกัด EB7 น้ำหนัก 6.64 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 200 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (700 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 4% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 6% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 35% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 60% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 80% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 85% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 95% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 300 mL และ 100% MeOH (600 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (EC1-EC8) ดังรูปที่ 117



รูปที่ 117. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-B7 ด้วย column chromatography

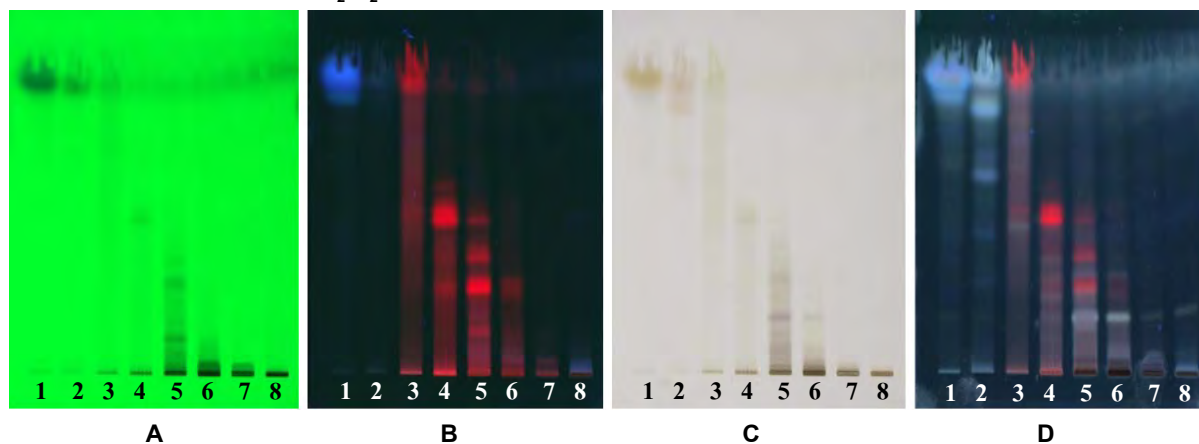


น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EC1-EC8 แสดงในตารางที่ 67 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions แสดงดังรูปที่ 118

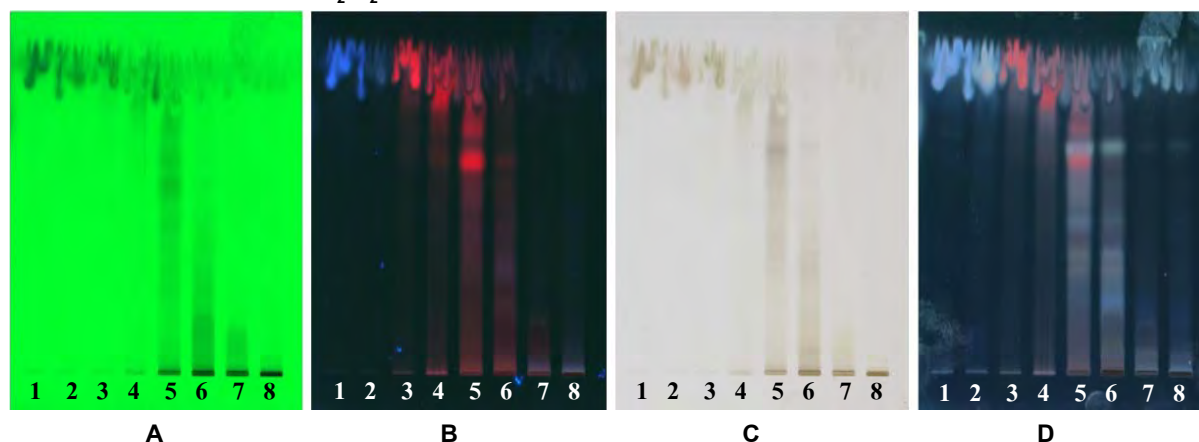
ตารางที่ 67. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EC1-EC8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EC1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0251	สารหนืดสีเหลืองเข้ม
EC2	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0041	สารหนืดสีเหลืองส้ม
EC3	6% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.1483	สารหนืดสีเขียวเข้ม
EC4	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.2853	สารหนืดสีเขียวเข้ม
EC5	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.06	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EC6	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 35% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.67	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EC7	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	28.13	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EC8	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	50.51	ของแข็งสีเขียวเข้ม

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]



Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [2:8]

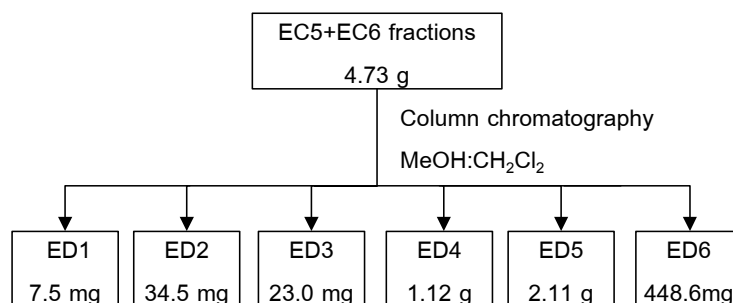


รูปที่ 118. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EC1-EC8

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.1.5 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-C5 และ C6 (EC5+EC6)

แยกส่วนของสารสกัด EC5 น้ำหนัก 3.06 กรัม และ EC6 น้ำหนัก 1.67 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 300 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.4 L), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (1.5 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (ED1-ED6) ดังรูปที่ 119

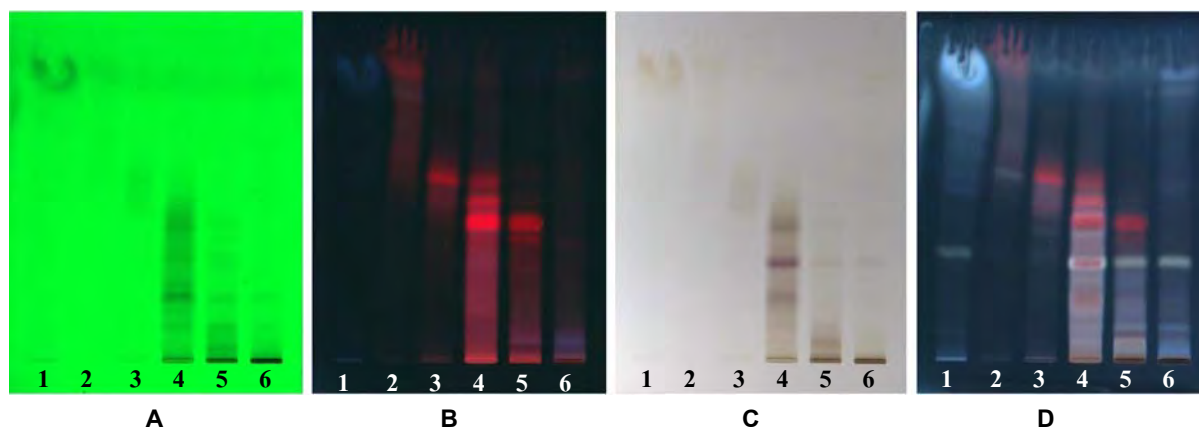


รูปที่ 119. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-C5 และ C6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด ED1-ED6 แสดงในตารางที่ 68 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 120

ตารางที่ 68. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction ED1-ED6

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
ED1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 600 mL	0.0075	คราบสีเหลือง
ED2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 800 mL – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0343	สารหนืดสีเขียวเข้ม
ED3	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	0.0230	สารหนืดสีเขียวเข้ม
ED4	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 300 mL – 30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL	1.12	สารหนืดสีเขียวเข้ม
ED5	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL – 70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.11	ของแข็งสีเขียวเข้ม
ED6	90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	0.4486	ของแข็งสีน้ำตาล



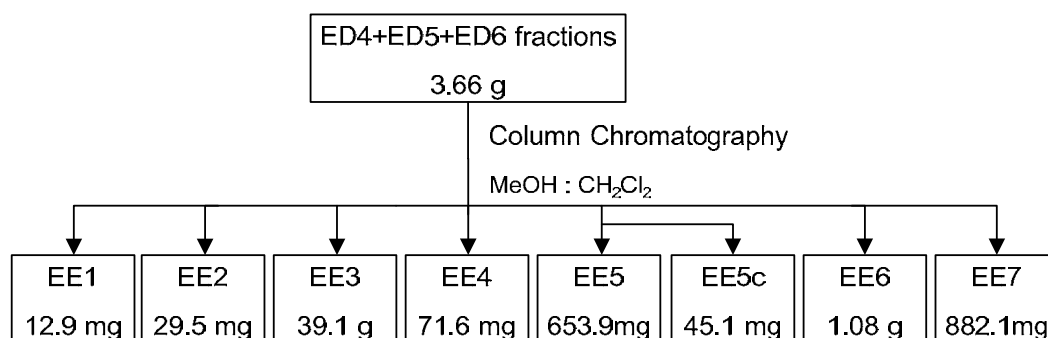
รูปที่ 120. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด ED1-ED6

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.1.6 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-D4, D5 และ D6 (ED4+ED5+ED6)

แยกส่วนของสารสกัด ED4 น้ำหนัก 1.11 กรัม ED5 น้ำหนัก 2.11 กรัม และ ED6 น้ำหนัก 0.44 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคกรองที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 160 g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 4% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 12% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (1 L) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (EE1-EE7) ดังรูปที่ 121



รูปที่ 121. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-D4, D5 และ D6 ด้วย column chromatography

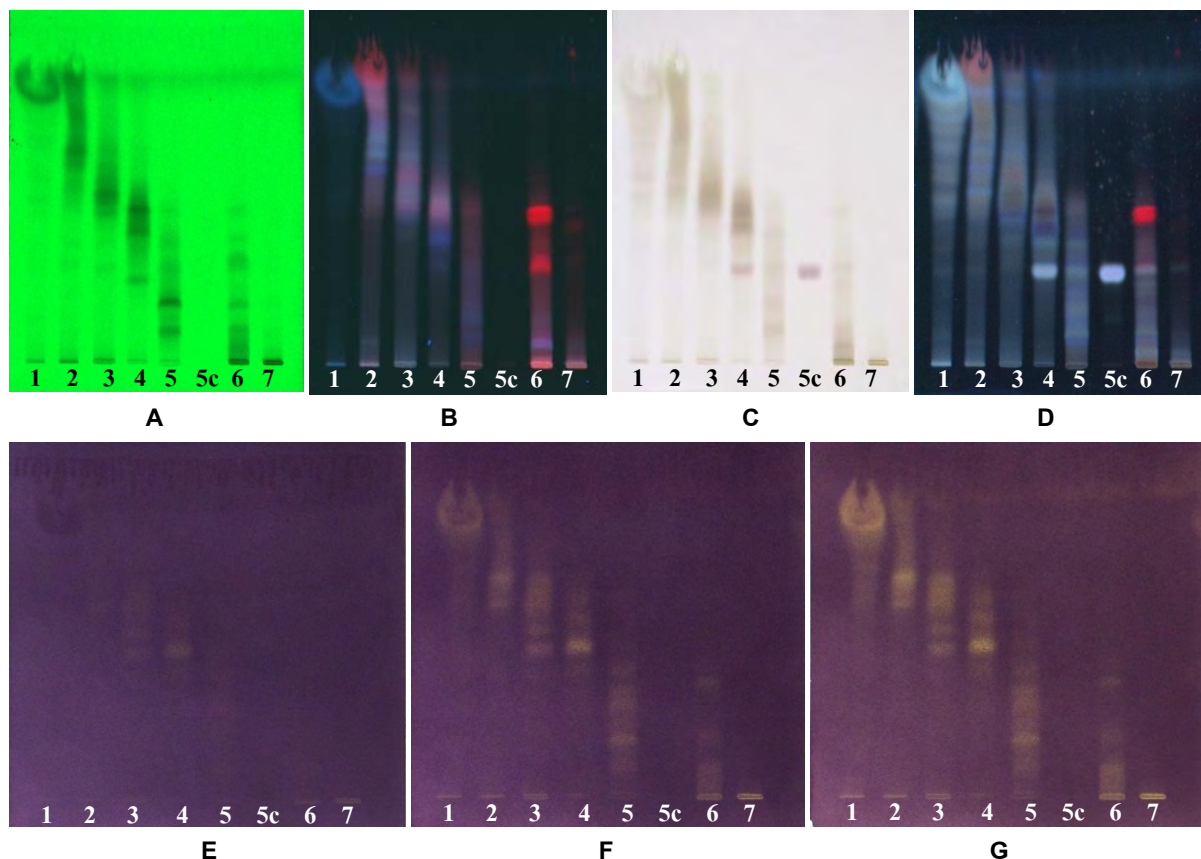
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EE1-EE7 แสดงในตารางที่ 69 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เล็กน้อย แสดงดังรูปที่ 122

ตะกอนสีขาวที่ได้จากส่วนของสารสกัด EE5 (EE5c) น้ำหนัก 45.1 สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็นสารชนิดเดียวกับ EN9c ที่แยกได้จากสารสกัดด้วย ethyl acetate ของเสม็ดขุน จึงเป็น compound 5

ตารางที่ 69. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EE1-EE7

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EE1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0129	คราบสีเหลือง
EE2	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.35 L	0.0295	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
EE3	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.17 L	0.0391	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
EE4	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.23 L – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.26 L	0.0716	คราบสีขาว
EE5	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.14 L – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.32 L	0.6539	ของแข็งสีเขียวเข้ม
E5c	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.14 L – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.32 L	0.0451	ของแข็งสีขาว
EE6	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.08 L – 70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.12 L	1.0800	ของแข็งสีเขียวเข้ม
EE7	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.28 L – 100% MeOH	0.8821	ของแข็งสีเขียวเข้ม





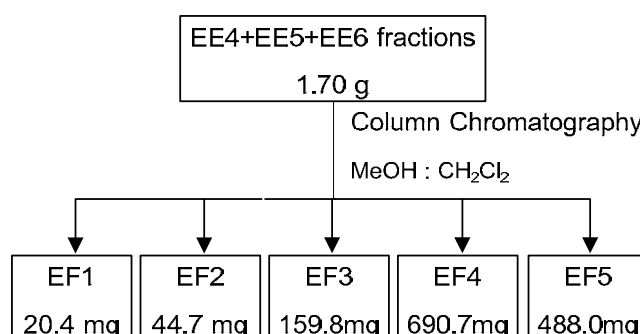
รูปที่ 122. TLC chromatograms และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด EE1-EE7

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm,  
E = DPPH 0 hr., F = DPPH 8 hr., G = DPPH 24 hr.

### 5.3.1.7 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด EtOAc-E4, E5 และ E6 (EE4+EE5+EE6)

แยกส่วนของสารสกัด EE4 น้ำหนัก 0.07 กรัม EE5 น้ำหนัก 0.65 กรัม และ EE6 น้ำหนัก 1.08 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 40 g) และใช้วัสดุภาคภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1300 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3000 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2500 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2000 mL), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL) และ 100% MeOH (1500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (EF1-EF5) ดังรูปที่ 123

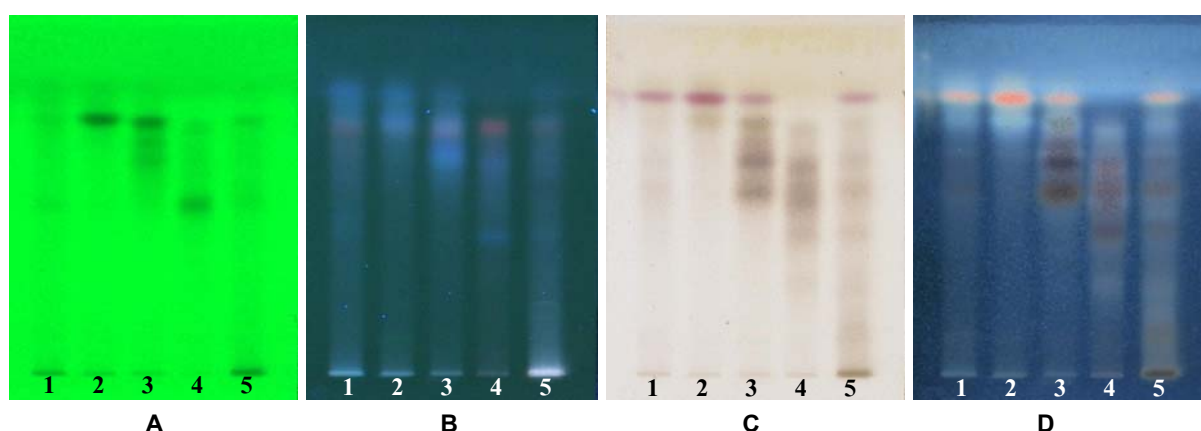


รูปที่ 123. การแยกสารของส่วนของสารสกัด EtOAc-E4, E5 และ E6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด EF1-EF5 แสดงในตารางที่ 70 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 124

ตารางที่ 70. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction EF1-EF5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
EF1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.25 L	0.0204	คราบสีน้ำตาล
EF2	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.7 L	0.0447	คราบสีน้ำตาล
EF3	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.3 L – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.45 L	0.1598	สารหนืดสีเหลืองปนเขียว
EF4	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.9 L	0.6907	สารหนืดสีเขียว
EF5	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.15 L – 100% MeOH	0.4880	สารหนืดสีน้ำตาลปนดำ



รูปที่ 124. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด EF1-EF5

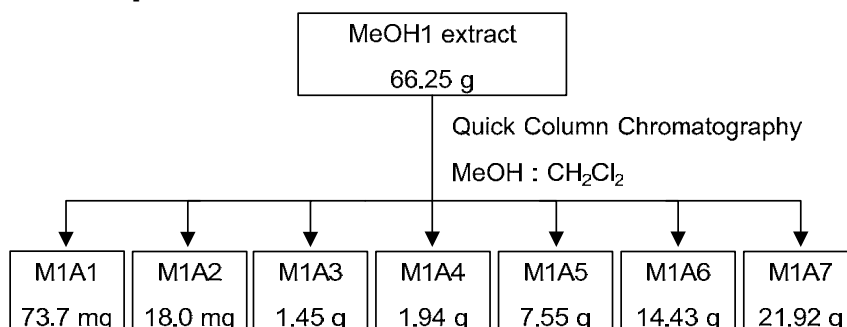
Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Acetic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของของสารสกัดเมทานอลของใบสมเ็ดครั้งที่ 1

#### 5.3.2.1 การแยกสารสกัดเมทานอล (MeOH1)

แยกสารสกัดเมทานอลของใบสมเ็ดน้ำหนัก 66.25 กรัม ด้วยวิธี quick column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 400 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 2 ลิตร และ 100% MeOH 4.5 ลิตร ตามลำดับ หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (M1A1-M1A7) ดังรูปที่ 125



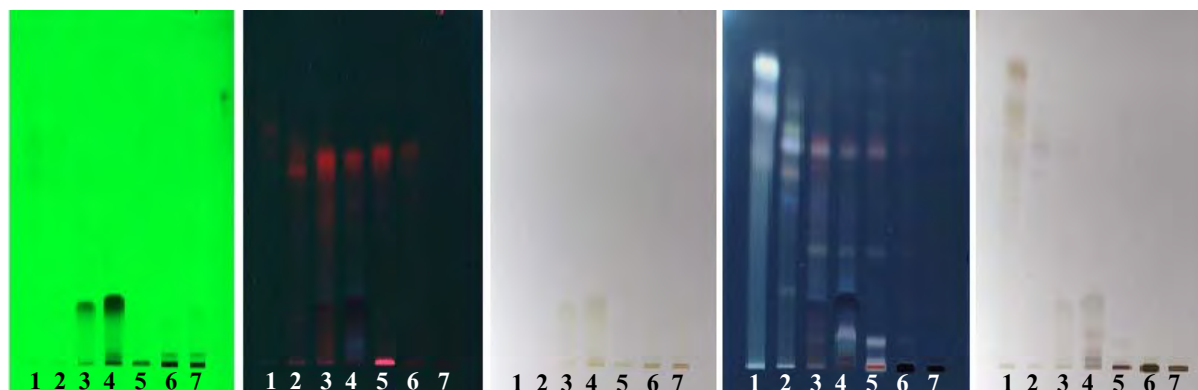
รูปที่ 125. การแยกสาร MeOH extract ของใบสมเ็ด ด้วย quick column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1A1-M1A7 แสดงในตารางที่ 71 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 126

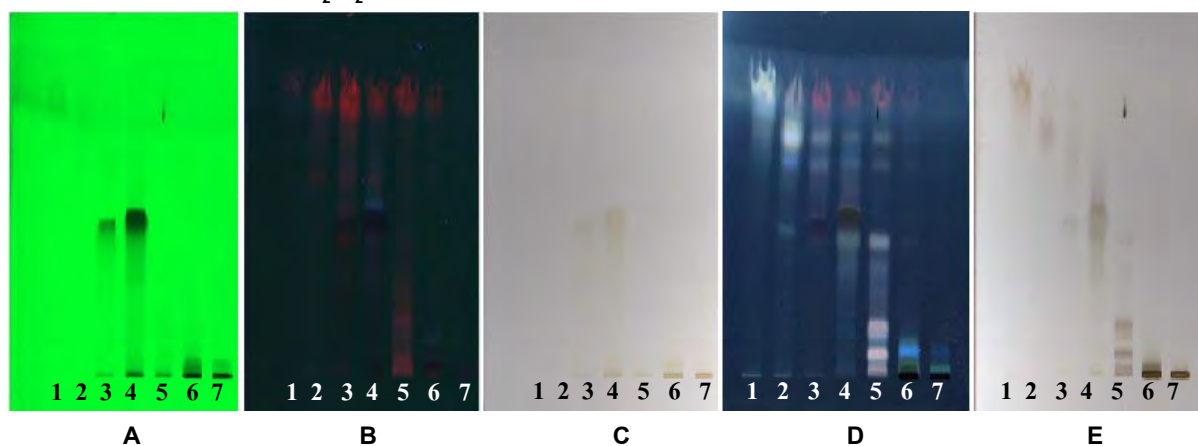
ตารางที่ 71. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1A1-M1A7

Fraction	วิฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1A1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L	0.0737	น้ำมันสีส้มน้ำตาล
M1A2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L – 3% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L	0.018	น้ำมันสีเขียวเข้ม
M1A3	3% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL – 10% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L	1.4156	ของแข็งสีเขียวปนขาว
M1A4	10% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL – 15% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L	1.9387	ของแข็งสีเขียวปนเหลือง
M1A5	15% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL – 30% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L	7.5477	สารหนืดสีน้ำตาล
M1A6	30% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L – 70% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL	14.428	สารหนืดสีน้ำตาล
M1A7	70% MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L – 100% MeOH 4.5 L	21.9204	ของแข็งสีน้ำตาลดำ

Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]



Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [2:8]



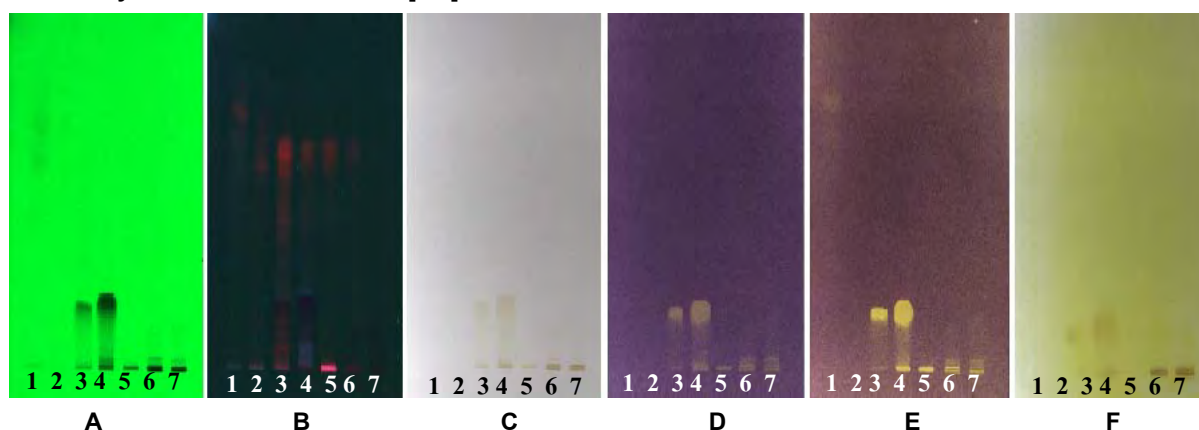
รูปที่ 126. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1A1-M1A7

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / UV 366 nm, E = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

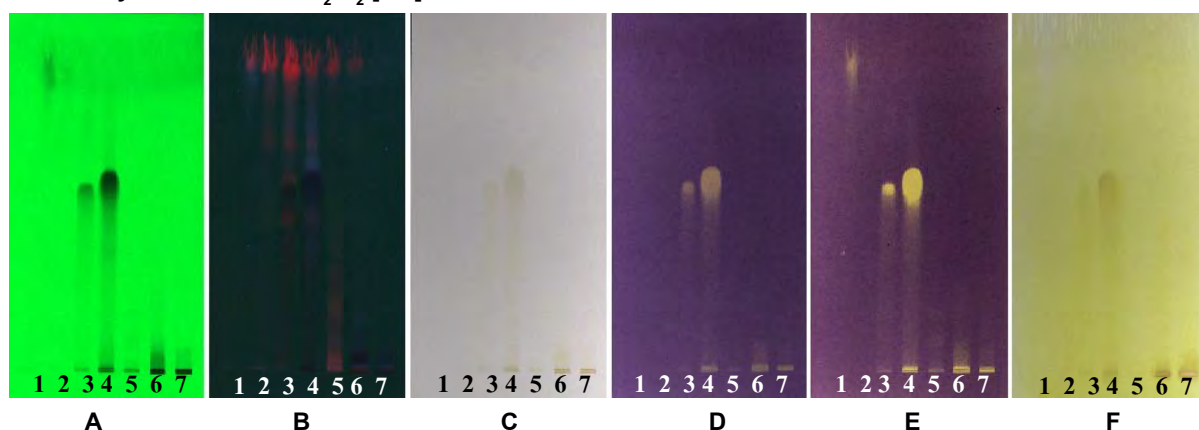
### 5.3.2.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เบื้องต้นของส่วนของสารสกัดที่แยกจากสารสกัดเมทานอลของใบสมเ็ด็ด

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด 7 fractions (M1A1-M1A7) ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเมทานอลของใบสมเ็ด็ดด้วยวิธี TLC ดังแสดงในรูปที่ 127 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในส่วนของสารสกัดที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเมทานอลของใบสมเ็ด็ดเป็นสารที่มีขั้วปานกลางถึงมีขั้วมาก โดยส่วนของสารสกัด M1A3 และ M1A4 ปรากฏแบนสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุด โดยสามารถเปลี่ยนสีม่วงอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสีเหลืองทันที (รูป 127 D) และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้น (รูป 127 E) ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ไม่ปรากฏแถบสีขาวบนแผ่น TLC (รูปที่ 127 F) ดังนั้นจึงทำการแยกสารออกฤทธิ์จากส่วนของสารสกัด M1A3 และ M1A4 ต่อไป

**Solvent system : Acetone:Hexane [2:3]**



**Solvent system : MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [2:8]**

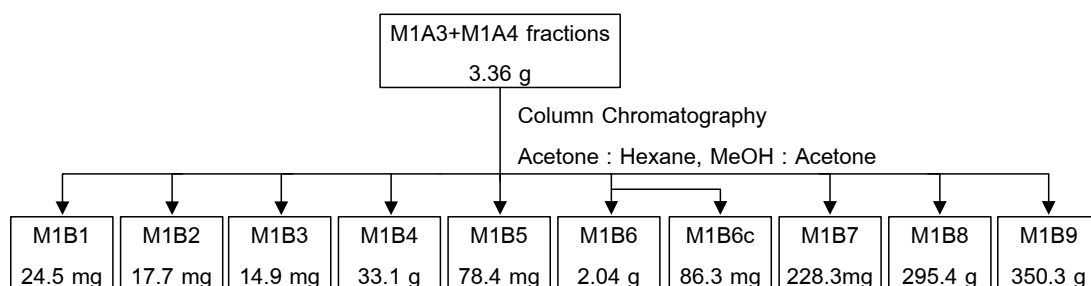


รูปที่ 127. TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านเอ็นไซม์ acetylcholinesterase และต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M1A1-M1A7 ของใบสมเ็ด็ด, Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = White light, D = Anti-DPPH at 0 hr, E = Anti-DPPH at 24 hr, F = Anti-AChE

### 5.3.2.3 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-A3 และ A4 (M1A3+M1A4)

แยกส่วนของสารสกัด M1A3 น้ำหนัก 1.42 กรัม และ M1A4 น้ำหนัก 1.94 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 150 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (600 mL), 5% Acetone : Hexane (300 mL), 10% Acetone : Hexane (900 mL), 15% Acetone : Hexane, 20% Acetone : Hexane, 30% Acetone : Hexane, 50% Acetone : Hexane, 70% Acetone : Hexane, 90% Acetone : Hexane อย่างละ 300 mL, 100% Acetone (600 mL), 5% MeOH : Acetone, 10% MeOH : Acetone, 15% MeOH : Acetone, 20% MeOH : Acetone, 25% MeOH : Acetone, 50% MeOH :

Acetone, 75% MeOH : Acetone อย่างละ 300 mL และ 100% MeOH (600 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้ โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 9 fractions (M1B1- M1B9) ดังรูปที่ 128

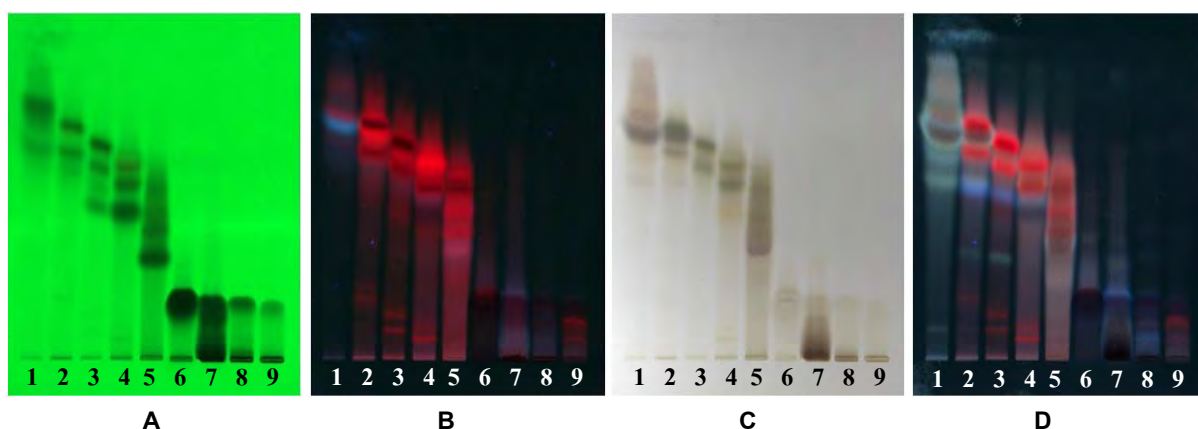


รูปที่ 128. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-A3 และ A4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1B1-M1B9 แสดงในตารางที่ 72 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions และตะกอนที่แยกได้ แสดงดังรูปที่ 129

ตารางที่ 72. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1B1-M1B9

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1B1	100% Hexane – 10% Acetone : Hexane 450 mL	0.0245	สารหนืดสีเหลือง
M1B2	10% Acetone : Hexane 0.45 L - 15% Acetone : Hexane 0.2 L	0.0177	ของแข็งสีขาวเข้ม
M1B3	15% Acetone : Hexane 100 mL – 20% Acetone : Hexane	0.0149	ของแข็งสีขาวเข้ม
M1B4	30% Acetone : Hexane	0.0331	ของแข็งสีขาวเข้ม
M1B5	50% Acetone : Hexane	0.0784	ของแข็งสีขาวเข้ม
M1B6	70% Acetone : Hexane – 90% Acetone : Hexane 100 mL	2.04	ของแข็งสีขาวเข้ม
M1B6c	70% Acetone : Hexane – 90% Acetone : Hexane 100 mL	0.0863	ของแข็งสีขาว
M1B7	90% Acetone : Hexane – 100% Acetone 200 mL	0.2283	ของแข็งสีขาวเข้ม
M1B8	100% Acetone 400 mL – 10% MeOH : Acetone	0.2954	ของแข็งสีขาวเข้ม
M1B9	15% MeOH : Acetone – 100% Acetone 200 mL	0.3503	ของแข็งสีขาวเข้ม



รูปที่ 129. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1B1-M1B9

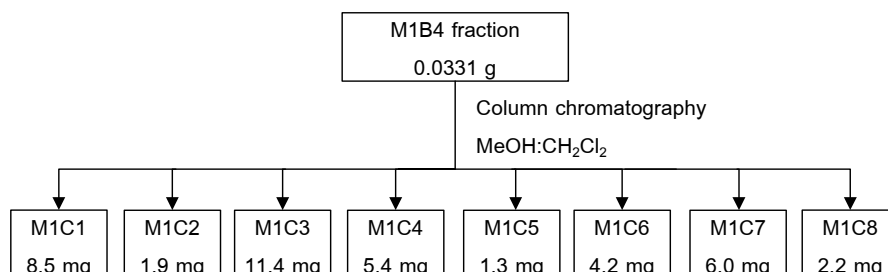
Solvent system : Acetone : Hexane [4:6]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



### 5.3.2.4 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-B4 (M1B4)

แยกส่วนของสารสกัด M1B4 น้ำหนัก 0.0331 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL), 1% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500 mL), 3% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 7% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 10% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 15% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 30% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 50% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 70% MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , อย่างละ 100 mL และ 100% MeOH (200 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (M1C1-M1C8) ดังรูปที่ 130

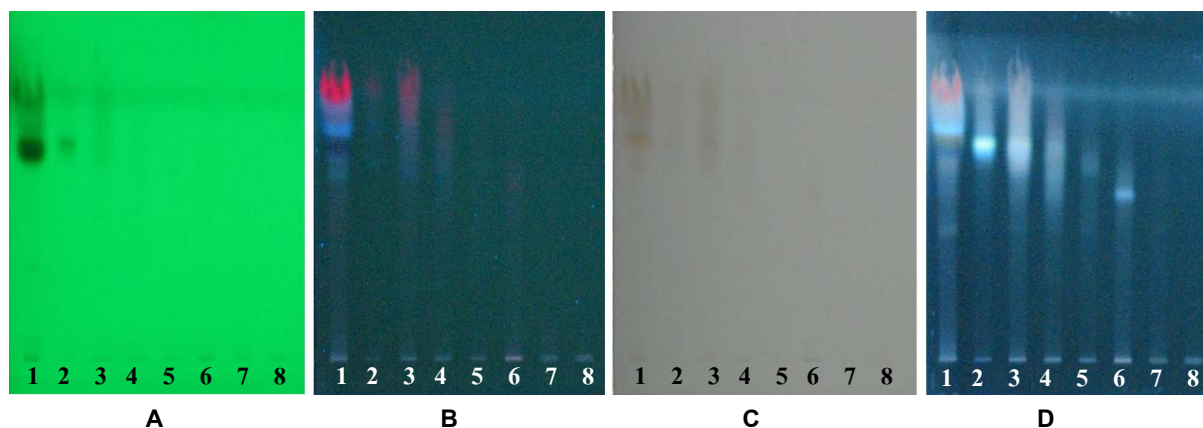


รูปที่ 130. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-B4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1C1-M1C8 แสดงในตารางที่ 73 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions แสดงดังรูปที่ 131

ตารางที่ 73. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1C1-M1C8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1C1	100% $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ – 1% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.0085	คราบสีเหลืองเขียว
M1C2	3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 150 mL	0.0019	คราบสีเหลืองเขียว
M1C3	3% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL – 5% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.0114	ของแข็งสีขาวปนเขียว
M1C4	7% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ – 10% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 25 mL	0.0054	ของแข็งสีขาวปนเขียว
M1C5	10% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 75 mL – 15% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL	0.0013	คราบสีเหลือง
M1C6	15% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL – 25% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL	0.0042	คราบสีเหลือง
M1C7	25% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL – 30% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL	0.0060	คราบสีเขียวเข้ม
M1C8	30% MeOH : $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 50 mL – 100% MeOH	0.0022	คราบสีเขียวเข้ม



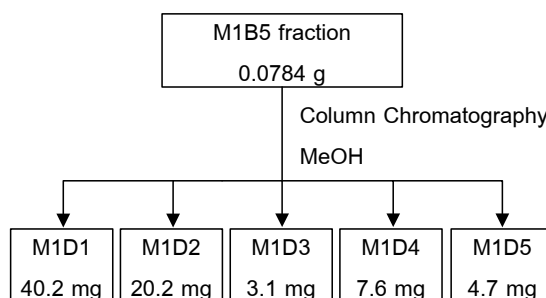
รูปที่ 131. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1C1-M1C8

Solvent system : MeOH :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , D = 30%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ / UV 366 nm

### 5.3.2.5 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-B5

แยกส่วนของสารสกัด M1B5 น้ำหนัก 0.0784 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 (40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% MeOH (550 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1D1- M1D5) ดังรูปที่ 132

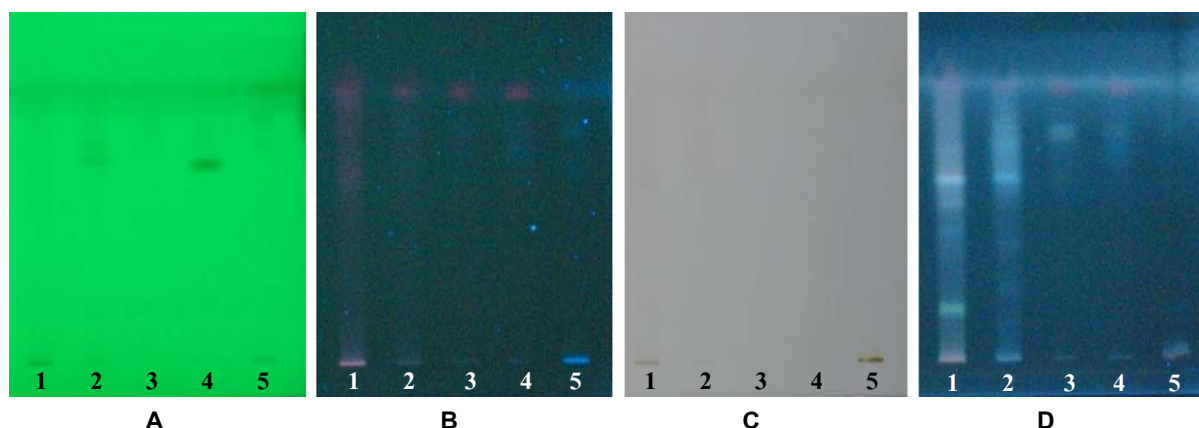


รูปที่ 132. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-B5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1D1- M1D5 แสดงในตารางที่ 74 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 133

ตารางที่ 74. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1D1- M1D5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1D1	100% MeOH 140 mL	0.0402	ของแข็งสีเขียวเข้ม
M1D2	100% MeOH 40 mL	0.0202	ของแข็งสีเขียวเข้ม
M1D3	100% MeOH 30 mL	0.0031	คราบสีเขียวเหลือง
M1D4	100% MeOH 100 mL	0.0076	คราบสีเขียวเหลือง
M1D5	100% MeOH 240 mL	0.0047	คราบสีขาว



รูปที่ 133. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัดที่ M1D1- M1D5

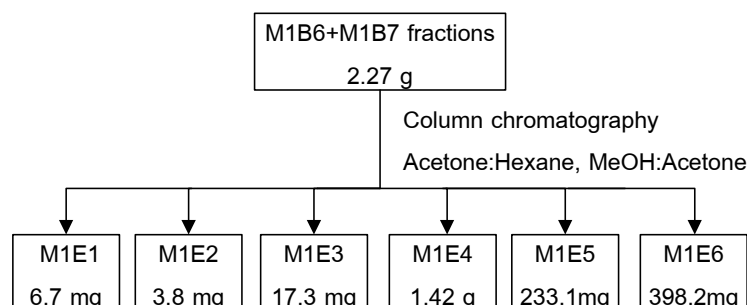
Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.6 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-B6 และ B7 (M1B6+M1B7)

แยกส่วนของสารสกัด M-B6 น้ำหนัก 2.04 กรัม และ M-B7 น้ำหนัก 0.2283 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 300 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่

ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (0.4 L), 2% Acetone : Hexane (0.4 L), 5% Acetone : Hexane (0.2 L), 10% Acetone : Hexane (0.2 L), 20% Acetone : Hexane (0.6 L), 25% Acetone : Hexane (0.2 L), 30% Acetone : Hexane, 35% Acetone : Hexane, 40% Acetone : Hexane, 50% Acetone : Hexane, 70% Acetone : Hexane, 90% Acetone : Hexane, 100% Acetone, 5% MeOH : Acetone, 10% MeOH : Acetone, 20% MeOH : Acetone, 30% MeOH : Acetone, 50% MeOH : Acetone, 70% MeOH : Acetone, 90% MeOH : Acetone อย่างละ 0.4 L และ 100% MeOH (1.4 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1E1-M1E6) ดังรูปที่ 134

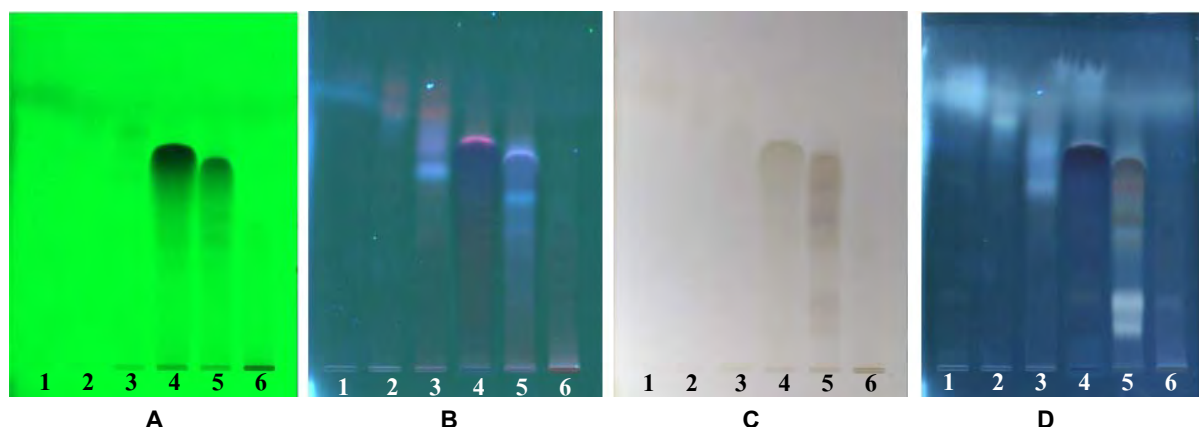


รูปที่ 134. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-B6 และ B7 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1E1-M1E6 แสดงในตารางที่ 75 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 135 ส่วนของสารสกัด ME4 เป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 1.42 กรัม ซึ่งให้เป็น compound 9

ตารางที่ 75. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1E1-M1E6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1E1	100% Hexane - 20% Acetone : Hexane	0.0067	ของแข็งสีเขียวย่อน
M1E2	25% Acetone : Hexane - 30% Acetone : Hexane	0.0038	ของแข็งสีเขียวย่อน
M1E3	35% Acetone : Hexane - 40% Acetone : Hexane 0.1 L	0.0173	ของแข็งสีเหลือง
M1E4	40% Acetone : Hexane 0.3 L - 50% Acetone : Hexane 0.25 L	1.42	ของแข็งสีขาว
M1E5	50% Acetone : Hexane 0.15 L - 90% Acetone : Hexane	0.2331	ของแข็งสีน้ำตาล
M1E6	100% Acetone - 100% MeOH	0.3982	ของแข็งสีน้ำตาล



รูปที่ 135. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1E1-M1E6

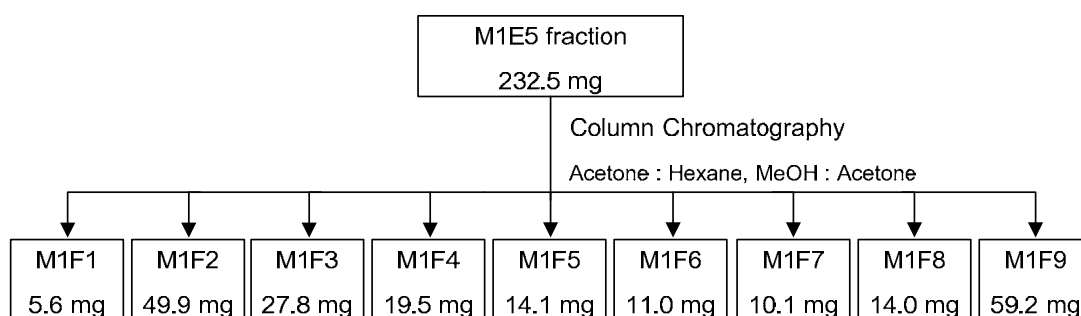
Solvent system : Acetone : Hexane [8:2]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



### 5.3.2.7 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH-E5

แยกส่วนของสารสกัด M1E5 น้ำหนัก 0.2325 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (100 mL), 1% Acetone : Hexane (200 mL), 2% Acetone : Hexane (200 mL), 5% Acetone : Hexane (200 mL), 7% Acetone : Hexane (200 mL), 10% Acetone : Hexane (400 mL), 12% Acetone : Hexane (200 mL), 15% Acetone : Hexane (400 mL), 20% Acetone : Hexane (200 mL), 25% Acetone : Hexane (600 mL), 30% Acetone : Hexane, 32% Acetone : Hexane, 35% Acetone : Hexane, 40% Acetone : Hexane, 45% Acetone : Hexane, 50% Acetone : Hexane, 53% Acetone : Hexane, 55% Acetone : Hexane, 60% Acetone : Hexane, 65% Acetone : Hexane, 70% Acetone : Hexane, 100% Acetone อย่างละ 400 mL, 5% MeOH : Acetone, 10% MeOH : Acetone, 15% MeOH : Acetone, 20% MeOH : Acetone, 30% MeOH : Acetone, 50% MeOH : Acetone, 70% MeOH : Acetone อย่างละ 200 mL และ 100% MeOH (800 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 9 fractions (M1F1-M1F9) ดังรูปที่ 136

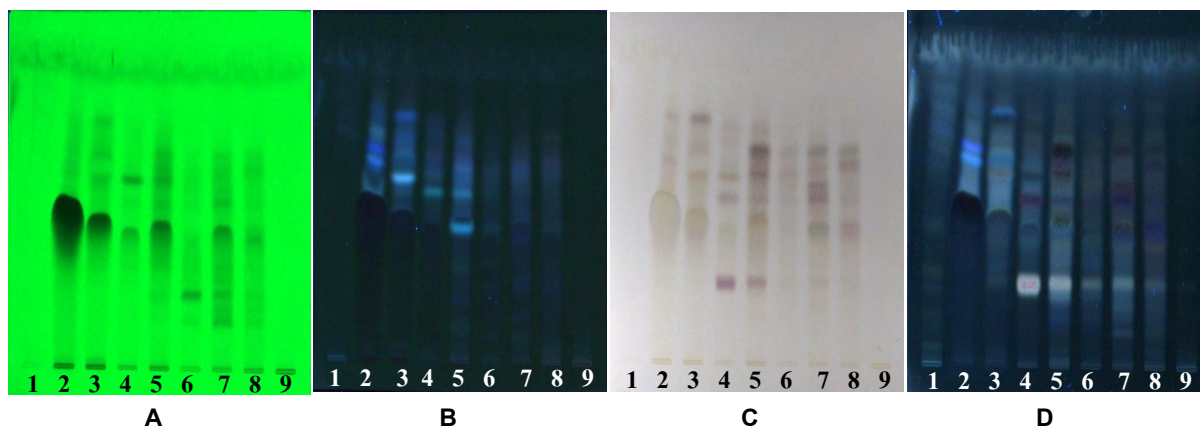


รูปที่ 136. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-E5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1F1-M1F9 แสดงในตารางที่ 76 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 9 fractions แสดงดังรูปที่ 137

ตารางที่ 76. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1F1-M1F9

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1F1	100% Hexane - 25% Acetone : Hexane 0.4 L	0.0056	คราบสีเหลือง
M1F2	25% Acetone : Hexane 0.2 L - 32% Acetone : Hexane 50 mL	0.0499	คราบสีน้ำตาล
M1F3	32% Acetone : Hexane 0.35 L	0.0278	คราบสีน้ำตาล
M1F4	35% Acetone : Hexane 0.4 L - 40% Acetone : Hexane 70 mL	0.0195	คราบสีน้ำตาล
M1F5	40% Acetone : Hexane 0.33 L - 45% Acetone : Hexane 0.12 L	0.0141	คราบสีน้ำตาล
M1F6	45% Acetone : Hexane 0.25 L - 50% Acetone : Hexane 50 mL	0.0110	คราบสีน้ำตาล
M1F7	50% Acetone : Hexane 0.32 L	0.0101	คราบสีน้ำตาล
M1F8	50% Acetone : Hexane 40 mL - 60% Acetone : Hexane 0.26 L	0.0140	คราบสีน้ำตาล
M1F 9	60% Acetone : Hexane 140 mL - 100% MeOH	0.0592	ของแข็งสีน้ำตาล



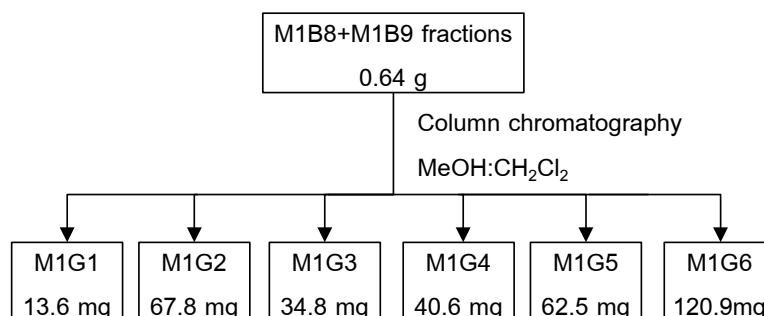
รูปที่ 137. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1F1-M1F9

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.8 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-B8 และ B9 (M1B8+M1B9)

แยกส่วนของสารสกัด M1B8 น้ำหนัก 0.29 กรัม และ M1B9 น้ำหนัก 0.35 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3000 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL) และ 100% MeOH (1.5 L) หลังจากการรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1G1-M1G6) ดังรูปที่ 138



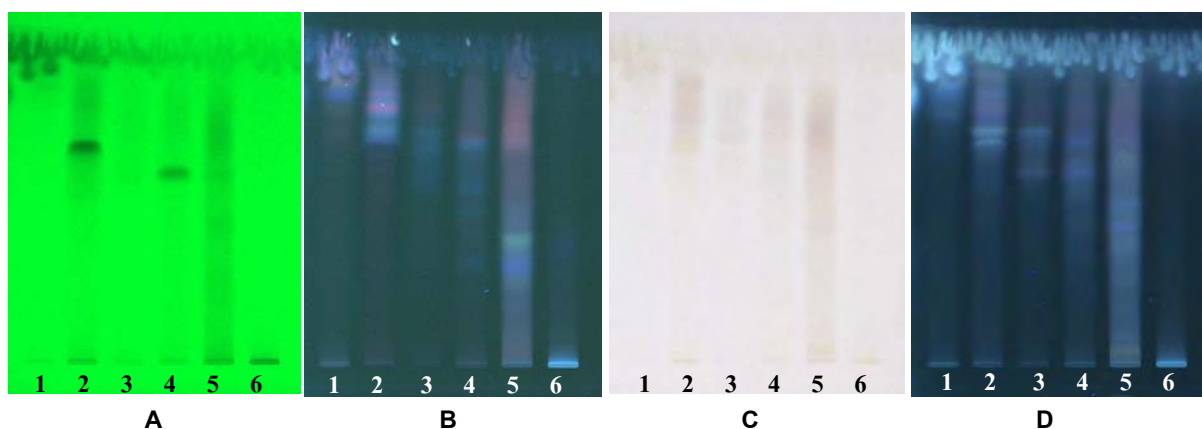
รูปที่ 138. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-B8 และ B9 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1G1-M1G6 แสดงในตารางที่ 77 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 139

ตารางที่ 77. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1G1-M1G6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1G1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.35 L	0.0136	คราบสีเขียวเข้ม
M1G2	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.9 L	0.0678	คราบสีเขียวเข้ม
M1G3	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.9 L	0.0348	คราบสีเขียวเข้ม
M1G4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.2 L – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.4 L	0.0406	คราบสีเขียวเข้ม

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1G5	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.15 L	0.0625	คราบสีน้ำตาลเข้ม
M1G6	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.85 L – 100% MeOH	0.1209	ของแข็งสีน้ำตาล



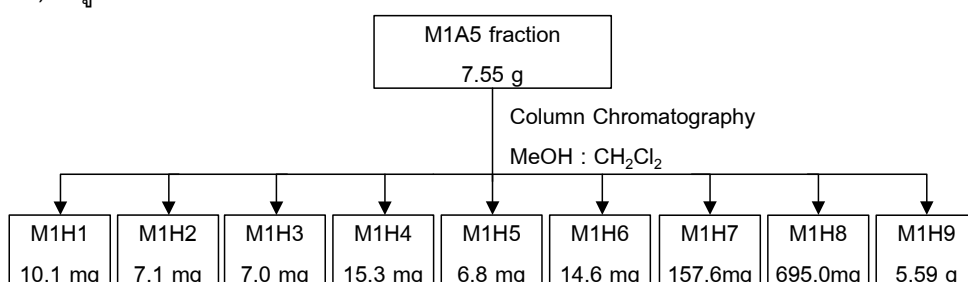
รูปที่ 139. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1G1-M1G6

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [2:8] + 1% Acetic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.9 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-A5

แยกส่วนของสารสกัด M1A5 น้ำหนัก 7.55 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 200 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> และ 100% MeOH อย่างละ 500 mL หลังจากรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 9 fractions (M1H1-M1H9) ดังรูปที่ 140



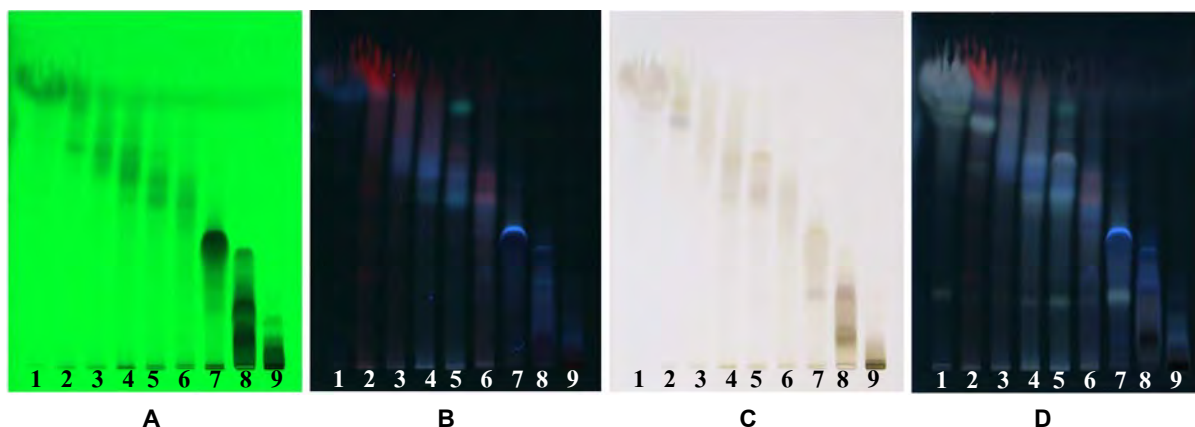
รูปที่ 140. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-A5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1H1-M1H9 แสดงในตารางที่ 78 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 9 fractions แสดงดังรูปที่ 141

ตารางที่ 78. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1H1- M1H9

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1H1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0101	ของแข็งสีขาว
M1H2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0071	ของแข็งสีเขียวเข้ม
M1H3	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL	0.0070	ของแข็งสีเขียวน้ำเงิน

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1H4	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL	0.0153	ของแข็งสีเขียวเข้ม
M1H5	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 75 mL	0.0068	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
M1H6	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 75 mL	0.0146	ของแข็งสีเขียวเหลือง
M1H7	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 300 mL	0.1576	ของแข็งสีน้ำตาล
M1H8	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL	0.6950	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M1H9	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 100% MeOH	5.59	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม



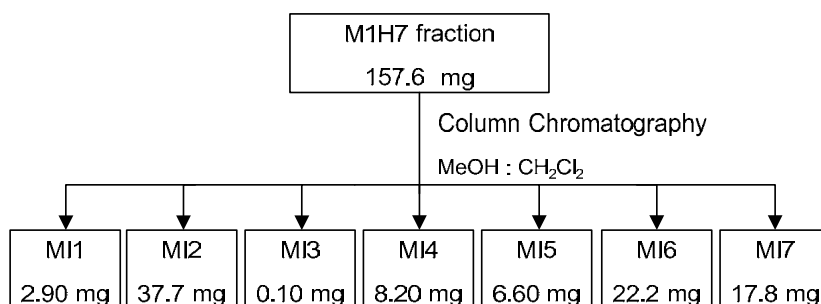
รูปที่ 141. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1H1- M1H9

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 5.3.2.10 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-H7 (M1H7)

แยกส่วนของสารสกัด M1H7 น้ำหนัก 0.1576 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคองที่เป็น silica gel (230-400 mesh, 40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 8% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 9% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 12% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 80% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 300 mL และ 100% MeOH (600 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (MI1-MI7) ดังรูปที่ 142

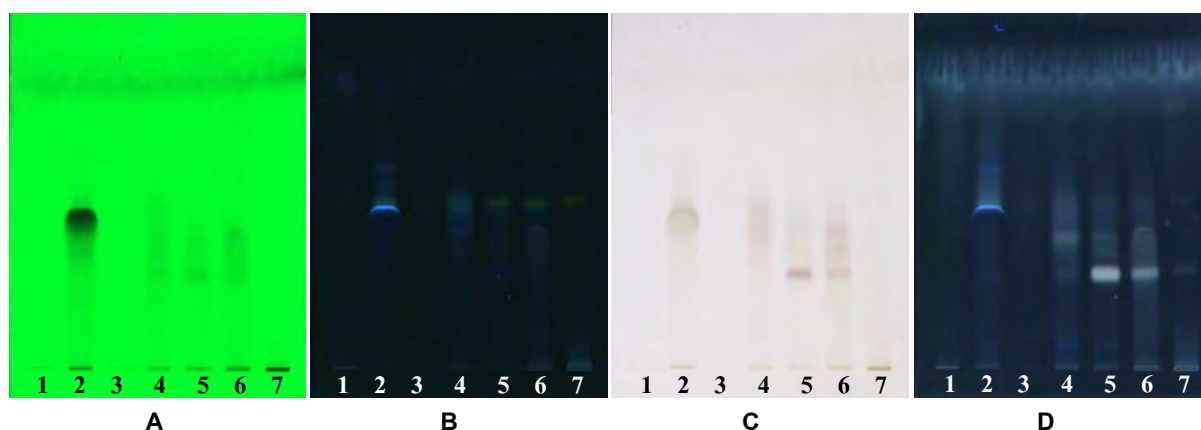


รูปที่ 142. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-H7 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด MI1-MI7 แสดงในตารางที่ 79 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 143

ตารางที่ 79. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction MI1-MI7

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
MI1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.28 L	0.0029	คราบสีขาว
MI2	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 20 mL – 4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.18 L	0.0377	ของแข็งสีเหลืองปนเขียว
MI3	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 10 mL	0.0001	ของแข็งสีขาว
MI4	4% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.29 L – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.24 L	0.0082	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
MI5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 60 mL – 6% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.12 L	0.0066	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
MI6	6% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.18 L – 9% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.26 L	0.0222	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
MI7	9% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 40 mL – 100% MeOH	0.0178	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล



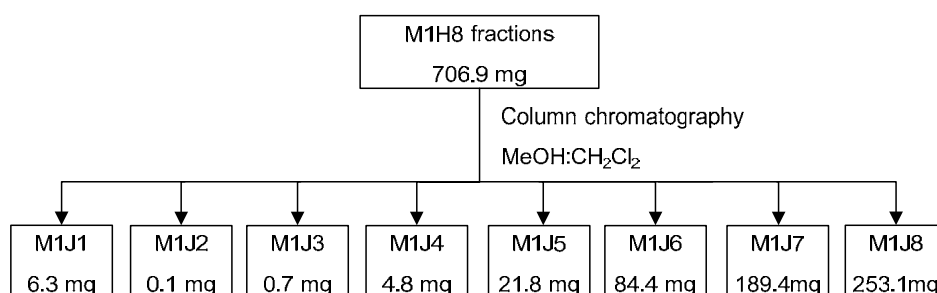
รูปที่ 143. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด MI1-MI7

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.11 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-H8

แยกส่วนของสารสกัด M1H8 น้ำหนัก 0.7069 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (70-230 mesh, 90 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (700 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2500 mL), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (900 mL) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (M1J1-M1J8) ดังรูปที่ 144

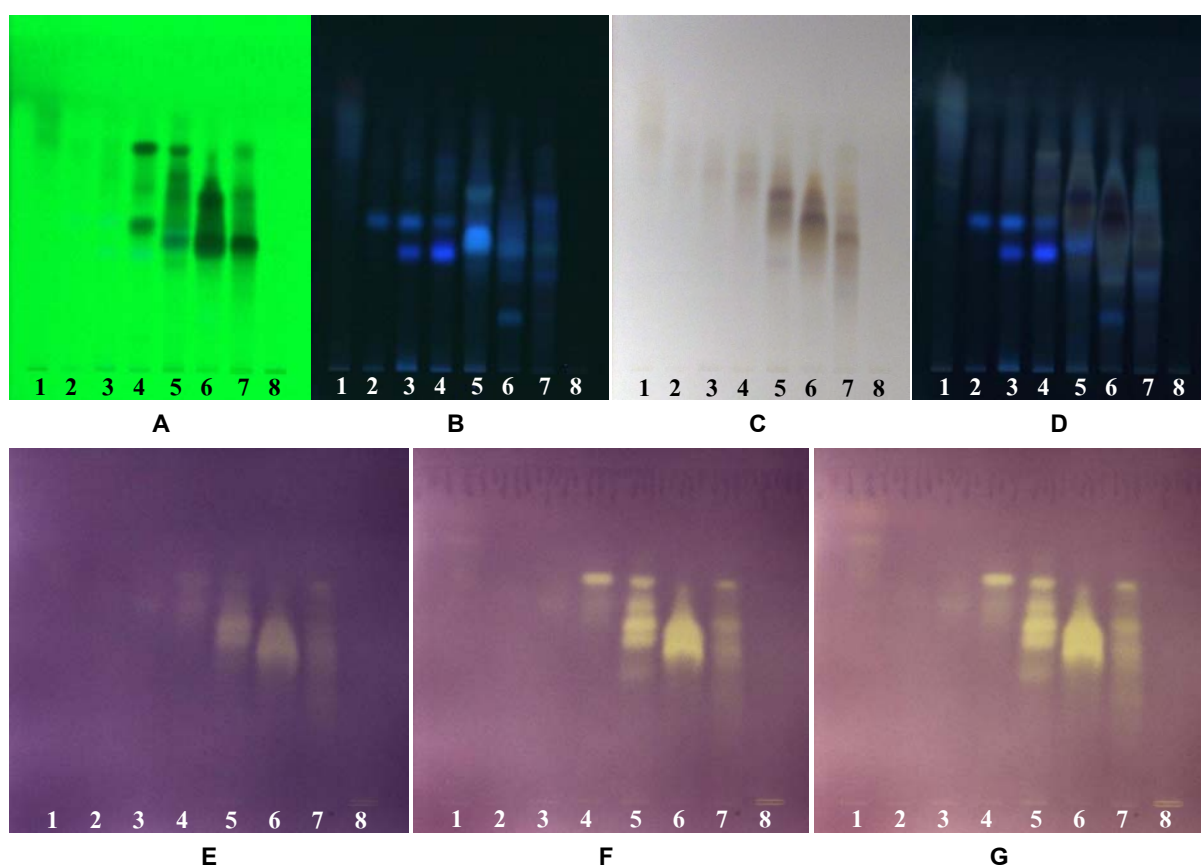


รูปที่ 144. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-H8 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1J1-M1J8 แสดงในตารางที่ 80 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงดังรูปที่ 145

ตารางที่ 80. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1J1-M1J8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1J1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 590 mL	0.0063	คราบสีน้ำตาล
M1J2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 110 mL	0.0001	คราบสีน้ำตาล
M1J3	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 175 mL	0.0007	คราบสีน้ำตาล
M1J4	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 175 mL	0.0048	สารหนืดสีน้ำตาล
M1J5	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL	0.0218	สารหนืดสีน้ำตาล
M1J6	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL	0.0844	สารหนืดสีเหลือง
M1J7	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 900 mL	0.1894	สารหนืดสีน้ำตาล
M1J8	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1600 mL – 100% MeOH	0.2531	ของแข็งสีน้ำตาล



รูปที่ 145. TLC chromatograms ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M1J1-M1J8

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Acetic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

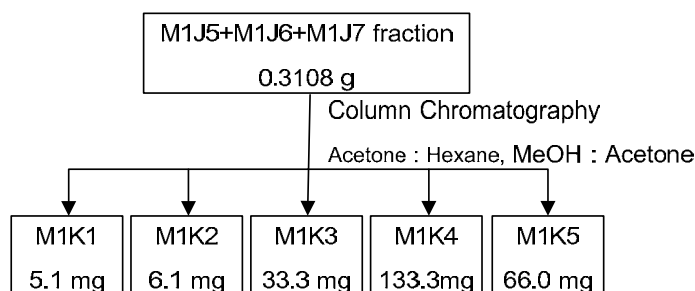
E = DPPH 0 hr., F = DPPH 8 hr., G = DPPH 24 hr.

### 5.3.2.12 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-J5, J6 และ J7 (M1J5+M1J6+M1J7)

แยกส่วนของสารสกัด M1J5 น้ำหนัก 0.0233 กรัม M1J6 น้ำหนัก 0.0864 กรัม และ M1J7 น้ำหนัก 0.2011 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 65 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (200 mL), 5% Acetone : Hexane (200 mL), 10% Acetone :



Hexane (400 mL), 15% Acetone : Hexane (200 mL), 20% Acetone : Hexane (200 mL), 30% Acetone : Hexane (200 mL), 40% Acetone : Hexane (200 mL), 50% Acetone : Hexane (200 mL), 55% Acetone : Hexane (600 mL), 60% Acetone : Hexane (600 mL), 70% Acetone : Hexane (600 mL), 80% Acetone : Hexane, 90% Acetone : Hexane, 100% Acetone 5% MeOH : Acetone, 10% MeOH : Acetone, 15% MeOH : Acetone, 20% MeOH : Acetone, 30% MeOH : Acetone, 50% MeOH : Acetone, 70% MeOH : Acetone อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (800 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1K1- M1K5) ดังรูปที่ 146

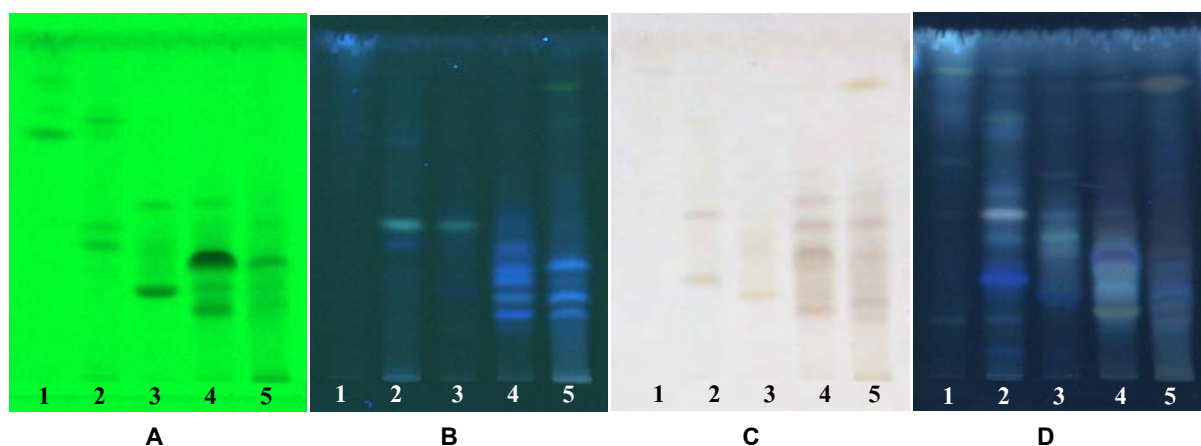


รูปที่ 146. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-J5, J6 และ J7 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1K1- M1K5 แสดงในตารางที่ 81 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 147

ตารางที่ 81. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1K1- M1K5

Fraction	วิฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1K1	100% Hexane – 50% Acetone : Hexane 0.2 L	0.0515	คราบสีเหลืองขาว
M1K2	55% Acetone : Hexane 0.3 L	0.0061	คราบสีเหลืองเข้ม
M1K3	55% Acetone : Hexane 0.3 L – 60% Acetone : Hexane 0.2 L	0.0333	ของแข็งสีน้ำตาล
M1K4	60% Acetone : Hexane 0.4 L – 70% Acetone : Hexane 0.6 L	0.1333	ของแข็งสีน้ำตาล
M1K5	80% Acetone : Hexane 0.4 L – 100% MeOH	0.0660	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม



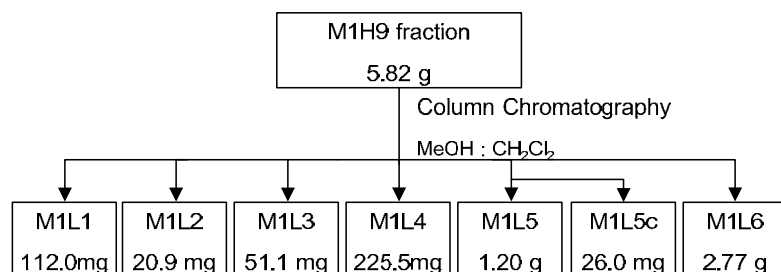
รูปที่ 147. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1K1- M1K5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 1% formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.13 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-H9

แยกส่วนของสารสกัด M1H9 น้ำหนัก 5.82 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น silica gel (230-400 mesh, 436 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 L), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 L), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 L), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 L), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> และ 100% MeOH อย่างละ 1 L หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1L1- M1L6) ดังรูปที่ 148

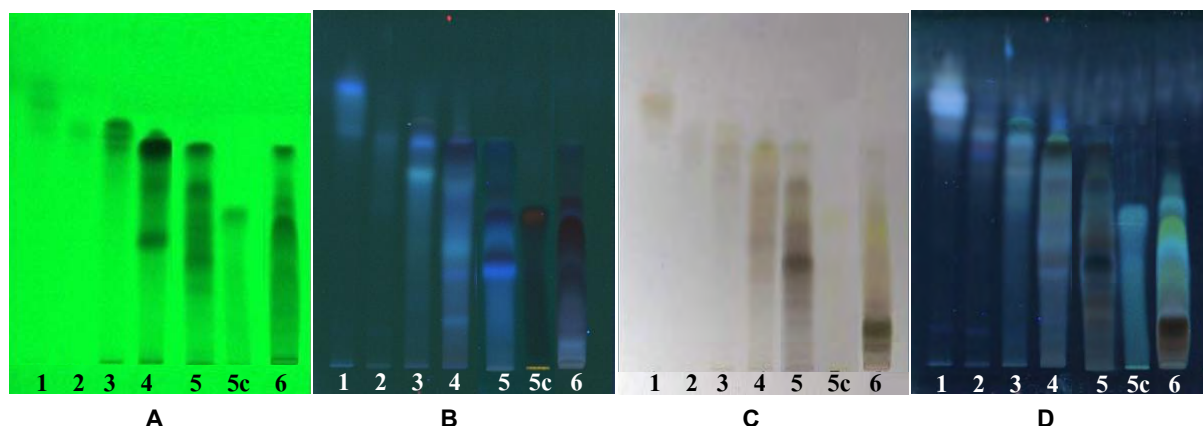


รูปที่ 148. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-H9 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1L1- M1L6 แสดงในตารางที่ 82 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 149

ตารางที่ 82. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1L1- M1L6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1L1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2 L	0.1120	คราบสีเหลือง
M1L2	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L	0.0209	คราบสีน้ำตาล
M1L3	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L	0.0511	คราบสีน้ำตาล
M1L4	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.8 L	0.2255	คราบสีน้ำตาล
M1L5	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L	1.2052	สารหนืดสีน้ำตาล
M1L5c	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L	0.0260	ของแข็งสีเหลือง
M1L6	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L – 100% MeOH	2.7766	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม



รูปที่ 149. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1L1- M1L6

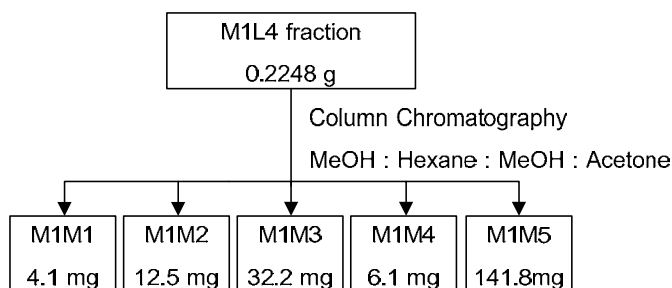
Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Acetic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



### 5.3.2.13 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-L4 (M1L4)

แยกส่วนของสารสกัด M1L4 น้ำหนัก 0.2248 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (200 mL), 5% Acetone : Hexane (200 mL), 10% Acetone : Hexane (400 mL), 15% Acetone : Hexane (400 mL), 20% Acetone : Hexane (200 mL), 30% Acetone : Hexane (2200 mL), 35% Acetone : Hexane, 40% Acetone : Hexane, 50% Acetone : Hexane, 70% Acetone : Hexane, 90% Acetone : Hexane, 100% Acetone 5% MeOH : Acetone, 10% MeOH : Acetone, 15% MeOH : Acetone, 20% MeOH : Acetone, 30% MeOH : Acetone, 50% MeOH : Acetone, 70% MeOH : Acetone อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1M1-M1M5) ดังรูปที่ 150

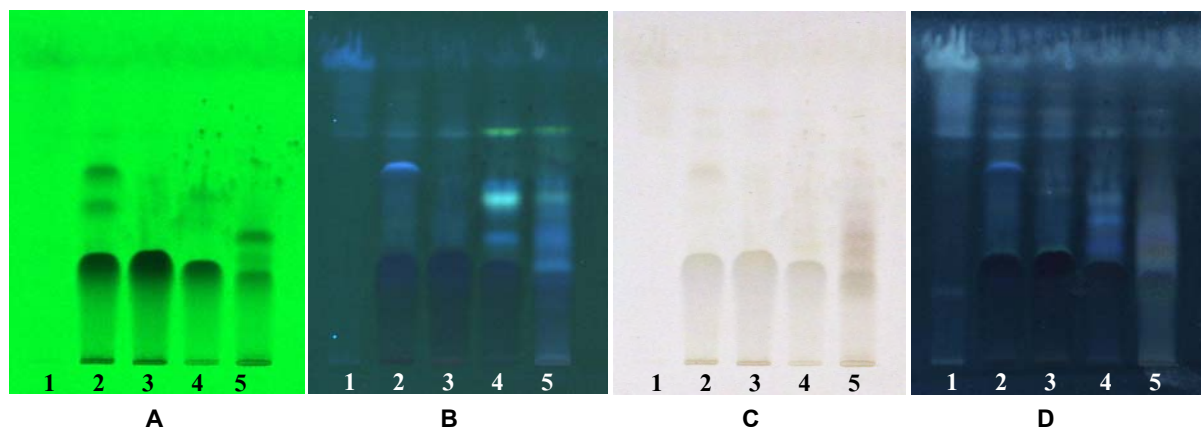


รูปที่ 150. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1M1-M1M5 แสดงในตารางที่ 83 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 151

ตารางที่ 83. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1M1-M1M5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1M1	100% Hexane – 30% Acetone : Hexane 900 mL	0.0041	คราบสีขาว
M1M2	30% Acetone : Hexane 300 mL	0.0125	ผลึกสีน้ำตาล
M1M3	30% Acetone : Hexane 1000 mL	0.0322	ผลึกสีน้ำตาล
M1M4	35% Acetone : Hexane – 40% Acetone : Hexane 300 mL	0.0061	คราบสีน้ำตาล
M1M5	40% Acetone : Hexane 100 mL – 100% MeOH	0.1418	ของแข็งสีน้ำตาล



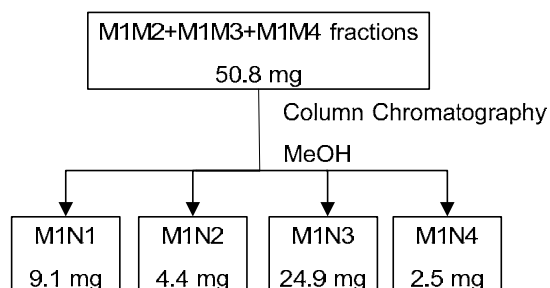
รูปที่ 151. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1M1-M1M5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9] + 1% Acetic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.14 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-M2, M3 และ M4 (M1M2+M1M3+M1M4)

แยกส่วนของสารสกัด M1M2 น้ำหนัก 0.0125 กรัม M1M3 น้ำหนัก 0.0322 กรัม และ M1M4 น้ำหนัก 0.0061 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 (40g) และใช้วัฏภาคภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Methanol (300 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 4 fractions (M1N1-M1N4) ดังรูปที่ 152



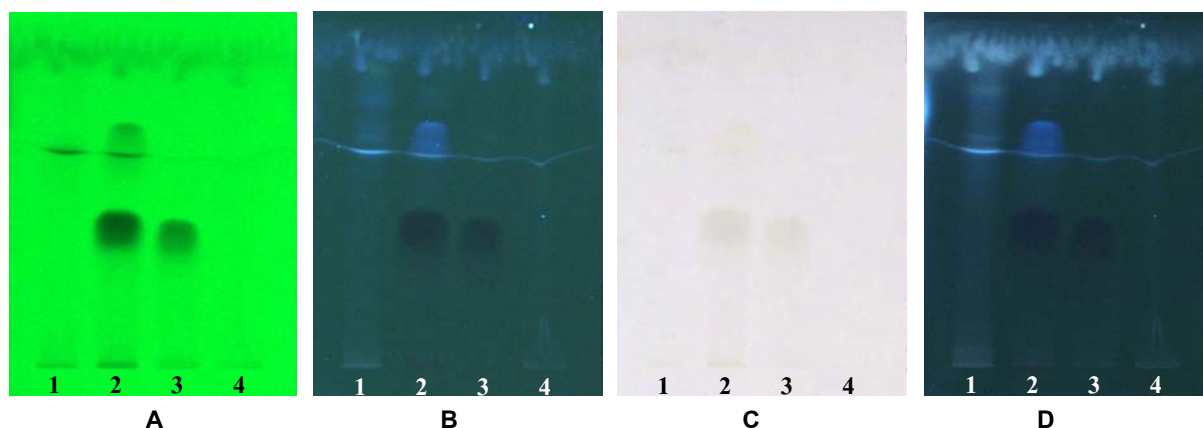
รูปที่ 152. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-M2, M3 และ M4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1N1-M1N4 แสดงในตารางที่ 84 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 4 fractions แสดงดังรูปที่ 153

ส่วนของสารสกัด M1N3 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็นสารชนิดเดียวกับ MS3c ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเมทานอลของเสม็ดชุม จึงเป็น compound 6

ตารางที่ 84. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1N1-M1N4

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1N1	100% MeOH 50 mL	0.0091	คราบสีน้ำตาล
M1N2	100% MeOH 3 mL	0.0044	คราบสีน้ำตาลเข้ม
M1N3	100% MeOH 7 mL	0.0249	ผลึกขาว
M1N 4	100% MeOH 240 mL	0.0025	คราบสีน้ำตาล



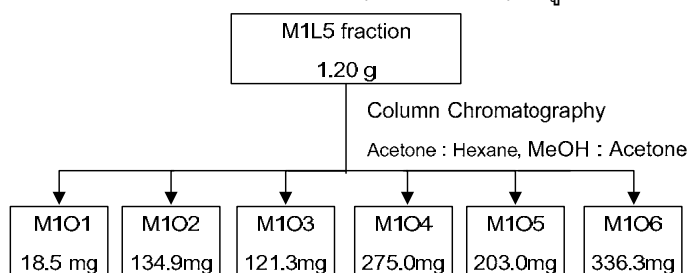
รูปที่ 153. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1N1-M1N4

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [2:8] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.15 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-L5 (M1L5)

แยกส่วนของสารสกัด M1L5 น้ำหนัก 1.2052 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 160 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane, 10% Acetone : Hexane, 20% Acetone : Hexane, 30% Acetone : Hexane, 35% Acetone : Hexane, 40% Acetone : Hexane, 45% Acetone : Hexane อย่างละ 0.4 L, 50% Acetone : Hexane, 55% Acetone : Hexane, 60% Acetone : Hexane อย่างละ 1.2 L, 65% Acetone : Hexane (2.0 L), 70% Acetone : Hexane (2.0 L), 75% Acetone : Hexane, 80% Acetone : Hexane, 90% Acetone : Hexane อย่างละ 1.2 L, 100% Acetone, 5% MeOH : Acetone, 10% MeOH : Acetone, 15% MeOH : Acetone, 20% MeOH : Acetone, 30% MeOH : Acetone, 50% MeOH : Acetone, 70% MeOH : Acetone อย่างละ 0.8 L และ 100% MeOH (1.6 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1O1-M1O6) ดังรูปที่ 154

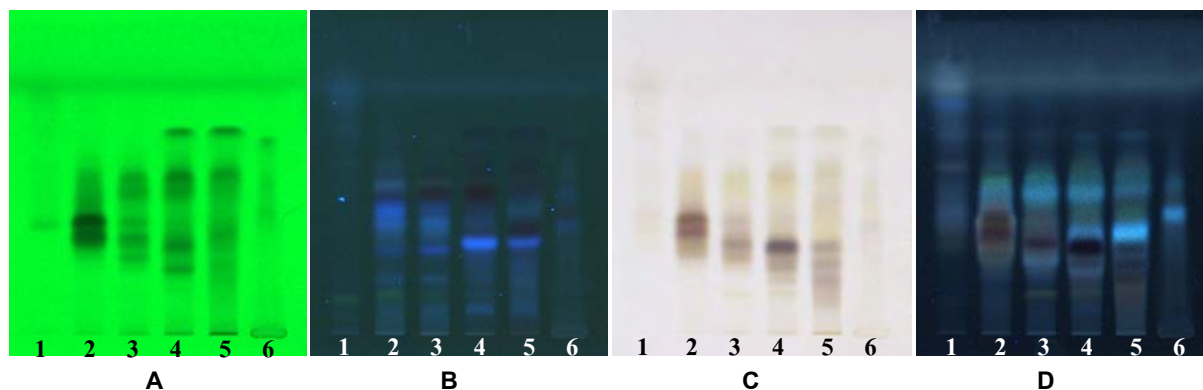


รูปที่ 154. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1O1-M1O6 แสดงในตารางที่ 85 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 155

ตารางที่ 85. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1O1-M1O6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1O1	100% Hexane – 60% Acetone : Hexane 0.2 L	0.0185	คราบสีน้ำตาล
M1O2	60% Acetone : Hexane 0.3 L – 65% Acetone : Hexane 1.7 L	0.1349	ของแข็งสีน้ำตาล
M1O3	65% Acetone : Hexane 0.3 L – 70% Acetone : Hexane 1.3 L	0.1213	ของแข็งสีน้ำตาล
M1O4	70% Acetone : Hexane 0.7 L – 90% Acetone : Hexane 0.1 L	0.2750	สารหนืดสีน้ำตาล
M1O5	90% Acetone : Hexane 1.1 L – 10% MeOH : Acetone 0.4 L	0.2030	สารหนืดสีน้ำตาล
M1O6	10% MeOH : Acetone 0.4 L – 100% MeOH	0.3363	ของแข็งสีน้ำตาล



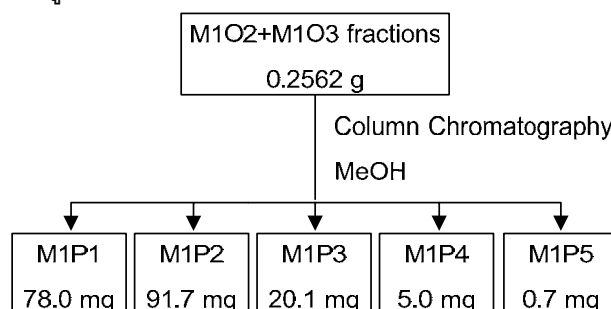
รูปที่ 155. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1O1-M1O6

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.16 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-O2 และ O3 (M1O2+M1O3)

แยกส่วนของสารสกัด M1O2 น้ำหนัก 0.1349 กรัม และ M1O3 น้ำหนัก 0.1213 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 (40g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Methanol (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1P1-M1P5) ดังรูปที่ 156

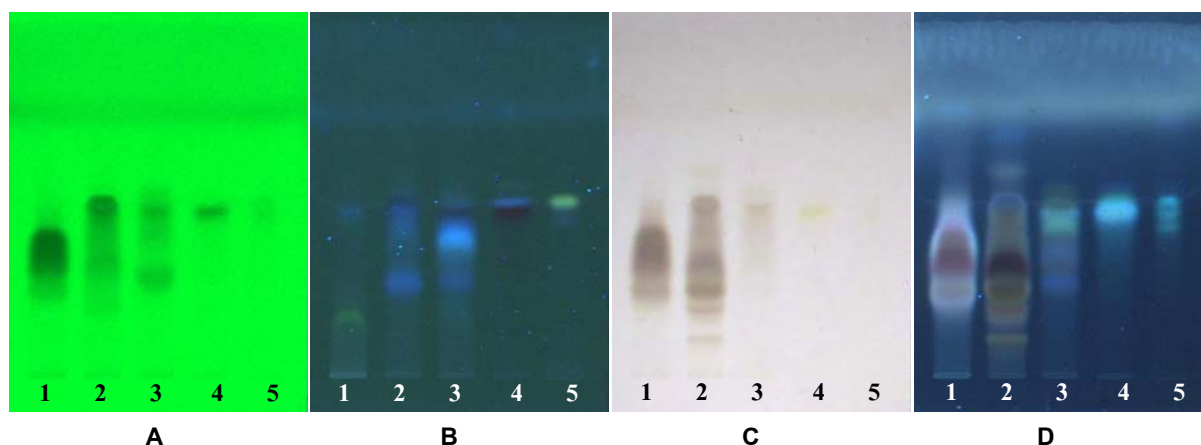


รูปที่ 156. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-O2 และ O3 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1P1-M1P5 แสดงในตารางที่ 86 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 157

ตารางที่ 86. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1P1-M1P5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1P1	100% MeOH 126 mL	0.0780	ของแข็งสีน้ำตาล
M1P2	100% MeOH 22 mL	0.0917	ของแข็งสีน้ำตาล
M1P3	100% MeOH 44 mL	0.0201	ของแข็งสีน้ำตาล
M1P4	100% MeOH 32 mL	0.0050	คราบสีเหลือง
M1P5	100% MeOH 276 mL	0.0007	คราบสีน้ำตาล



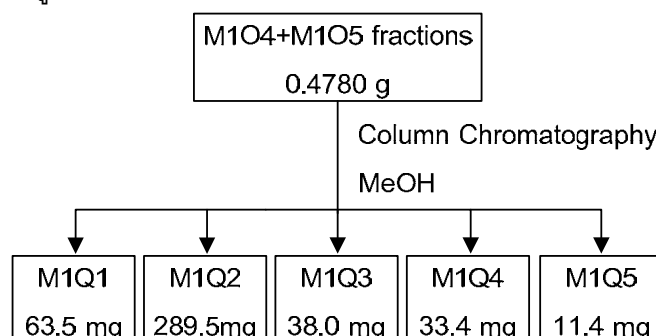
รูปที่ 157. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1P1-M1P5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.17 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-O4 และ O5 (M1O4+M1O5)

แยกส่วนของสารสกัด M1O4 น้ำหนัก 0.2750 กรัม และ M1O5 น้ำหนัก 0.2030 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัสดุภาคกรองที่เป็น Sephadex LH-20 (40g) และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Methanol (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1Q1-M1Q5) ดังรูปที่ 158

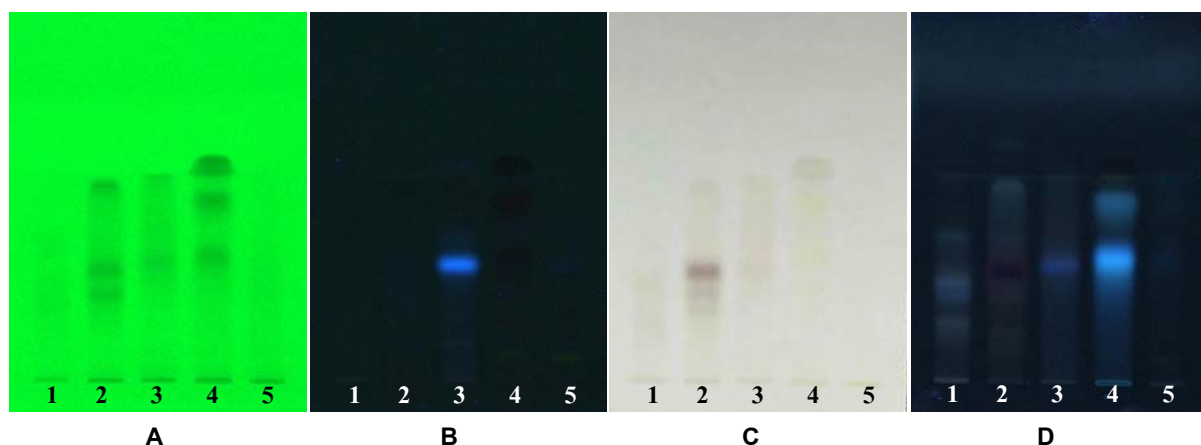


รูปที่ 158. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-O4 และ O5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1Q1-M1Q5 แสดงในตารางที่ 87 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 159

ตารางที่ 87. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1Q1-M1Q5

Fraction	วัสดุภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1Q1	100% MeOH 108 mL	0.0635	ของแข็งสีน้ำตาล
M1Q2	100% MeOH 24 mL	0.2895	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M1Q3	100% MeOH 24 mL	0.0380	ของแข็งสีน้ำตาล
M1Q4	100% MeOH 26 mL	0.0334	ของแข็งสีน้ำตาล
M1Q5	100% MeOH 318 mL	0.0114	คราบสีน้ำตาล



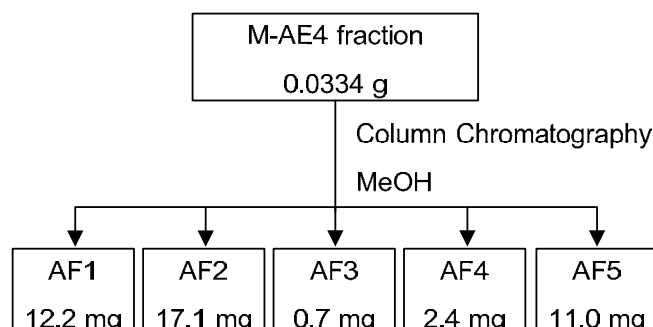
รูปที่ 159. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1Q1-M1Q5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.18 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-Q4 (M1Q4)

แยกส่วนของสารสกัด M1Q4 น้ำหนัก 0.0334 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น C-18 (20g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% Methanol : H<sub>2</sub>O (100 mL) หลังจากการรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1R1-M1R5) ดังรูปที่ 160

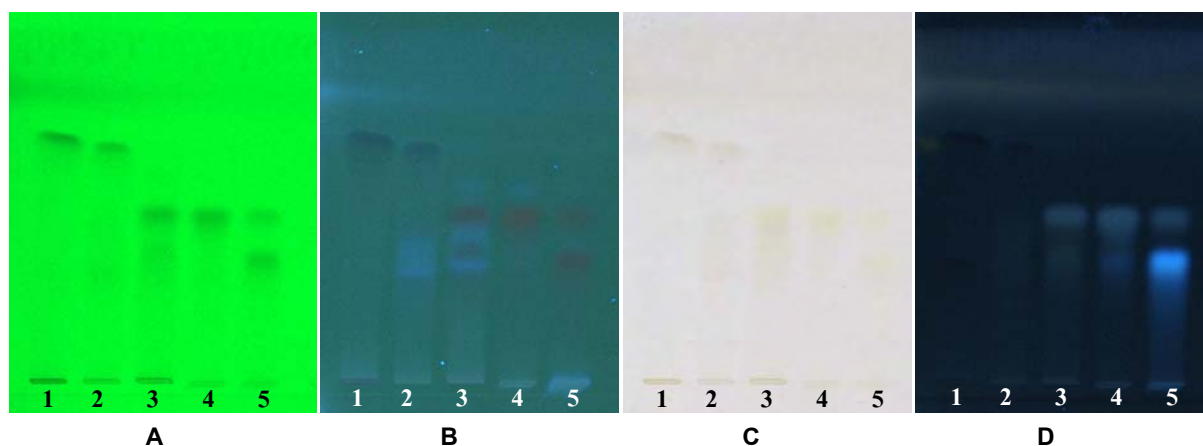


รูปที่ 160. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-AE4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1R1-M1R5 แสดงในตารางที่ 88 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 161

ตารางที่ 88. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1R1-M1R5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1R1	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 24 mL	0.0122	คราบสีน้ำตาลเข้ม
M1R2	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 14 mL	0.0171	คราบสีน้ำตาลเข้ม
M1R3	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 2 mL	0.0007	คราบสีเหลือง
M1R4	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 4 mL	0.0024	คราบสีน้ำตาล
M1R5	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 56 mL	0.0110	คราบสีน้ำตาล



รูปที่ 161. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1R1-M1R5

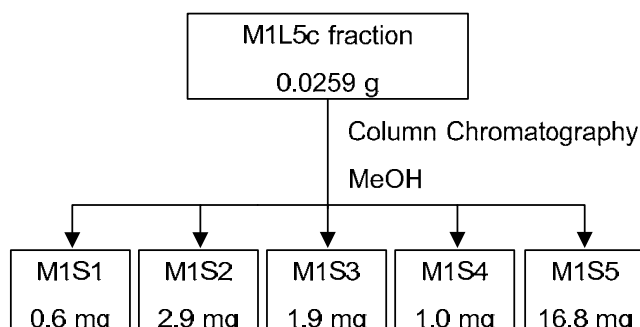
Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



### 5.3.2.19 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-L5c (M1L5c)

แยกส่วนของสารสกัด M1L5c น้ำหนัก 0.0259 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 (40g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Methanol (100 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1S1-M1S5) ดังรูปที่ 162



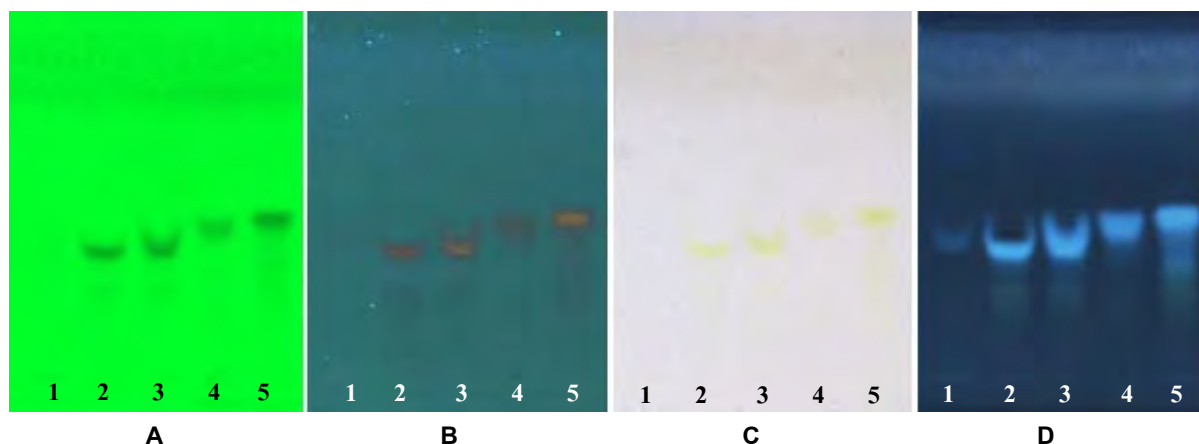
รูปที่ 162. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L5c ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1S1-M1S5 แสดงในตารางที่ 89 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 163

ส่วนของสารสกัด M1S5 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง น้ำหนัก 16.8 ให้เป็น compound 10

ตารางที่ 89. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1S1-M1S5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1S1	100% MeOH 47 mL	0.0006	คราบสีเหลือง
M1S2	100% MeOH 5 mL	0.0029	คราบสีเหลือง
M1S3	100% MeOH 6 mL	0.0019	คราบสีเหลือง
M1S4	100% MeOH 2 mL	0.0010	คราบสีเหลือง
M1S5	100% MeOH 40 mL	0.0168	ของแข็งสีเหลือง



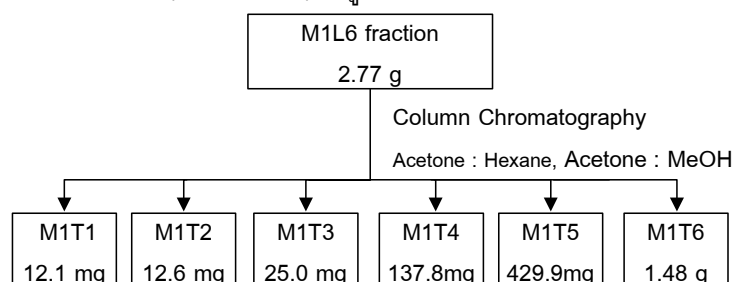
รูปที่ 163. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัดที่ M1S1-M1S5

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.20 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-L6 (M1L6)

แยกส่วนของสารสกัด M1L6 น้ำหนัก 2.77 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 200 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane, 5% Acetone : Hexane, 10% Acetone : Hexane, 15% Acetone : Hexane, 20% Acetone : Hexane, 30% Acetone : Hexane อย่างละ 400 mL, 35% Acetone : Hexane (800 mL), 40% Acetone : Hexane (1.2 L), 50% Acetone : Hexane (1.2 L), 60% Acetone : Hexane (3.0 L), 70% Acetone : Hexane (3.0 L), 80% Acetone : Hexane, 90% Acetone : Hexane, 100% Acetone 5% MeOH : Acetone, 10% MeOH : Acetone, 15% MeOH : Acetone, 20% MeOH : Acetone, 30% MeOH : Acetone, 50% MeOH : Acetone, 70% MeOH : Acetone, 90% MeOH : Acetone อย่างละ 800 mL และ 100% MeOH (1.6 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1T1-M1T6) ดังรูปที่ 164

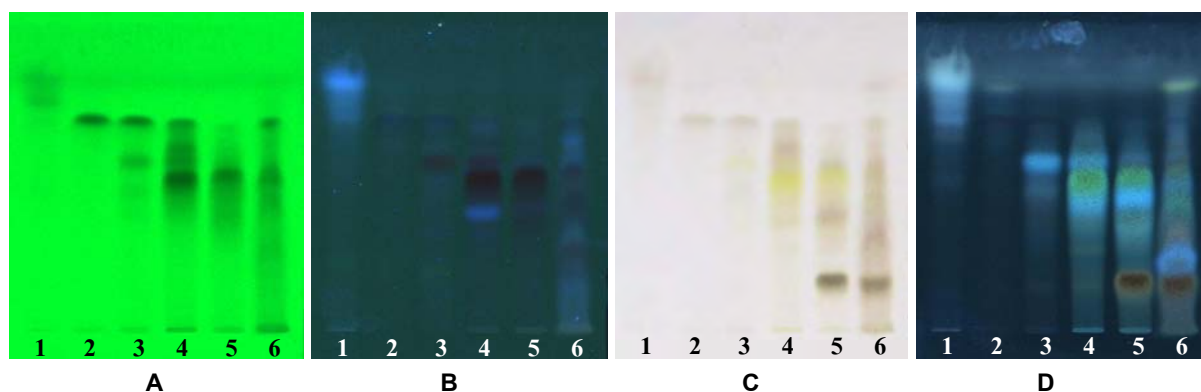


รูปที่ 164. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-L6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1T1-M1T6 แสดงในตารางที่ 90 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 165

ตารางที่ 90. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก M1T1-M1T6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1T1	100% Hexane – 50% Acetone : Hexane 150 mL	0.0121	คราบสีดำ
M1T2	50% Acetone : Hexane 1.05 L – 55% Acetone : Hexane 1.25 L	0.0126	คราบสีน้ำตาลแดง
M1T3	55% Acetone : Hexane 1.95 L – 60% Acetone : Hexane 0.7 L	0.0250	ของแข็งสีน้ำตาล
M1T4	60% Acetone : Hexane 1.45 L	0.1378	ของแข็งสีเหลือง
M1T5	60% Acetone : Hexane 0.25 L – 90% Acetone : Hexane 0.2 L	0.4299	ของแข็งสีเหลือง
M1T6	90% Acetone : Hexane 0.6 L – 100% MeOH	1.4859	สารหนืดสีน้ำตาล



รูปที่ 165. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1T1-M1T6

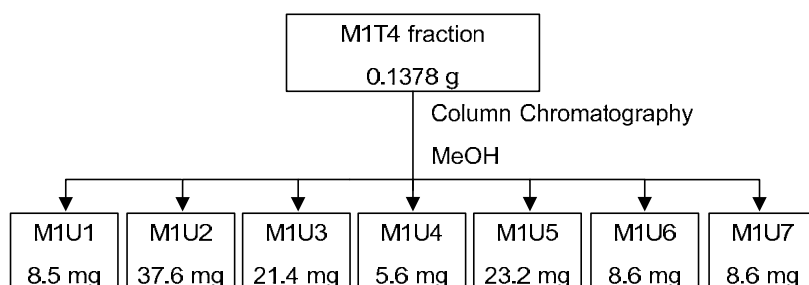
Solvent system : MeOH : EtOAc [2:8] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



### 5.3.2.21 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-T4 (M1T4)

แยกส่วนของสารสกัด M1T4 น้ำหนัก 0.1378 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น C-18 (45g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% Methanol : H<sub>2</sub>O (200 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (M1U1-M1U7) ดังรูปที่ 166

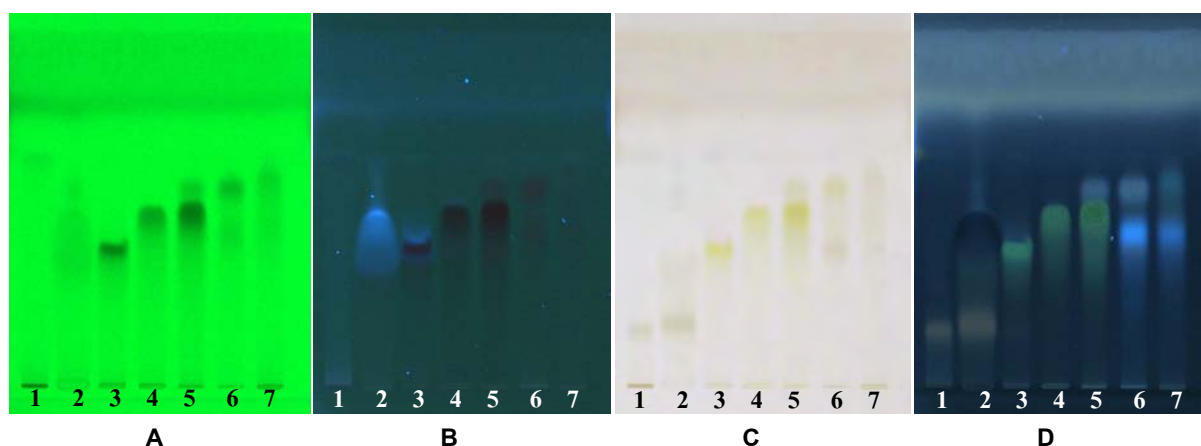


รูปที่ 166. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-T4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1U1-M1U7 แสดงในตารางที่ 91 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 167

ตารางที่ 91. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1U1-M1U7

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1U1	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 46 mL	0.0085	คราบสีน้ำตาล
M1U2	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 11 mL	0.0376	คราบสีน้ำตาล
M1U3	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 6 mL	0.0214	ของแข็งสีเหลือง
M1U4	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 3 mL	0.0056	ของแข็งสีเหลือง
M1U5	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 10 mL	0.0232	ของแข็งสีเหลือง
M1U6	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 11 mL	0.0086	คราบสีน้ำตาล
M1U7	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 113 mL	0.0076	คราบสีน้ำตาล



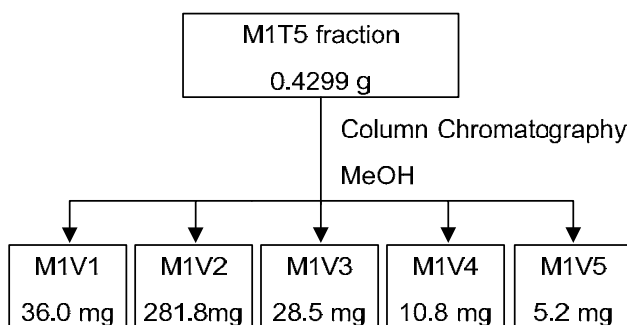
รูปที่ 167. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1U1-M1U7

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.22 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-T5 (M1T5)

แยกส่วนของสารสกัด M1T5 น้ำหนัก 0.4299 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 (40g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Methanol (400 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1V1-M1V5) ดังรูปที่ 168

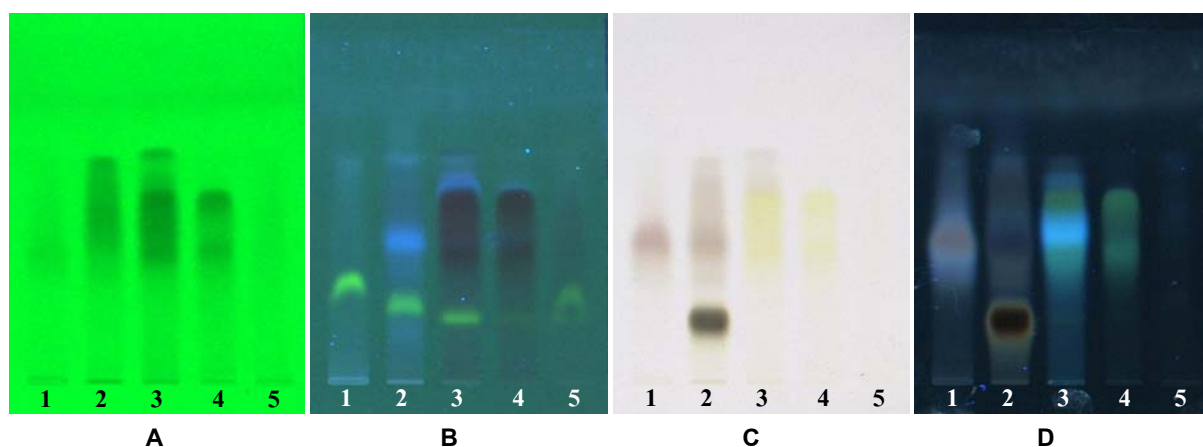


รูปที่ 168. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-T5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1V1-M1V5 แสดงในตารางที่ 92 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 169

ตารางที่ 92. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1V1-M1V5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1V1	100% MeOH 120 mL	0.0360	ของแข็งสีน้ำตาล
M1V2	100% MeOH 60 mL	0.2818	ฟองหนืดสีน้ำตาล
M1V3	100% MeOH 46 mL	0.0285	ของแข็งสีน้ำตาล
M1V4	100% MeOH 16 mL	0.0108	ของแข็งสีน้ำตาล
M1V5	100% MeOH 158 mL	0.0052	ของแข็งสีน้ำตาล



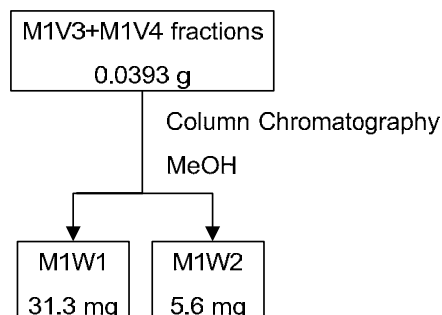
รูปที่ 169. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1V1-M1V5

Solvent system : MeOH : EtOAc [2:8] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.23 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-V3 และ V4 (M1V3+M1V4)

แยกส่วนของสารสกัด M1V3 น้ำหนัก 0.0285 กรัม และ M1V4 น้ำหนัก 0.0108 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น C-18 (45g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% Methanol : H<sub>2</sub>O (200 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 2 fractions (M1W1-M1W2) ดังรูปที่ 170

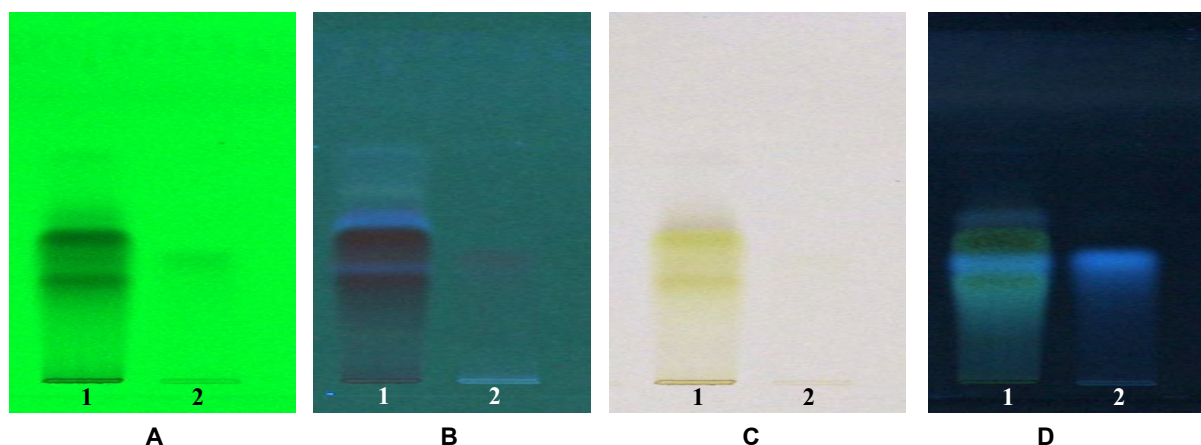


รูปที่ 170. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-AA3+AA4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1W1-M1W2 แสดงในตารางที่ 93 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 2 fractions แสดงดังรูปที่ 171

ตารางที่ 93. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1W1-M1W2

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1W1	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 124 mL	0.0313	คราบสีน้ำตาล
M1W2	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 76 mL	0.0056	คราบสีเหลือง



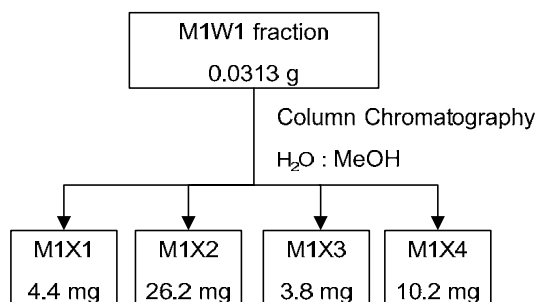
รูปที่ 171. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1W1-M1W2

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.24 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-W1 (M1W1)

แยกส่วนของสารสกัด M1W1 น้ำหนัก 0.0313 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น C-18 (45g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% Methanol : H<sub>2</sub>O (200 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 4 fractions (M1X1-M1X4) ดังรูปที่ 172

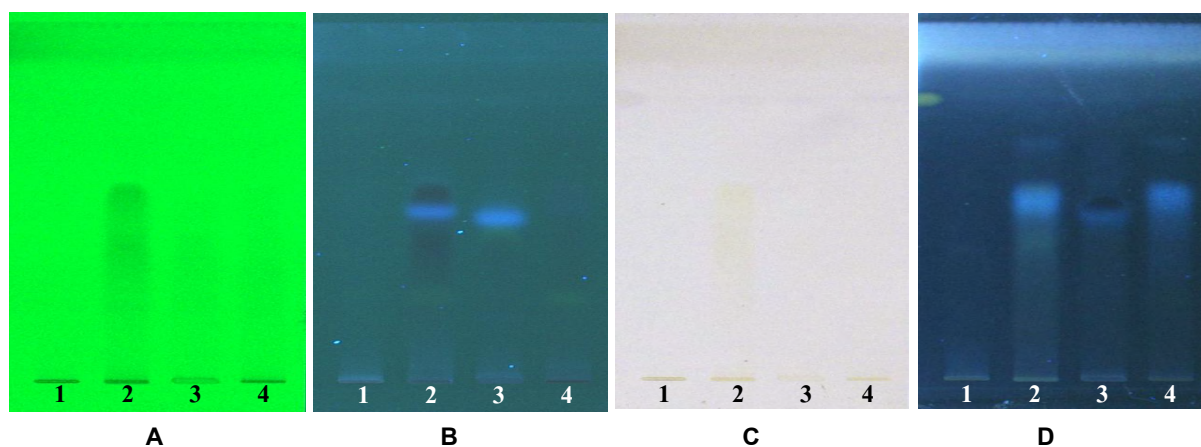


รูปที่ 172. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-W1 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1X1-M1X4 แสดงในตารางที่ 94 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 4 fractions แสดงดังรูปที่ 173

ตารางที่ 94. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1X1-M1X4

Fraction	วิฤภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1X1	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 42 mL	0.0044	คราบสีน้ำตาล
M1X2	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 7 mL	0.0262	ของแข็งสีน้ำตาล
M1X3	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 11 mL	0.0038	คราบสีเหลือง
M1X4	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 140 mL	0.0102	คราบสีเหลือง



รูปที่ 173. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1X1-M1X4

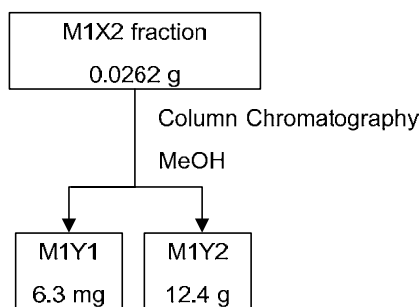
Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.25 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-X2 (M1X2)

แยกส่วนของสารสกัด M1X2 น้ำหนัก 0.0262 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิฤภาคคงที่เป็น C-18 (45g) และใช้วิฤภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 80% Methanol : H<sub>2</sub>O (50 mL), 70% Methanol : H<sub>2</sub>O (50 mL), 60% Methanol : H<sub>2</sub>O (50 mL), 50% Methanol : H<sub>2</sub>O (100 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 2 fractions (M1Y1-M1Y2) ดังรูปที่ 174

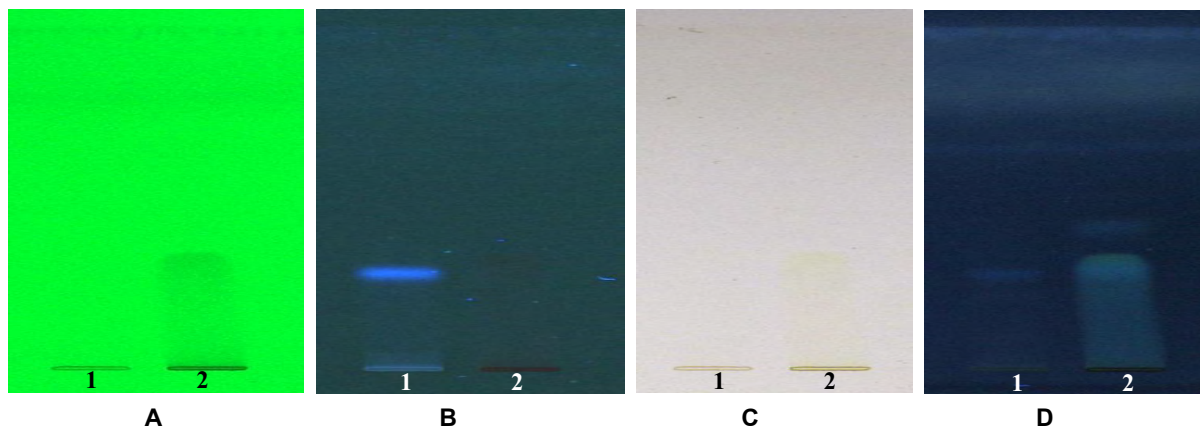
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1Y1-M1Y2 แสดงในตารางที่ 95 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 2 fractions แสดงดังรูปที่ 175



รูปที่ 174. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-X2 ด้วย column chromatography

ตารางที่ 95. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1Y1-M1Y2

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1Y1	80% Methanol : H <sub>2</sub> O 50 mL – 50% Methanol : H <sub>2</sub> O 12 mL	0.0063	ของแข็งสีน้ำตาล
M1Y2	50% Methanol : H <sub>2</sub> O 88 mL	0.0124	ของแข็งสีน้ำตาล



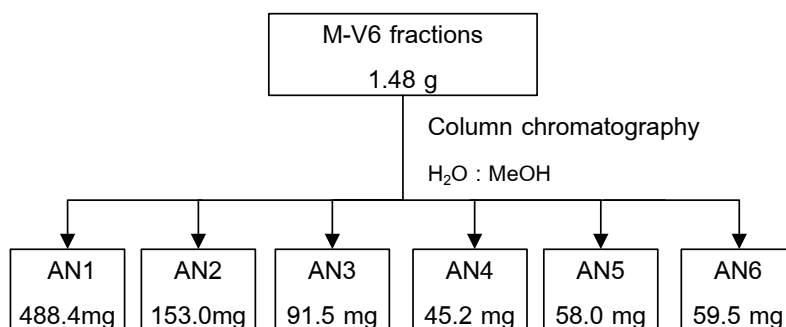
รูปที่ 175. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1Y1-M1Y2

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

#### 5.3.2.26 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-T6 (M1T6)

แยกส่วนของสารสกัด M1T6 น้ำหนัก 1.4859 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น C-18 (100g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% Methanol : H<sub>2</sub>O (400 mL), 60% Methanol : H<sub>2</sub>O (100 mL) และ 100% MeOH (100 mL) หลังจากกรวมน้ำหนักของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1Z1-M1Z6) ดังรูปที่ 176

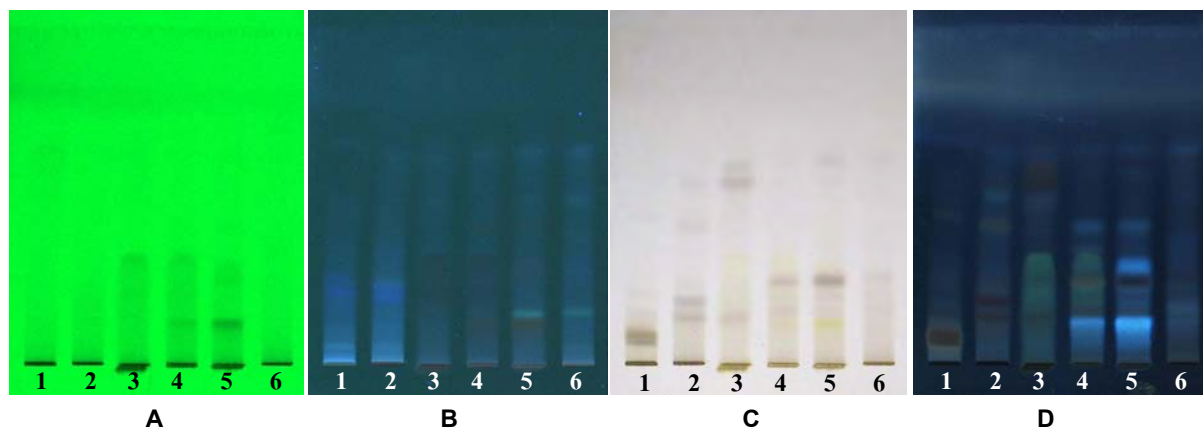


รูปที่ 176. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-T6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1Z1-M1Z6 แสดงในตารางที่ 96 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 177

ตารางที่ 96. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1Z1-M1Z6

Fraction	วิฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1Z1	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 136 mL	0.4884	ฟองหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M1Z2	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 24 mL	0.1530	ฟองหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M1Z3	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 24 mL	0.0915	ฟองหนืดสีน้ำตาล
M1Z4	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 24 mL	0.0452	คราบสีน้ำตาลเข้ม
M1Z5	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 45 mL	0.0580	คราบสีน้ำตาลเข้ม
M1Z6	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 47 mL – 100% MeOH	0.0595	คราบสีน้ำตาลเข้ม



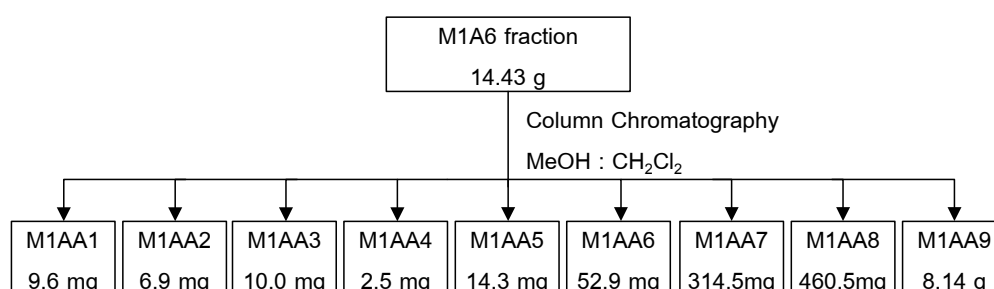
รูปที่ 177. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1Z1-M1Z6

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.27 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-A6 (M1A6)

แยกส่วนของสารสกัด M1A6 น้ำหนัก 14.43 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 350 g) และใช้วิฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 L), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 L), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 500 mL และ 100% MeOH (2 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 9 fractions (M1AA1- M1AA9) ดังรูปที่ 178



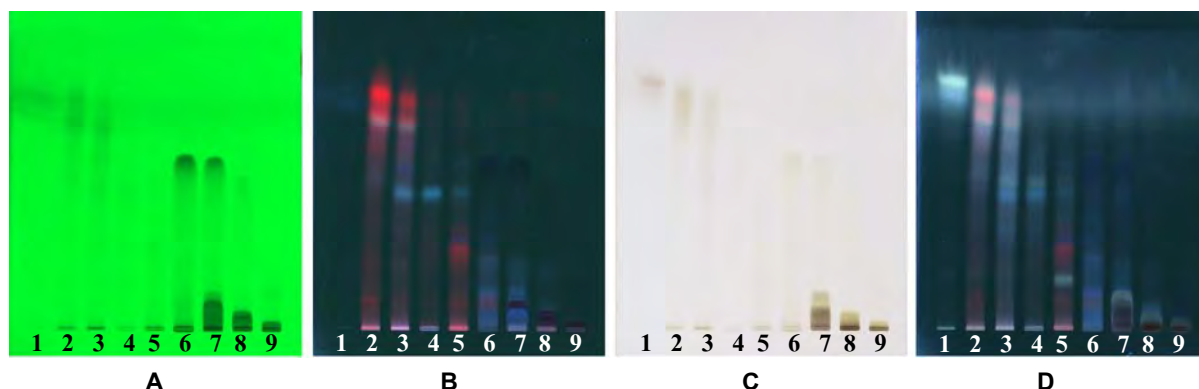
รูปที่ 178. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-A6 ด้วย column chromatography



น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AA1- M1AA9 แสดงในตารางที่ 97 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 9 fractions แสดงดังรูปที่ 179

ตารางที่ 97. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AA1-M1AA9

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AA1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.0096	คราบสีขาว
M1AA2	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	0.0069	คราบสีเขียวเข้ม
M1AA3	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.3 L	0.0100	ของแข็งสีเขียวเหลือง
M1AA4	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	0.0025	คราบสีเขียวเข้ม
M1AA5	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	0.0143	ของแข็งสีเหลืองเข้ม
M1AA6	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L – 25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L	0.0529	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M1AA7	25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L – 30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.3 L	0.3145	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M1AA8	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.35 L	0.4605	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M1AA9	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.15 L – 100% MeOH	8.14	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม



รูปที่ 179. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AA1-M1AA9

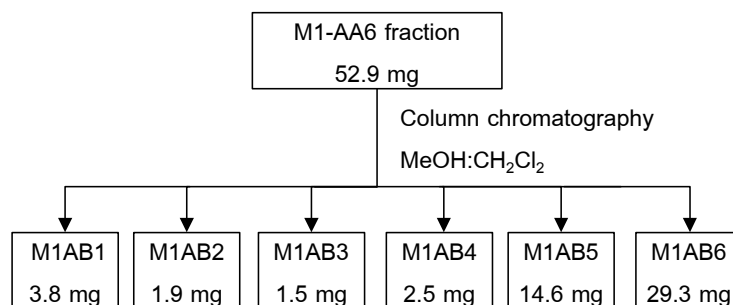
Solvent system : MeOH : EtOAc [0.5:9.5]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.28 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AA6 (M1AA6)

แยกส่วนของสารสกัด M1AA6 น้ำหนัก 0.0529 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 60 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL), 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 100 mL และ 100% MeOH (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1AB1-M1AB6) ดังรูปที่ 180



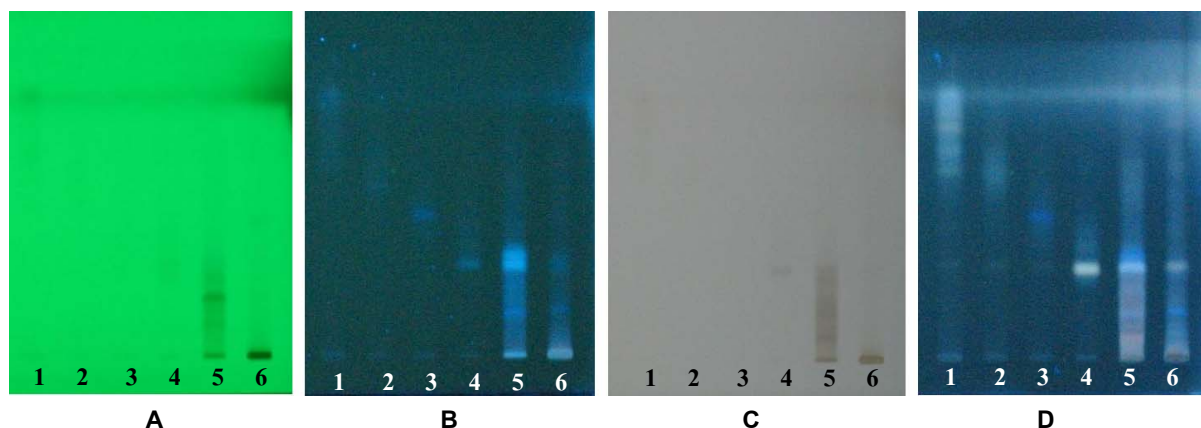


รูปที่ 180. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AA6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AB1-M1AB6 แสดงในตารางที่ 98 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 181

ตารางที่ 98. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฤภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AB1-M1AB6

Fraction	วิฤภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AB1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 250 mL	0.0038	คราบสีดำ
M1AB2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 25 mL	0.0019	คราบสีขาว
M1AB3	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 75 mL – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	0.0015	คราบสีเขียว
M1AB4	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	0.0025	คราบสีเขียวเข้ม
M1AB5	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L – 50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 25 mL	0.0146	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
M1AB6	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 75 mL – 100% MeOH	0.0293	ของแข็งสีเขียวเข้ม



รูปที่ 181. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AB1-M1AB6

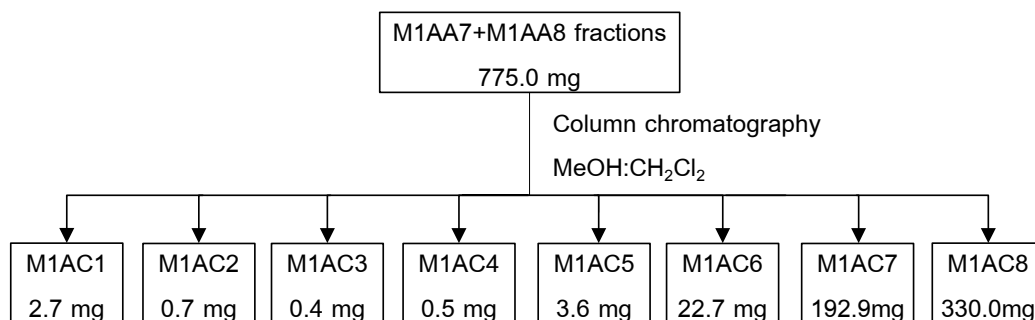
Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.29 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AA7 และ AA8 (M1AA7+M1AA8)

แยกส่วนของสารสกัด M1AA7 น้ำหนัก 0.3145 กรัม และ M1AA8 น้ำหนัก 0.4605 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิฤภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 60 g) และใช้วิฤภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,

70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 300 mL และ 100% MeOH (1 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (M1AC1-M1AC8) ดังรูปที่ 182



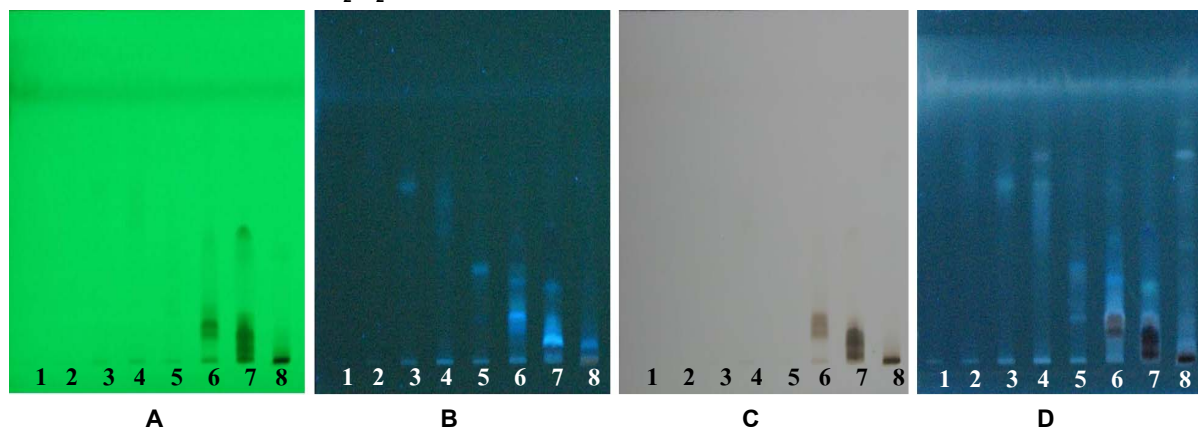
รูปที่ 182. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AA7 และ AA8 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AC1-M1AC8 แสดงในตารางที่ 99 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions แสดงดังรูปที่ 183

ตารางที่ 99. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของภูมิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AC1-M1AC8

Fraction	ภูมิภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AC1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 250 mL	0.0251	คราบสีน้ำตาลแดง
M1AC2	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	0.0007	คราบสีขาว
M1AC3	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	0.0004	คราบสีขาว
M1AC4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL	0.0005	คราบสีขาว
M1AC5	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL	0.0036	คราบสีเหลืองเขียว
M1AC6	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL	0.0227	ของแข็งสีเหลือง
M1AC7	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 200 mL – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL	0.1929	ของแข็งสีเหลือง
M1AC8	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 150 mL – 100% MeOH	0.3300	ของแข็งสีน้ำตาล

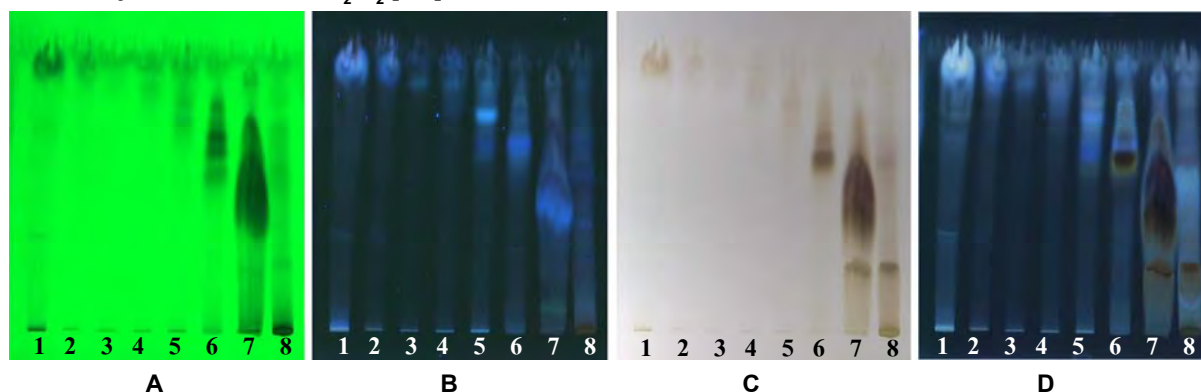
Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]



รูปที่ 183. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AC1-M1AC8

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [3:7]

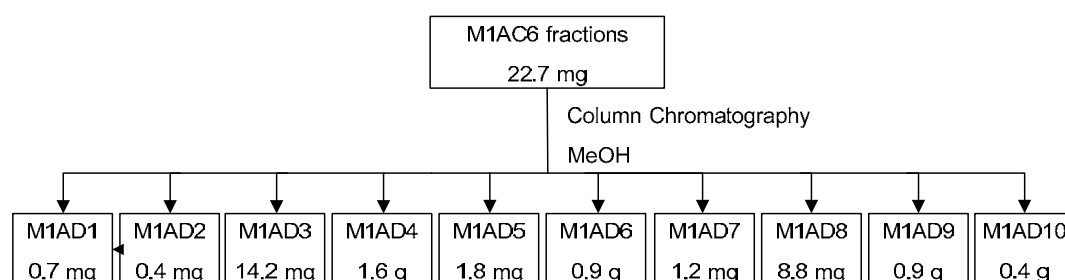


รูปที่ 183. (ต่อ) TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AC1-M1AC8

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.30 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC6 (M1AC6)

แยกส่วนของสารสกัด M1AC6 น้ำหนัก 0.0227 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 (40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% MeOH (500 mL), 50% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (200 mL) และ 100% Methanol (200 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัด (fraction) ที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 10 fractions (M1AD1- M1AD10) ดังรูปที่ 184

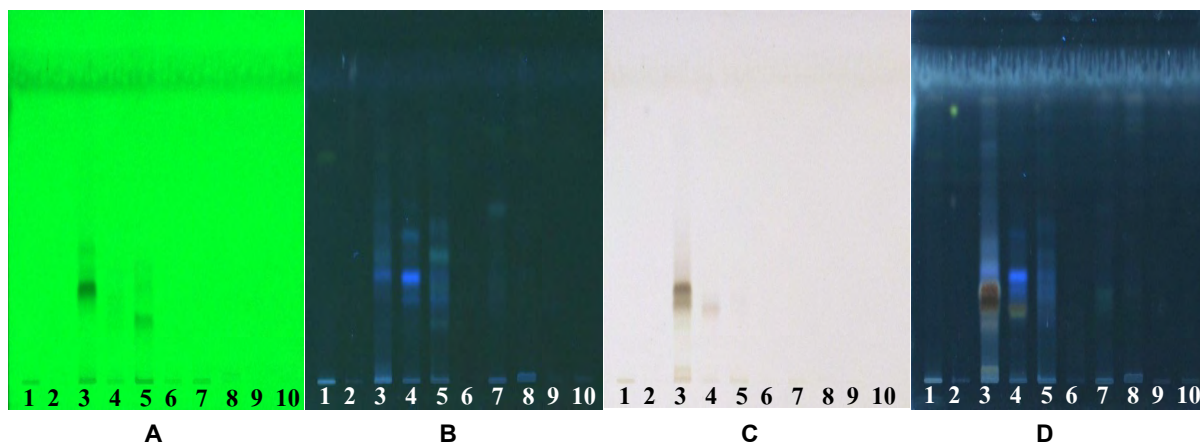


รูปที่ 184. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AD1- M1AD10 แสดงในตารางที่ 100 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 10 fractions แสดงดังรูปที่ 185

ตารางที่ 100. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AD1- M1AD10

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AD1	100% MeOH 25 mL	0.0007	คราบสีเหลืองอ่อน
M1AD2	100% MeOH 5 mL	0.0004	คราบสีเหลืองอ่อน
M1AD3	100% MeOH 15 mL	0.0142	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
M1AD4	100% MeOH 6 mL	0.0016	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
M1AD5	100% MeOH 12 mL	0.0018	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
M1AD6	100% MeOH 2 mL	0.0009	คราบสีเหลืองอ่อน
M1AD7	100% MeOH 106 mL	0.0012	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
M1AD8	100% MeOH 329 mL	0.0088	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
M1AD9	50% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH 200 mL	0.0009	คราบสีขาว
M1AD10	100% MeOH 200 mL	0.0004	คราบสีขาว



รูปที่ 185. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AD1- M1AD10

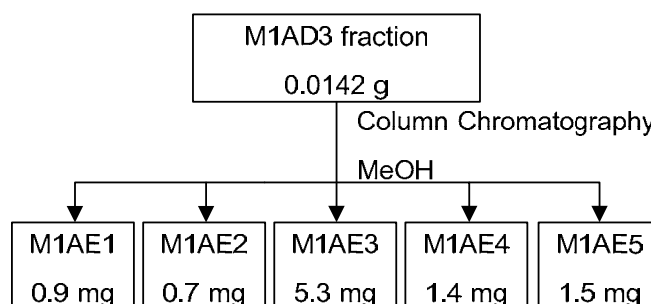
Adsorbent : Silica gel 60 F<sub>254</sub>

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1.5:8.5]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.31 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AD3 (M1AD3)

แยกส่วนของสารสกัด M1AD3 น้ำหนัก 0.0142 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคองที่เป็น Sephadex LH-20 (40g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Methanol (300 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1AE1-M1AE5) ดังรูปที่ 186

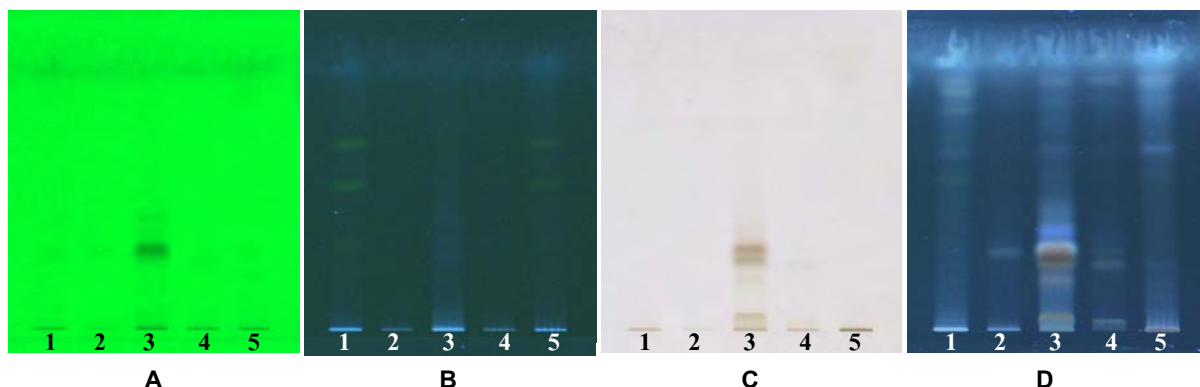


รูปที่ 186. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AD3 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AE1-M1AE5 แสดงในตารางที่ 101 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 187

ตารางที่ 101. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AE1-M1AE5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AE1	100% MeOH 27 mL	0.0009	คราบสีขาว
M1AE2	100% MeOH 3 mL	0.0007	คราบสีขาว
M1AE3	100% MeOH 9 mL	0.0053	คราบสีน้ำตาล
M1AE4	100% MeOH 15 mL	0.0014	คราบสีน้ำตาล
M1AE5	100% MeOH 246 mL	0.0015	คราบสีน้ำตาล



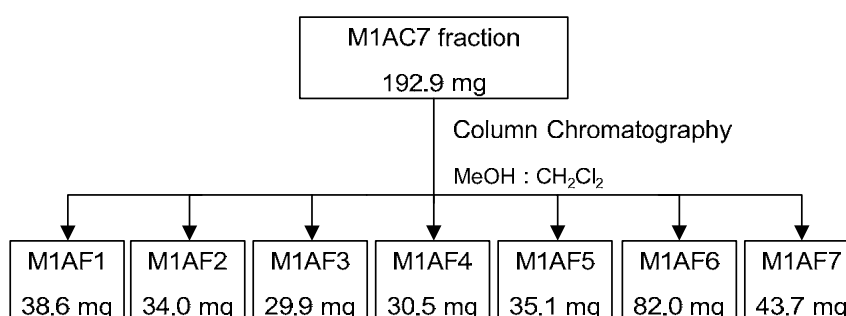
รูปที่ 187. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AE1-M1AE5

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1.5:8.5]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.32 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC7 (M1AC7)

แยกส่วนของสารสกัด M1AC7 น้ำหนัก 0.1929 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 60 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 12% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 17% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 80% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 300 mL และ 100% H<sub>2</sub>O : MeOH (1000 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (M1AF1-M1AF7) ดังรูปที่ 188



รูปที่ 188. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC7 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AF1-M1AF7 แสดงในตารางที่ 102 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 189

ตารางที่ 102. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AF1-M1AF7

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AF1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mL	0.0386	ของแข็งสีเหลือง
M1AF2	2% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.1 L	0.0340	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
M1AF3	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.15 L	0.0299	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
M1AF4	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.15 L – 12% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 75 mL	0.0305	ของแข็งสีเหลืองแดง
M1AF5	12% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 225 mL – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 175 mL	0.0351	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล

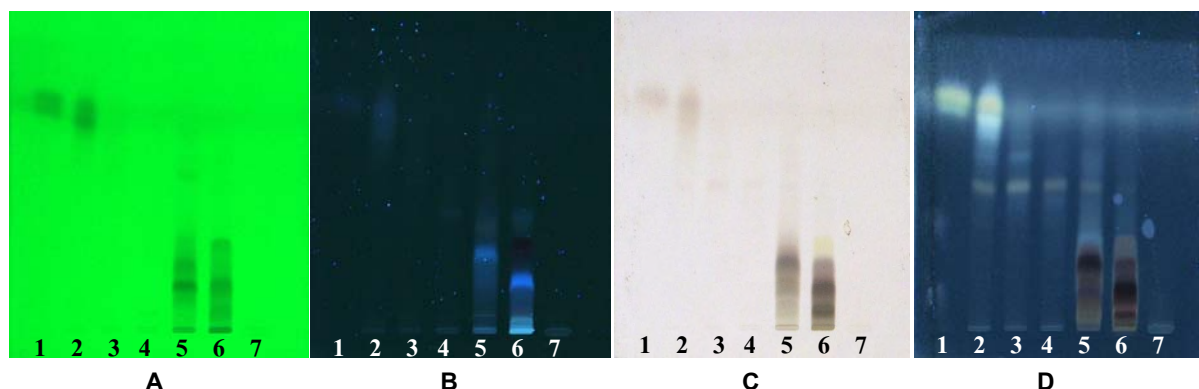


Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AF6	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 125 mL – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 175 mL	0.0820	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
M1AF7	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 125 mL – 100% MeOH	0.0437	ของแข็งสีเหลืองเขียว

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]



Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5:8.5]



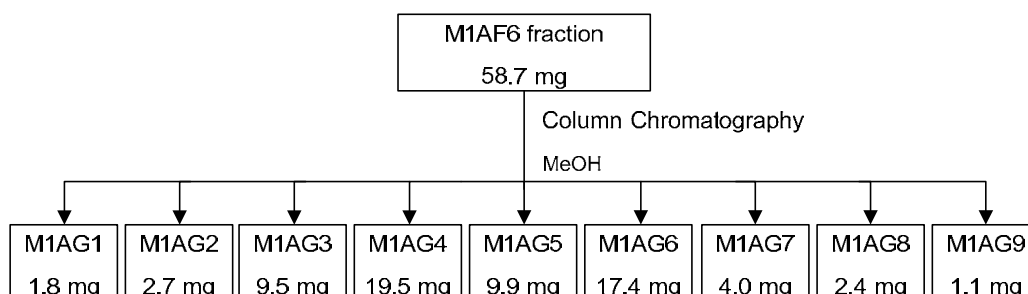
รูปที่ 189. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AF1-M1AF7

Adsorbent : Silica gel 60 F<sub>254</sub>

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.33 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AF6 (M1AF6)

แยกส่วนของสารสกัด M1AF6 น้ำหนัก 0.0587 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Sephadex LH-20 (40 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 100% MeOH (300 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 9 fractions (M1AG1-M1AG9) ดังรูปที่ 190

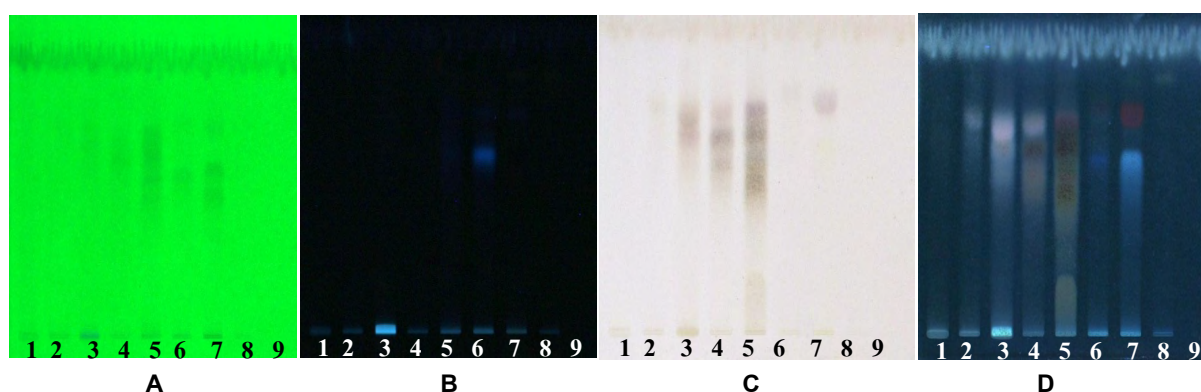


รูปที่ 190. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AF6 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AG1-M1AG9 แสดงในตารางที่ 103 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 9 fractions แสดงดังรูปที่ 191

ตารางที่ 103. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AG1-M1AG9

Fraction	วิภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AG1	100% MeOH 10 mL	0.0018	ของแข็งสีเหลือง
M1AG2	100% MeOH 7 mL	0.0027	ของแข็งสีเหลือง
M1AG3	100% MeOH 11 mL	0.0095	ของแข็งสีเหลืองเข้ม
M1AG4	100% MeOH 4 mL	0.0099	ของแข็งสีเหลือง
M1AG5	100% MeOH 12 mL	0.0174	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
M1AG6	100% MeOH 14 mL	0.0042	ของแข็งสีเหลืองเข้ม
M1AG7	100% MeOH 30 mL	0.0040	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
M1AG8	100% MeOH 66 mL	0.0024	คราบสีเหลืองปนน้ำตาล
M1AG9	100% MeOH 146 mL	0.0011	คราบสีน้ำตาล



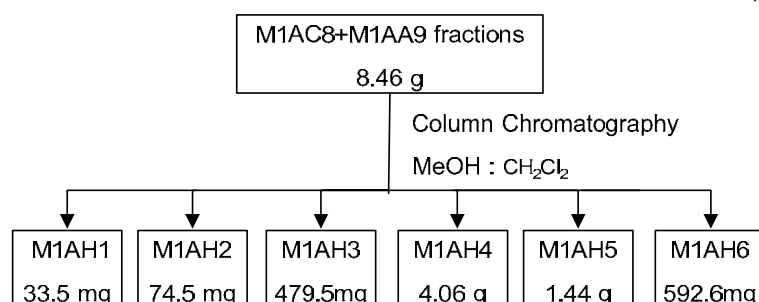
รูปที่ 191. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AG1-M1AG9

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [2:8]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.34 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC8 และ AA9 (M1AC8+M1AA9)

แยกส่วนของสารสกัด M1AC8 น้ำหนัก 0.3300 กรัม และ M1AA9 น้ำหนัก 8.1351 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 135g) และใช้วิภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 1 L, 100% MeOH (2 L) และ 50% H<sub>2</sub>O : MeOH (2 L) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1AH1-M1AH6) ดังรูปที่ 192



รูปที่ 192. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AC8 และ AA9 ด้วย column chromatography

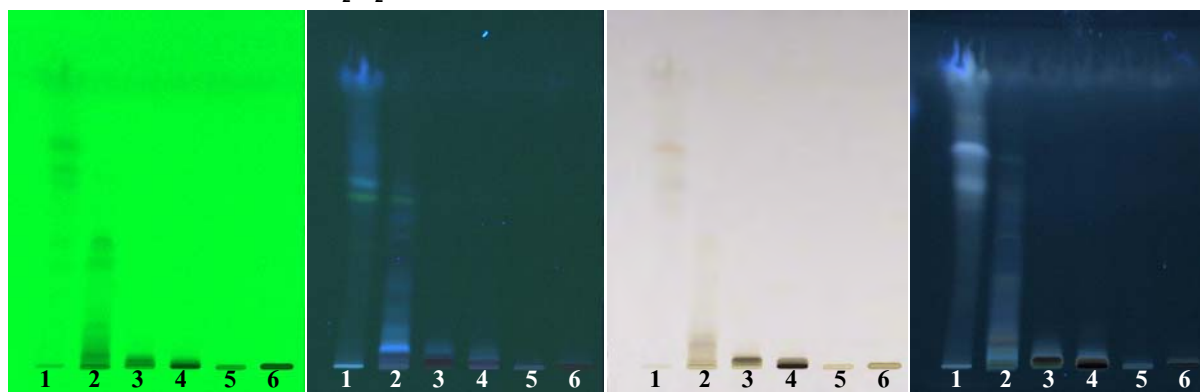


น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AH1-M1AH6 แสดงในตารางที่ 104 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 193

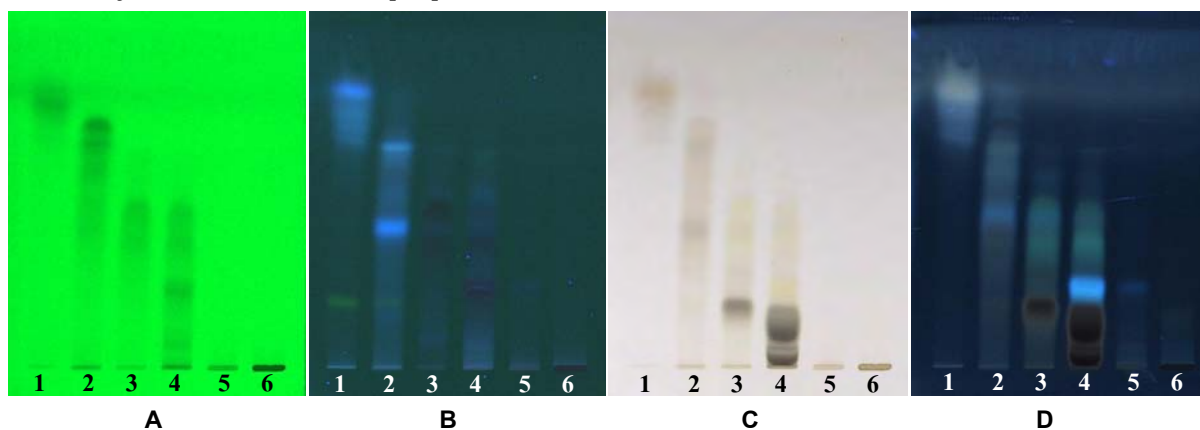
ตารางที่ 104. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก M1AH1-M1AH6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AH1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.0 L – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.7 L	0.0335	คราบสีน้ำตาลอ่อน
M1AH2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.3 L – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	0.0745	สารหนืดสีน้ำตาล
M1AH3	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.8 L – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L	0.4795	สารหนืดสีน้ำตาล
M1AH4	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.4 L – 50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L	4.0663	สารหนืดสีน้ำตาล
M1AH5	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.4 L – 90% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.0 L	1.4495	สารหนืดสีน้ำตาล
M1AH6	100% MeOH 2.0 L – 50% H <sub>2</sub> O : MeOH 2.0 L	0.5926	ของแข็งสีน้ำตาล

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]



Solvent system : MeOH : EtOAc [2:8] + 1% Formic acid



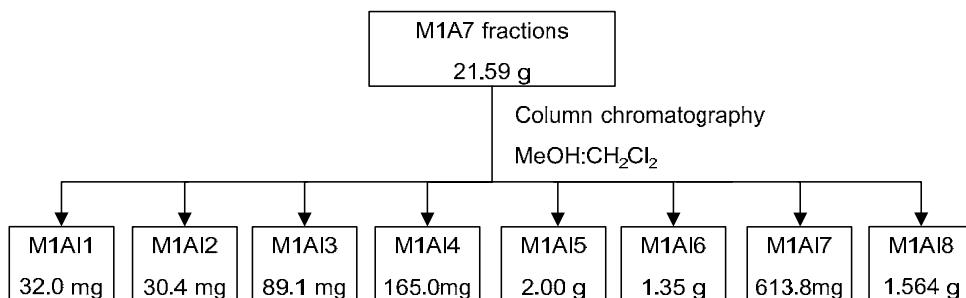
รูปที่ 193. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AH1-M1AH6

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.35 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-A7 (M1A7)

แยกส่วนของสารสกัด M1A7 น้ำหนัก 21.59 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 1100 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 L), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 L), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 60% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 80% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, และ 100%

MeOH อย่างละ 2 L หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (M1AI1-M1AI8) ดังรูปที่ 194



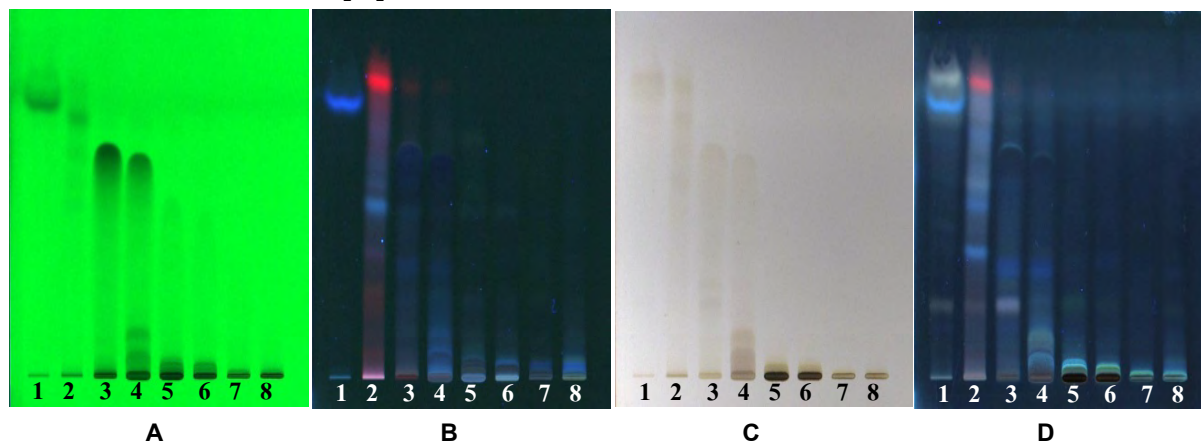
รูปที่ 194. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-A7 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AI1-M1AI8 แสดงในตารางที่ 105 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions แสดงดังรูปที่ 195

ตารางที่ 105. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AI1-M1AI8

Fraction	วิฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AI1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2.75 L	0.0032	คราบสีขาว
M1AI2	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L	0.0304	คราบสีน้ำตาล
M1AI3	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.75 L – 30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.25 L	0.0891	คราบสีน้ำตาล
M1AI4	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.75 L – 40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.50 L	0.1650	ของแข็งสีน้ำตาล
M1AI5	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L – 50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.25 L	2.0026	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M1AI6	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.75 L – 60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L	1.3599	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M1AI7	60% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L – 70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.0 L	0.6138	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M1AI8	70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.0 L – 100% MeOH	1.5649	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม

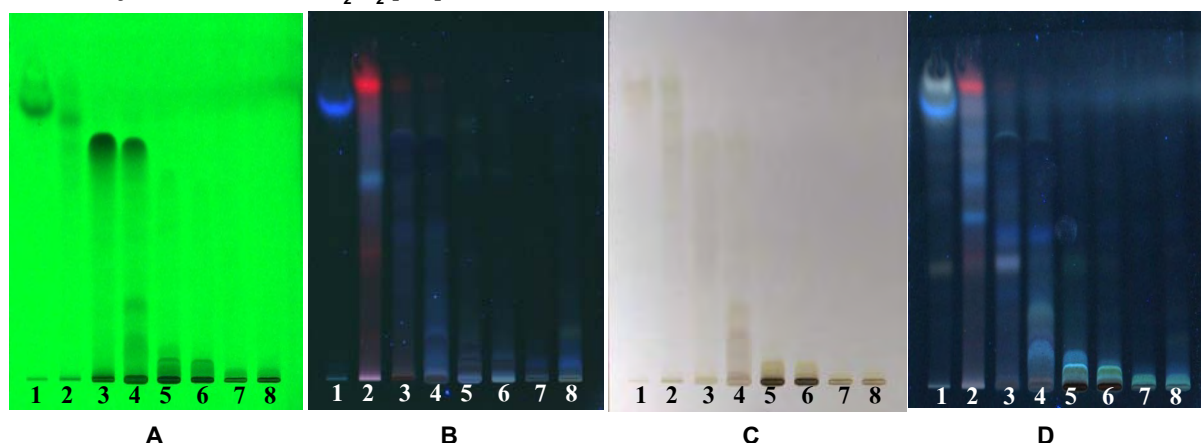
Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [0.5:9.5]



รูปที่ 195. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AI1-M1AI8

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]

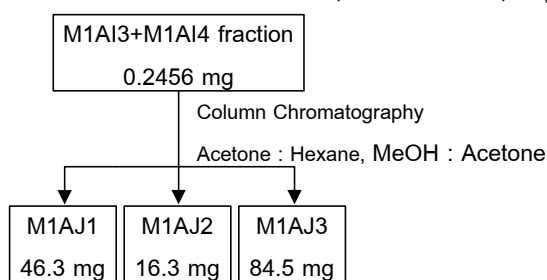


รูปที่ 195. (ต่อ) TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AI1-M1AI8

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.35 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AI3 และ AI4 (M1AI3+M1AI4)

แยกส่วนของสารสกัด M1AI3 น้ำหนัก 0.0872 กรัม และ M1AI4 น้ำหนัก 0.1584 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 65 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% Hexane (200 mL), 5% Acetone : Hexane (200 mL), 10% Acetone : Hexane (200 mL), 15% Acetone : Hexane (400 mL), 20% Acetone : Hexane (1200 mL), 25% Acetone : Hexane (800 mL), 30% Acetone : Hexane (800 mL), 40% Acetone : Hexane (800 mL), 50% Acetone : Hexane (800 mL), 70% Acetone : Hexane (800 mL), 80% Acetone : Hexane (800 mL), 100% Acetone, 10% MeOH : Acetone, 20% MeOH : Acetone, 30% MeOH : Acetone, 50% MeOH : Acetone, 70% MeOH : Acetone, 80% MeOH : Acetone, 100% Acetone อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (1.2 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 3 fractions (M1AJ1-M1AJ3) ดังรูปที่ 196



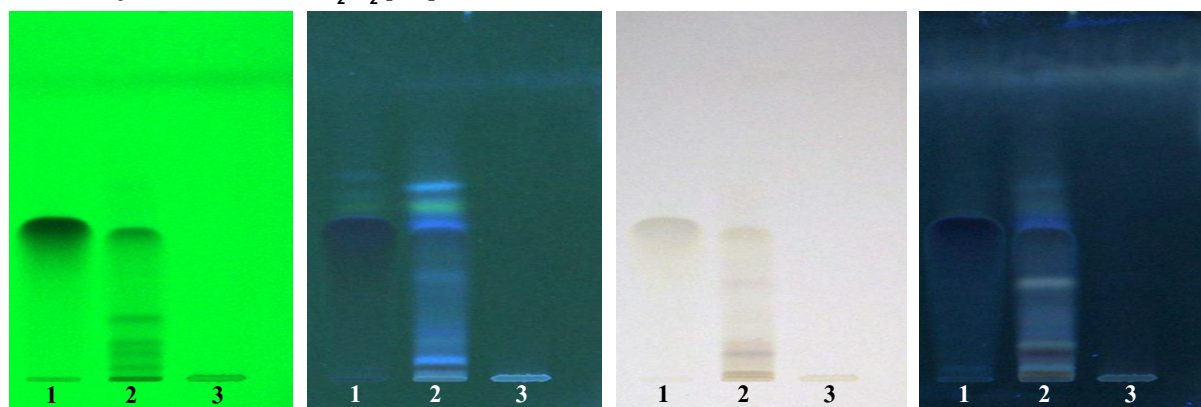
รูปที่ 196. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AI3 และ AI4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AJ1-M1AJ3 แสดงในตารางที่ 106 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 3 fractions แสดงดังรูปที่ 197

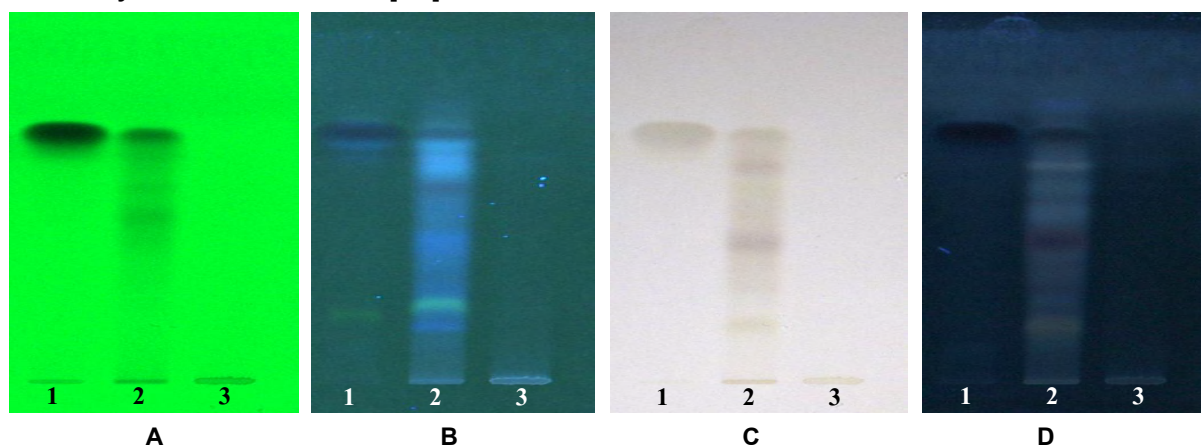
ตารางที่ 106. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AJ1-M1AJ3

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AJ1	100% Hexane – 25% Acetone : Hexane	0.0463	ผลึกสีขาว
M1AJ2	30% Acetone : Hexane – 80% Acetone : Hexane	0.0163	ของแข็งสีน้ำตาล
M1AJ3	100% Acetone – 100% MeOH	0.0845	ของแข็งสีน้ำตาล

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:9]



Solvent system : MeOH : EtOAc [2:8] + 1% Formic acid

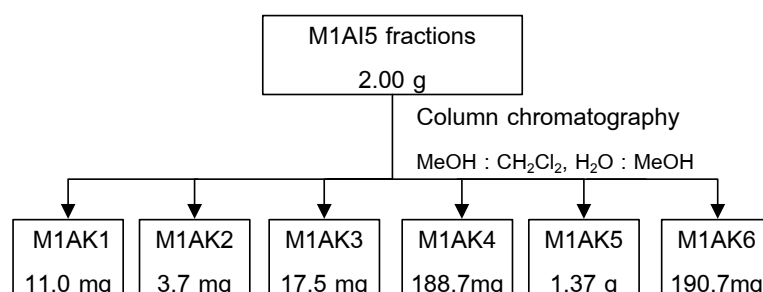


รูปที่ 197. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AJ1-M1AJ3

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.36 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AI5 (M1AI5)

แยกส่วนของสารสกัด M1AI5 น้ำหนัก 2.0 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น silica gel (230-400 mesh, 200 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 L), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 L), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 L), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 L), 25% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.2 L), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 mL), 100% MeOH (500 mL) และ 20% H<sub>2</sub>O : MeOH (500 mL) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M1AK1-M1AK6) ดังรูปที่ 198



รูปที่ 198. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH-L5 ด้วย column chromatography

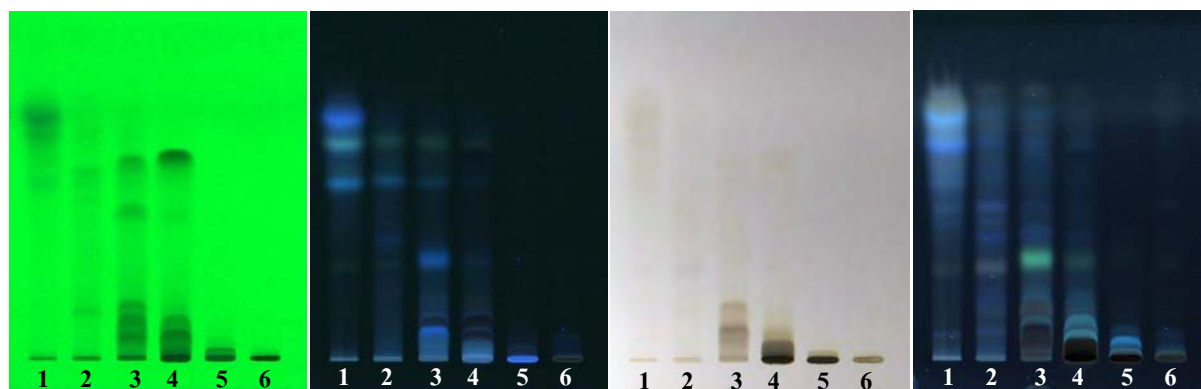
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AK1-M1AK6 แสดงในตารางที่ 107 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 199



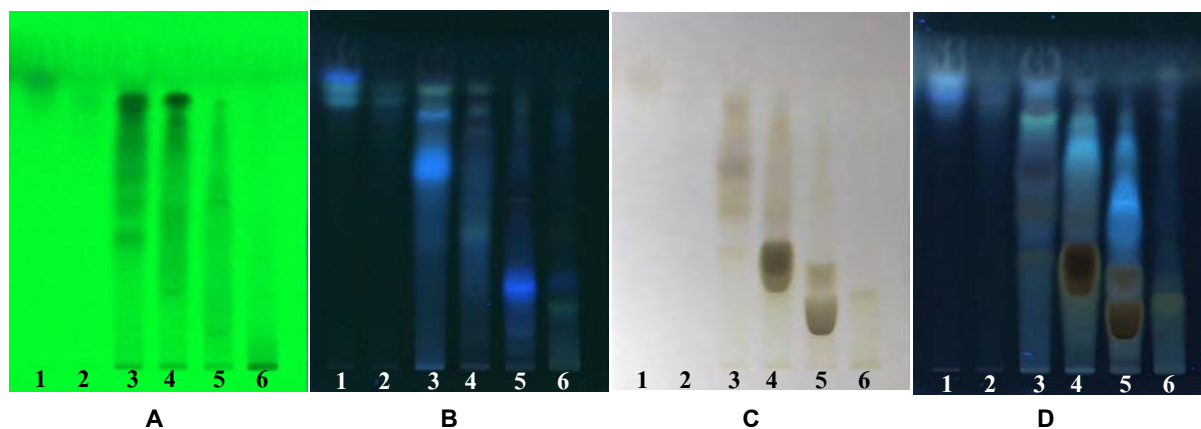
ตารางที่ 107. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AK1-M1AK6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AK1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L	0.0110	คราบสีน้ำตาลอ่อน
M1AK2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2.4 L – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.8 L	0.0037	คราบสีน้ำตาลอ่อน
M1AK3	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.6 L	0.0175	คราบสีน้ำตาลอ่อน
M1AK4	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.6 L – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L	0.1887	สารหนืดสีน้ำตาล
M1AK5	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.8 L – 40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.35 L	1.3732	สารหนืดสีน้ำตาล
M1AK6	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.85 L – 20% H <sub>2</sub> O : MeOH	0.1907	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม

Solvent system : MeOH : EtOAc [1:9]



Solvent system : MeOH : EtOAc [3:7]

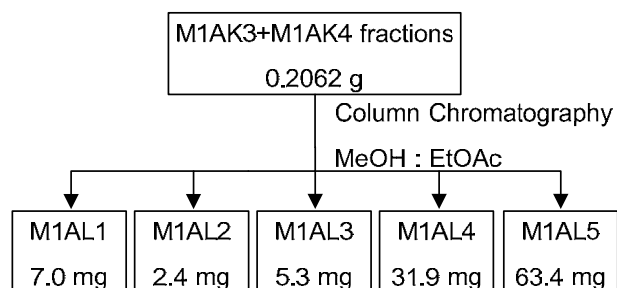


รูปที่ 199. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AK1-M1AK6

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.37 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AK3 และ AK4 (M1AK3+M1AK4)

แยกส่วนของสารสกัด M1AK3 น้ำหนัก 0.0175 กรัม และ M1AK4 น้ำหนัก 0.1887 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 70g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% EtOAc (1100 mL), 1% MeOH : EtOAc (200 mL), 3% MeOH : EtOAc (600 mL), 5% MeOH : EtOAc (600 mL), 7% MeOH : EtOAc (400 mL), 10% MeOH : EtOAc (1200 mL), 15% MeOH : EtOAc, 20% MeOH : EtOAc, 30% MeOH : EtOAc, 50% MeOH : EtOAc, 70% MeOH : EtOAc อย่างละ 400 mL และ 100% MeOH (800 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M1AL1-M1AL5) ดังรูปที่ 200

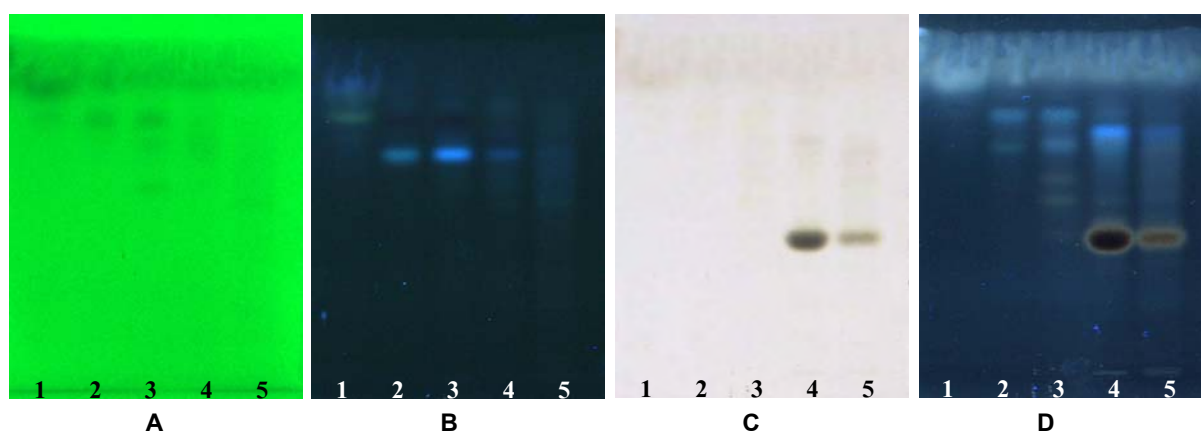


รูปที่ 200. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AK3 และ AK4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AL1-M1AL5 แสดงในตารางที่ 108 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 201

ตารางที่ 108. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AL1-M1AL5

Fraction	วิฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AL1	100% EtOAc 600 mL	0.0070	คราบสีน้ำตาล
M1AL2	100% EtOAc 500 mL – 3% MeOH : EtOAc 100 mL	0.0024	คราบสีน้ำตาล
M1AL3	3% MeOH : EtOAc 500 mL	0.0053	คราบสีน้ำตาล
M1AL4	5% MeOH : EtOAc 400 mL	0.0319	คราบสีน้ำตาล
M1AL5	5% MeOH : EtOAc 200 mL – 100% MeOH	0.0634	ของแข็งสีน้ำตาล



รูปที่ 201. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AL1-M1AL5

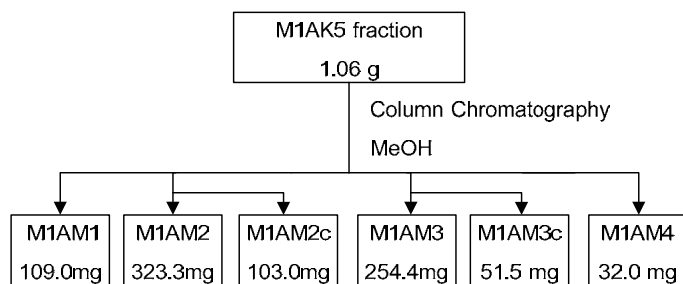
Solvent system : Butanol : Propanol : Acetic acid : H<sub>2</sub>O [3:1:1:1]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.38 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AK5 (M1AK5)

แยกส่วนของสารสกัด M1AK5 น้ำหนัก 0.0125 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิฏภาคคกที่เป็น Sephadex LH-20 (40g) และใช้วิฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 100% Methanol (500 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 4 fractions (M1AM1-M1AM4) ดังรูปที่ 202

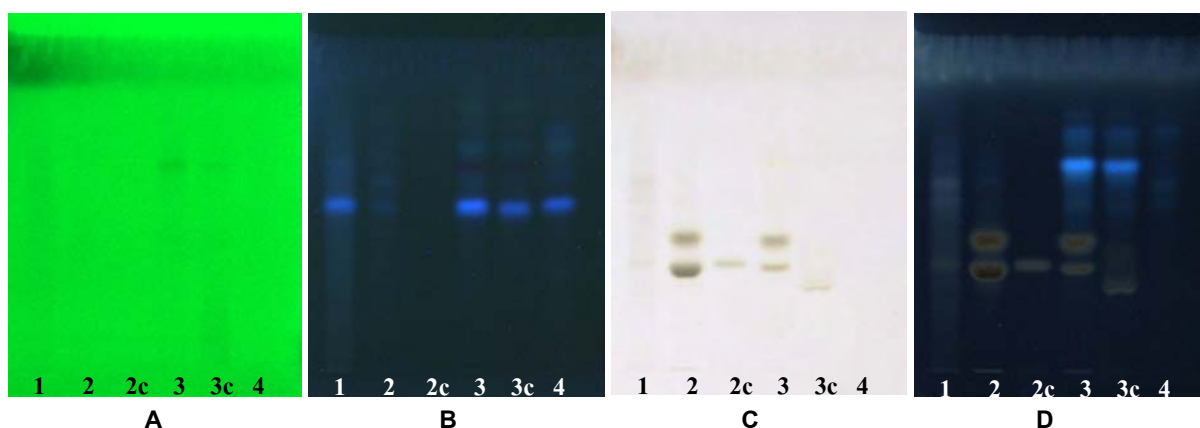
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AM1-M1AM4 แสดงในตารางที่ 109 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 4 fractions แสดงดังรูปที่ 203



รูปที่ 202. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AK5 ด้วย column chromatography

ตารางที่ 109. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวิฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AM1-M1AM4

Fraction	วิฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AM1	100% MeOH 130 mL	0.1090	ฟองหนืดสีน้ำตาล
M1AM2	100% MeOH 25 mL	0.3233	ฟองหนืดสีเหลืองอ่อน
M1AM2c		0.1030	ผลึกสีขาว
M1AM3	100% MeOH 70 mL	0.2544	หนืดสีน้ำตาล
M1AM3c		0.0515	ผลึกขาวปนเหลือง
M1AM4	100% MeOH 275 mL	0.0320	ของแข็งสีน้ำตาล



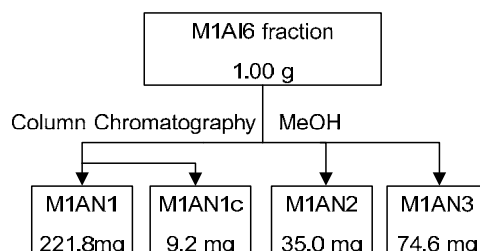
รูปที่ 203. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AM1-M1AM4

Solvent system : Butanol : Propanol : Acetic acid : H<sub>2</sub>O [3:1:1:1]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.2.39 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH1-AI6 (M1AI6)

แยกส่วนของสารสกัด M1AI6 น้ำหนัก 1.0082 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วิฏภาคคองที่เป็น Sephadex LH-20 (40g) และใช้วิฏภาคภาคเคลื่อนที่เป็น 100% Methanol (650 mL) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 3 fractions (M1AN1-M1AN3) ดังรูปที่ 204



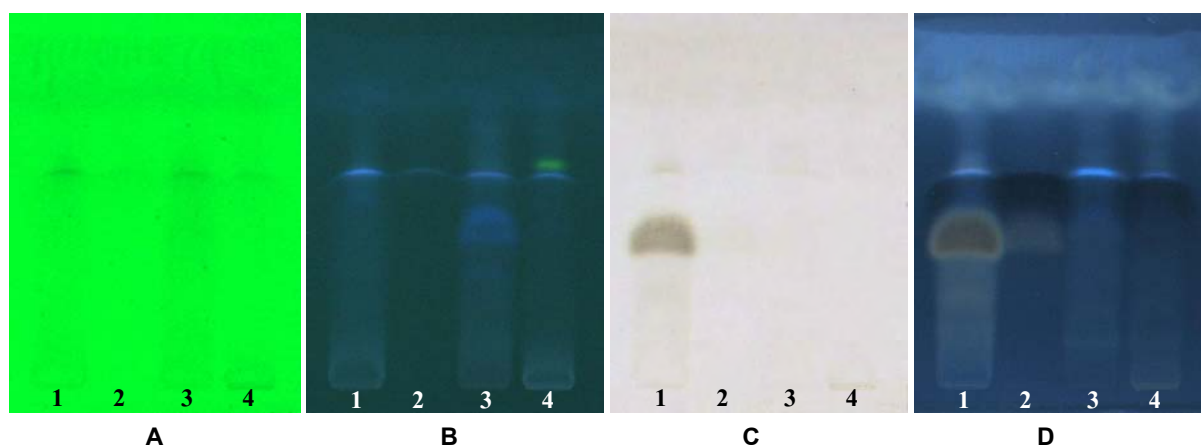
รูปที่ 204. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH1-AI6 ด้วย column chromatography



น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M1AN1-M1AN3 แสดงในตารางที่ 110 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 3 fractions แสดงดังรูปที่ 205

ตารางที่ 110. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M1AN1-M1AN3

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M1AN1	100% MeOH 178 mL	0.2218	ของแข็งสีน้ำตาล
M1AN1c		0.0092	คราบสีน้ำตาล
M1AN2	100% MeOH 38 mL	0.0350	ของแข็งสีน้ำตาล
M1AN3	100% MeOH 434 mL	0.0746	ฟองเหนียวสีน้ำตาล



รูปที่ 205. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M1AN1-M1AN3

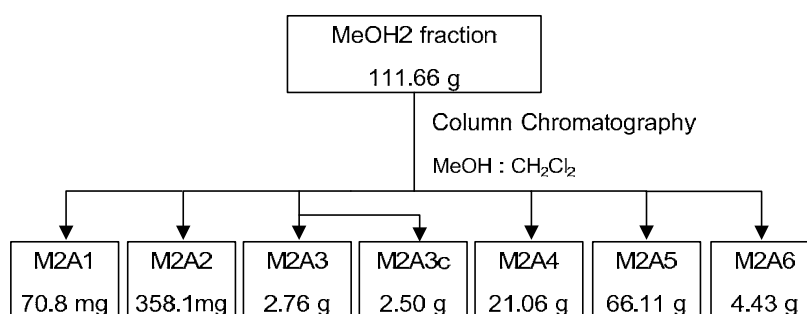
Solvent system : Butanol : Propanol : Acetic acid : H<sub>2</sub>O [3:1:1:1]

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.3 การแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลครั้งที่ 2

#### 5.3.3.1 การแยกสารสกัดเมทานอล (MeOH2)

แยกส่วนของสารสกัดเมทานอลน้ำหนัก 111.66 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 60 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 4 L, 100% MeOH (2 L) และ 50% H<sub>2</sub>O : MeOH (1 L) หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M2A1-M2A6) ดังรูปที่ 206



รูปที่ 206. การแยกสาร MeOH2 extract ด้วย column chromatography

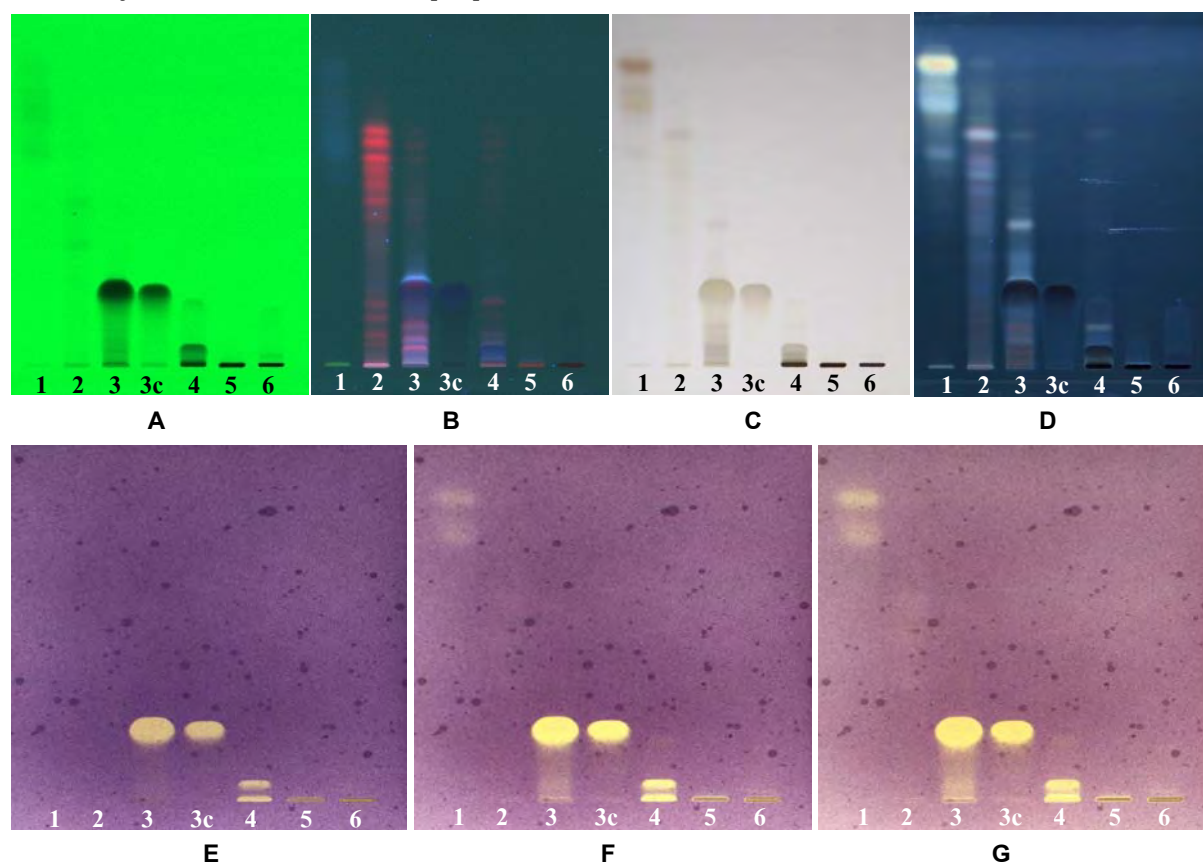
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M2A1-M2A6 แสดงในตารางที่ 111 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงดังรูป 207

ผลึกที่ได้จากส่วนของสารสกัด M2A3 (M2A3c) น้ำหนัก 2.5018 กรัม มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็นสารชนิดเดียวกับ M1E4 จึงเป็น compound 9

ตารางที่ 111. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2A1-M2A6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M2A1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2.5 L	0.0708	ของแข็งสีเหลือง
M2A2	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L	0.3581	ของแข็งสีเขียวปนดำ
M2A3	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 3.5 L – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.0 L	2.7686	ของแข็งสีเขียวปนขาว
M2A3c		2.5018	ของแข็งสีขาว
M2A4	10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 3.0 L – 30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 4.0 L	21.06	ของแข็งสีน้ำตาล
M2A5	50% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 4.0 L – 100% MeOH	66.11	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M2A6	50% H <sub>2</sub> O : MeOH	4.4307	ของแข็งสีน้ำตาล

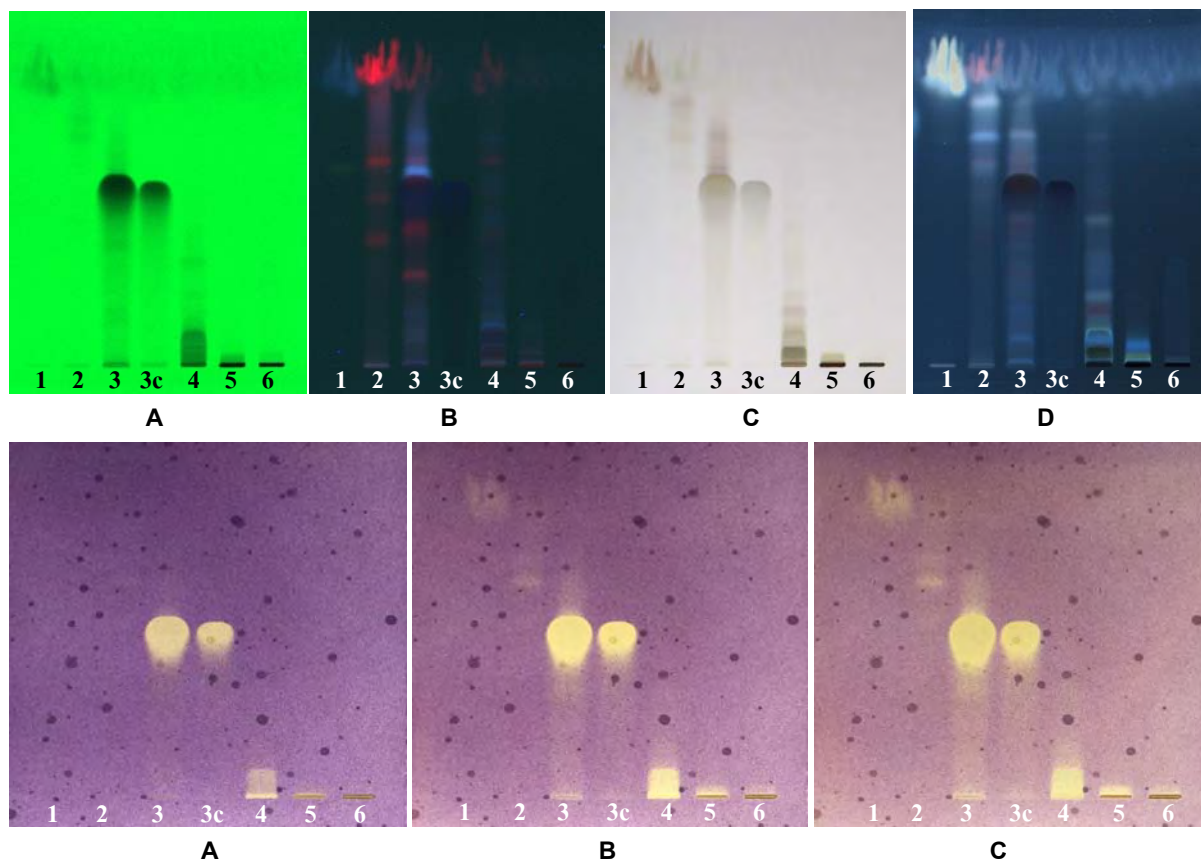
Solvent system : Acetone : Hexane [2:3]



รูปที่ 207. TLC chromatograms และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M2A1-M2A6

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm,  
E = DPPH 0 hr., F = DPPH 8 hr., G = DPPH 24 hr.

Solvent system : MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [1:6]

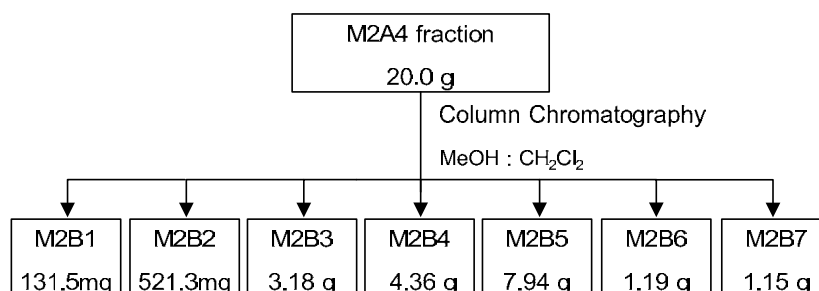


รูปที่ 207. (ต่อ) TLC chromatograms และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M2A1-M2A6

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm,  
E = DPPH 0 hr., F = DPPH 8 hr., G = DPPH 24 hr.

### 5.3.3.2 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH2-A4

แยกส่วนของสารสกัด M2AA4 น้ำหนัก 20.00 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel (Grade 7734, 70-230 mesh, 200 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2000 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3000 mL), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3000 mL), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3000 mL), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2000 mL), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1000 mL), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4000 mL) และ 100% MeOH (1000 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัด (fraction) ที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 7 fractions (M2B1-M2B7) ดังรูปที่ 208

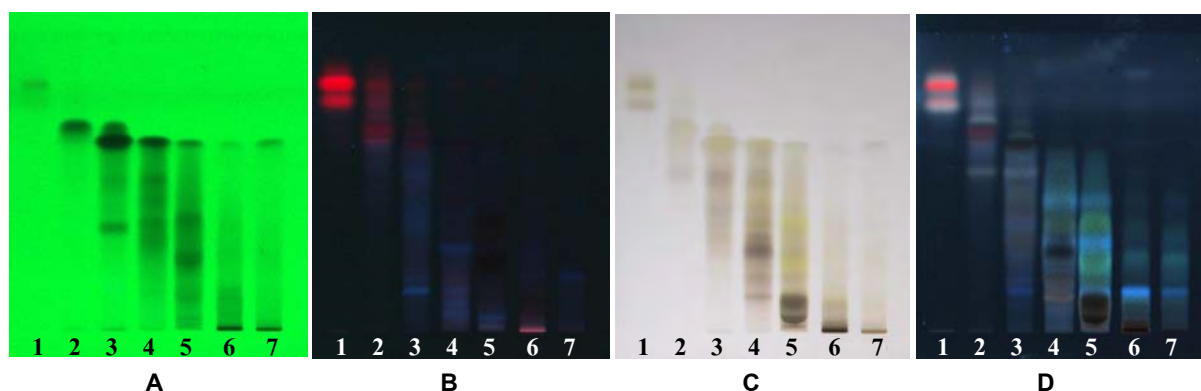


รูปที่ 208. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-A4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M2B1-M2B7 แสดงในตารางที่ 112 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 7 fractions แสดงดังรูปที่ 209

ตารางที่ 112. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2B1-M2B7

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M2B1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2.0 L – 1% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L	0.1315	ของแข็งสีเขียวปนดำ
M2B2	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.8 L	0.5213	ของแข็งสีเขียวปนดำ
M2B3	3% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.2 L – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.8 L	3.1832	สารหนืดสีเขียว
M2B4	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.7 L	4.3569	สารหนืดสีน้ำตาล
M2B5	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.5 L – 15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2.2 L	7.94	สารหนืดสีน้ำตาล
M2B6	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.8 L – 20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.8 L	1.1909	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
M2B7	20% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.2 L – 100% MeOH	1.1562	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม



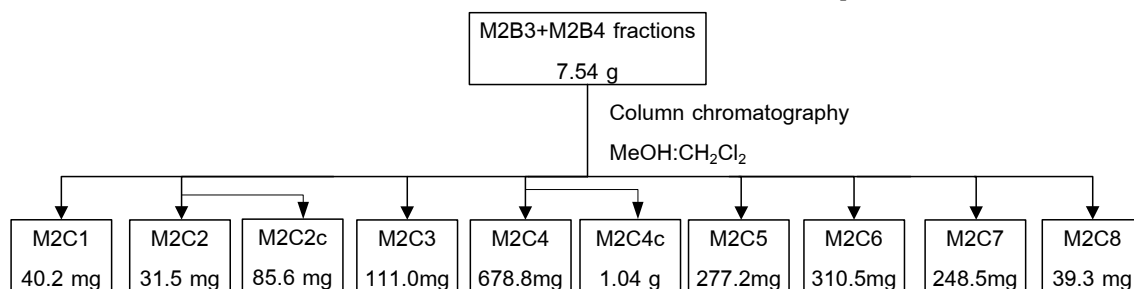
รูปที่ 209. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M2B1-M2B7

Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5 : 8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.3.3 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH2-B3 และ B4 (M2B3+M2B4)

แยกส่วนของสารสกัด M2B3 น้ำหนัก 3.18 กรัม และ M2B4 น้ำหนัก 4.36 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น silica gel gel (pore size 60 Å, 40-63 µm (230-400 mesh), 300 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 1% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 L), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 L), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 L), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> อย่างละ 500 mL, 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> และ 100% MeOH อย่างละ 1 L หลังจากกรวบรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 8 fractions (M2C1-M2C8) ดังรูปที่ 210



รูปที่ 210. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-B3 และ B4 ด้วย column chromatography

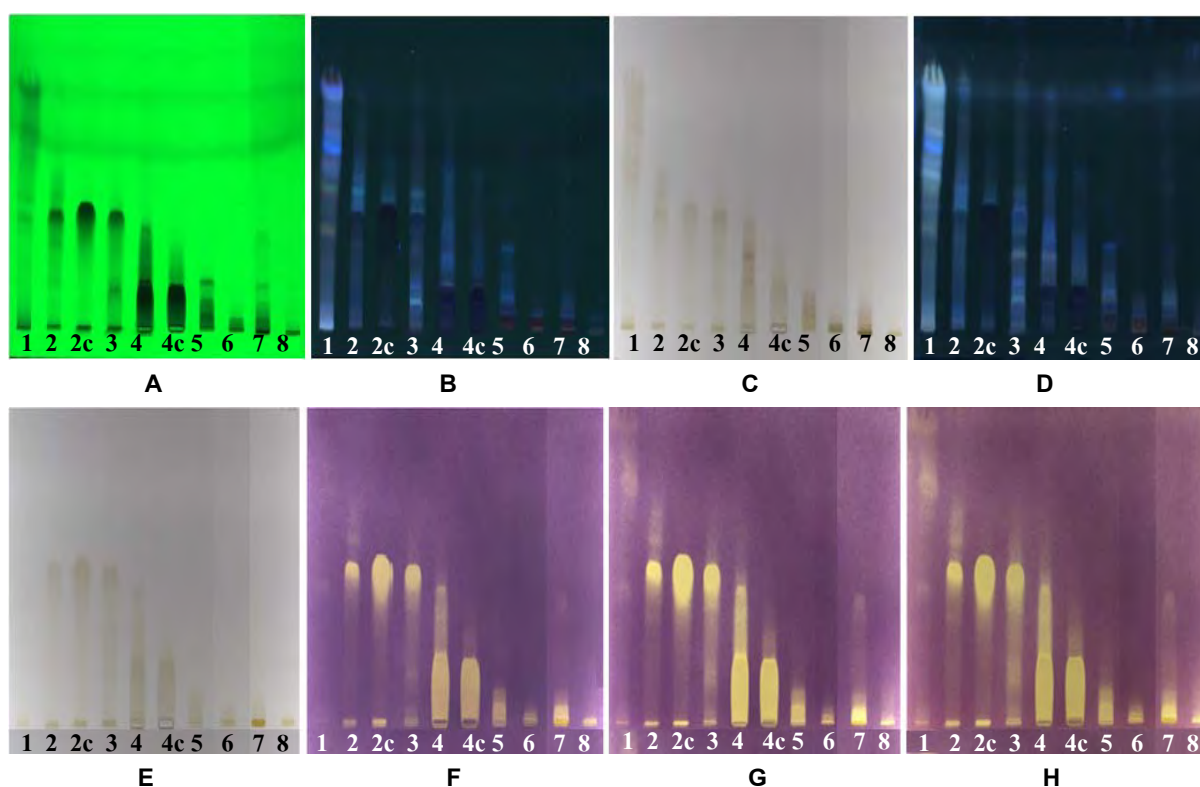
น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M2C1-M2C8 แสดงในตารางที่ 113 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 8 fractions และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงดังรูปที่ 211

ผลิตภัณฑ์ได้จากส่วนของสารสกัด M2C2 (M2C2c) น้ำหนัก 0.0856 กรัม มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็นสารชนิดเดียวกับ M1E4 จึงเป็น compound 9

ผลิตภัณฑ์ได้จากส่วนของสารสกัด M2C4 (M2C4c) น้ำหนัก 1.0417 กรัม มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็นสารชนิดเดียวกับ M1N3 จึงเป็น compound 6

ตารางที่ 113. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2C1-M2C8

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M2C1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L – 5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L	0.0402	สารหนืดสีน้ำตาล
M2C2	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.8 L	0.0315	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2C2c		0.0856	ตะกอนสีขาว
M2C3	5% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.3 L – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.3 L	0.1110	สารหนืดสีดำ
M2C4	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.65 L – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L	0.6788	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2C4c		1.0417	ผลึกสีขาวขุ่น
M2C5	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L – 25% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.5 L	0.2772	ฟองหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2C6	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L	1.1909	สารหนืดสีน้ำตาล
M2C7	40% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L – 70% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L	0.2485	ของแข็งสีน้ำตาลดำ
M2C8	100% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0.1 L	0.0393	ของแข็งสีน้ำตาลดำ



รูปที่ 211. TLC chromatograms และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนของสารสกัด M2C1-M2C8

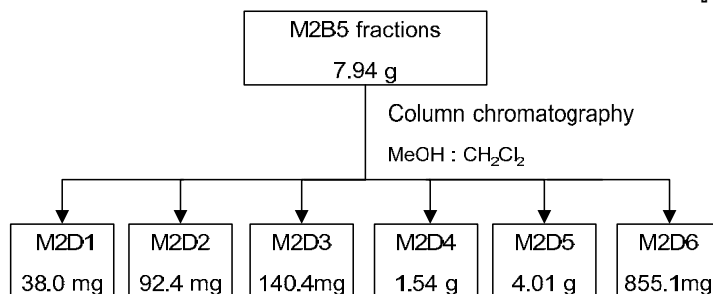
Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5 : 8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm,  
E = white light, F = DPPH 0 hr., G = DPPH 8 hr., H = DPPH 24 hr.



### 5.3.3.4 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH2-B5

แยกส่วนของสารสกัด M2B5 น้ำหนัก 7.94 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ตามลำดับดังนี้ 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 L), 3% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 L), 5% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 L), 7% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.5 L), 10% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 L), 15% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 L), 20% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 L), 30% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 L), 50% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 L), 70% MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 L) และ 100% MeOH (2.0 L) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M2D1-M2D7) ดังรูปที่ 212

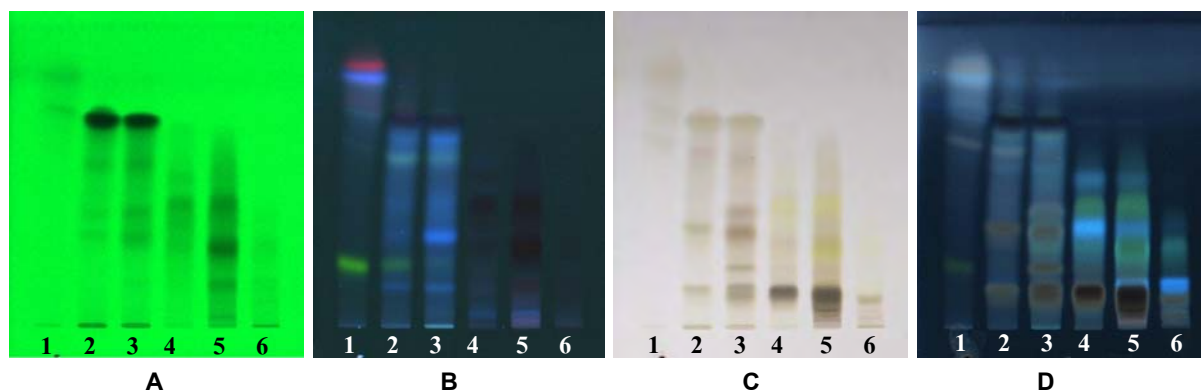


รูปที่ 212. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-B5 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M2D1-M2D7 แสดงในตารางที่ 114 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 213

ตารางที่ 114. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2D1-M2D7

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M2D1	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 500 mL – 7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 800 mL	0.0380	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
M2D2	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.8 L	0.0924	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
M2D3	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1.6 L	0.1404	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
M2D4	7% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 300 mL – 10% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2.5 L	1.5420	สารเหนียวสีน้ำตาล
M2D5	15% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1 L – 30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 400 mL	4.0143	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
M2D6	30% MeOH : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 mL – 100% MeOH	0.8551	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม



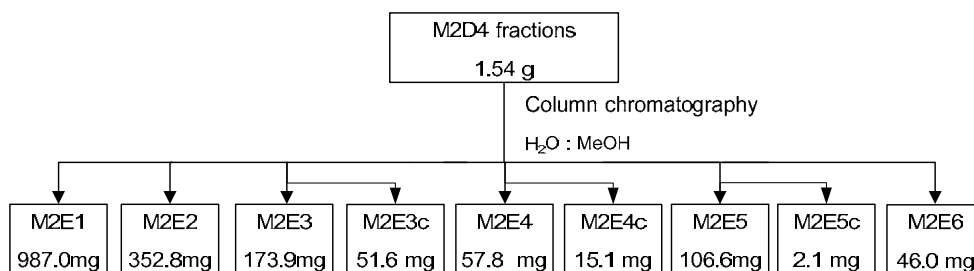
รูปที่ 213. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M2D1-M2D7

Solvent system: MeOH : EtOAc [1.5 : 8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

### 5.3.3.5 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH2-D4

แยกส่วนของสารสกัด M2D4 น้ำหนัก 1.5420 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น C-18 (45 g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 50% Methanol : H<sub>2</sub>O (400 mL) และ 100% MeOH (100 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC ได้ส่วนของสารสกัด 6 fractions (M2E1-M2E6) ดังรูปที่ 214



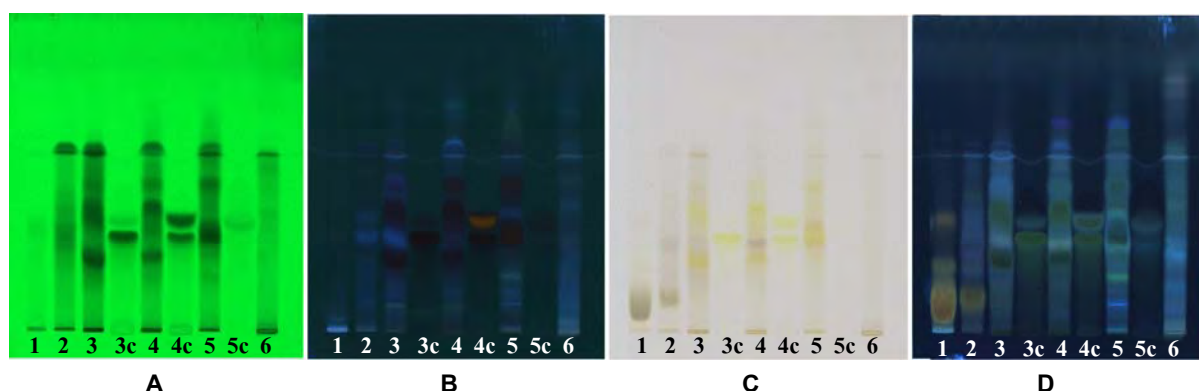
รูปที่ 214. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-D4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M2E1-M2E6 แสดงในตารางที่ 115 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 6 fractions แสดงดังรูปที่ 215

ตะกอนที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด M2E3 (M2E3c) มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง น้ำหนัก 51.6 มิลลิกรัม ให้เป็น compound 11

ตารางที่ 115. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2E1-M2E6

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M2E1	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 136 mL	0.9870	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2E2	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 24 mL	0.3528	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2E3	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 24 mL	0.1739	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2E3c		0.0516	ผงสีเหลือง
M2E4	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 24 mL	0.0578	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2E4c		0.0151	ผงสีเหลือง
M2E5	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 45 mL	0.1066	สารหนืดสีน้ำตาลอ่อน
M2E5c		0.0021	คราบสีเหลือง
M2E6	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 47 mL – 100% MeOH	0.0460	สารหนืดสีน้ำตาลอ่อน



รูปที่ 215. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M2E1-M2E6

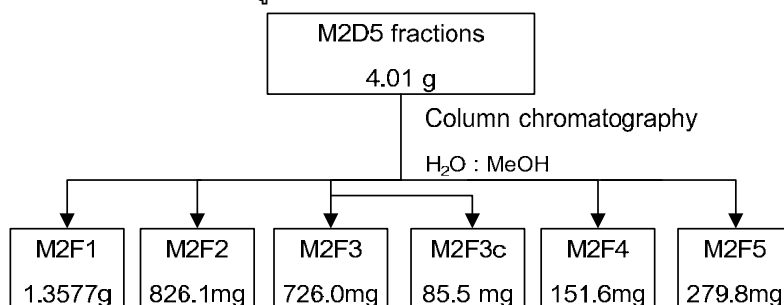
Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5 : 8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm



### 5.3.3.6 การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนของสารสกัด MeOH2-D5

แยกส่วนของสารสกัด M2D5 น้ำหนัก 4.0143 กรัม ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น C-18 (45g) และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 50% Methanol : H<sub>2</sub>O (200 mL), 70% Methanol : H<sub>2</sub>O (100 mL) และ 100% MeOH (200 mL) หลังจากรวมส่วนของสารสกัดที่ได้โดยอาศัยความแตกต่างด้วยวิธี TLC พบว่าได้ส่วนของสารสกัด 5 fractions (M2F1-M2F5) ดังรูปที่ 216



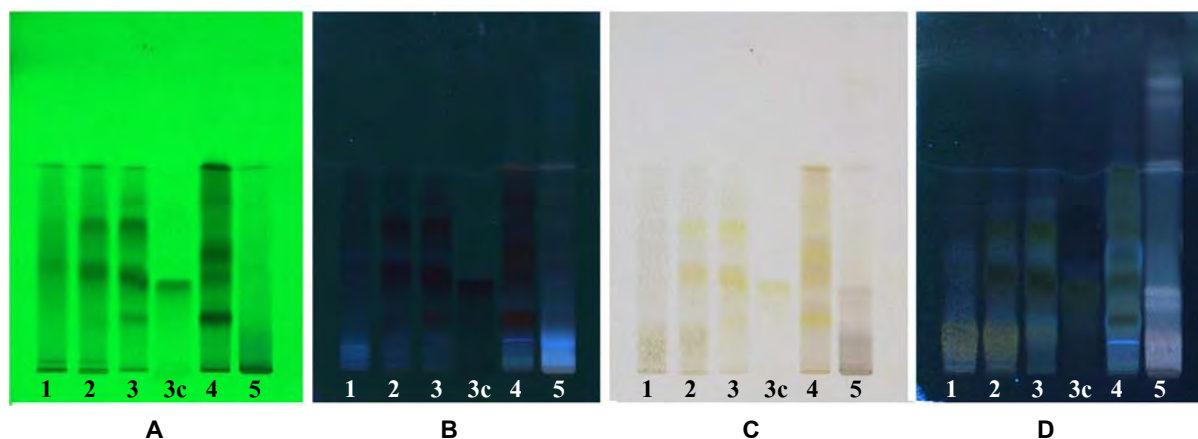
รูปที่ 216. การแยกสารของส่วนของสารสกัด MeOH2-D4 ด้วย column chromatography

น้ำหนักหลังจากทำให้แห้ง ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยกของแต่ละส่วนของสารสกัด M2F1-M2F5 แสดงในตารางที่ 116 และลักษณะการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบบน TLC ของทั้ง 5 fractions แสดงดังรูปที่ 217

ตะกอนที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด M2F3 (M2F3c) มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง น้ำหนัก 85.5 มิลลิกรัม ให้เป็น compound 12

ตารางที่ 116. ปริมาณ ลักษณะภายนอก และลำดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้แยก fraction M2F1-M2F5

Fraction	วัฏภาคเคลื่อนที่	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
M2F1	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 100 mL	1.3577	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2F2	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 10 mL	0.8261	สารหนืดสีน้ำตาลเข้ม
M2F3	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 40 mL	0.7260	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
M2F3c		0.0855	ผงสีเหลือง
M2F4	50% MeOH : H <sub>2</sub> O 50 mL	0.1516	ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล
M2F5	70% MeOH : H <sub>2</sub> O 100 mL – 100% MeOH 200 mL	0.2798	ของแข็งสีน้ำตาล

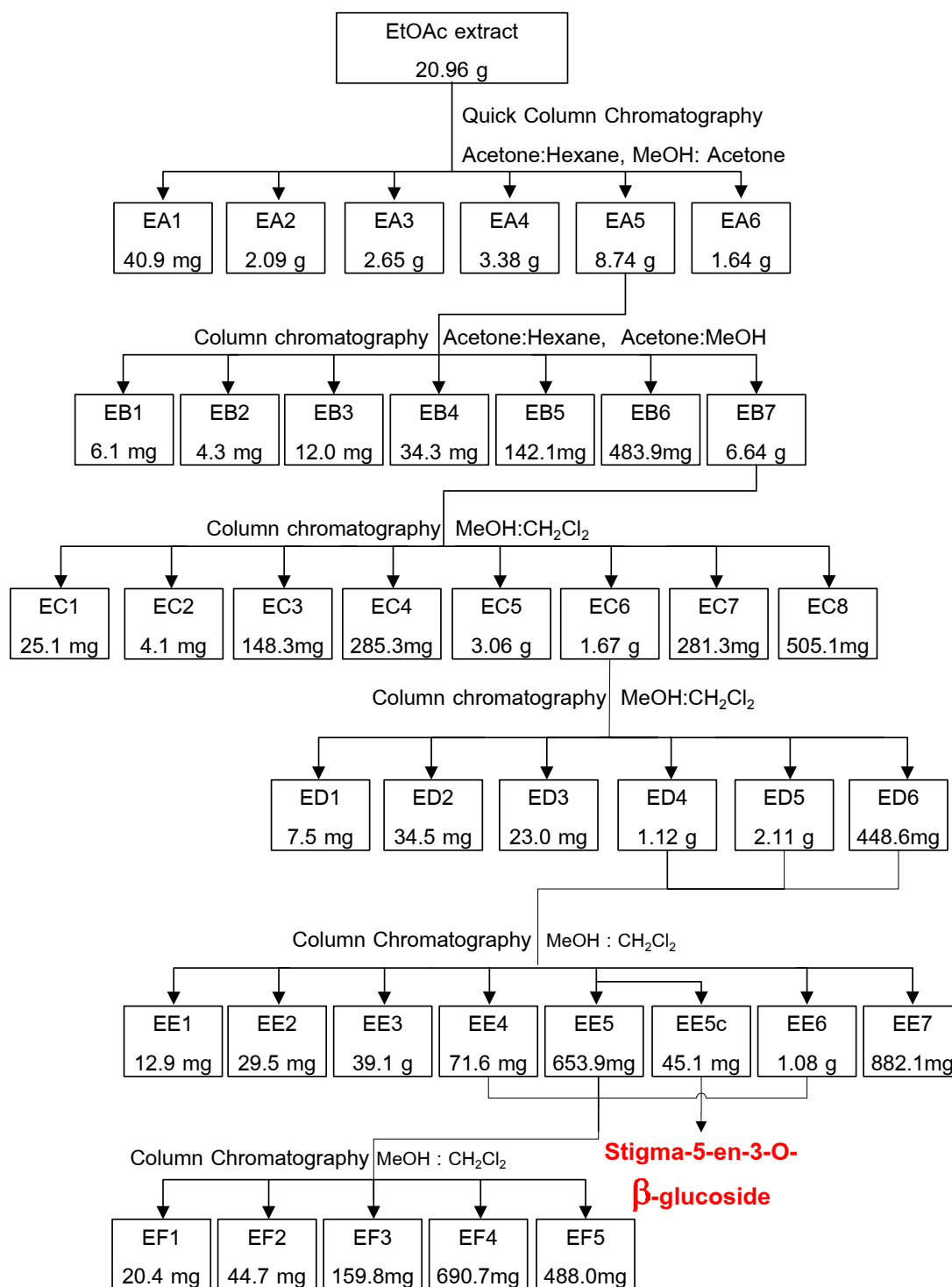


รูปที่ 217. TLC chromatograms ของส่วนของสารสกัด M2F1-M2F5

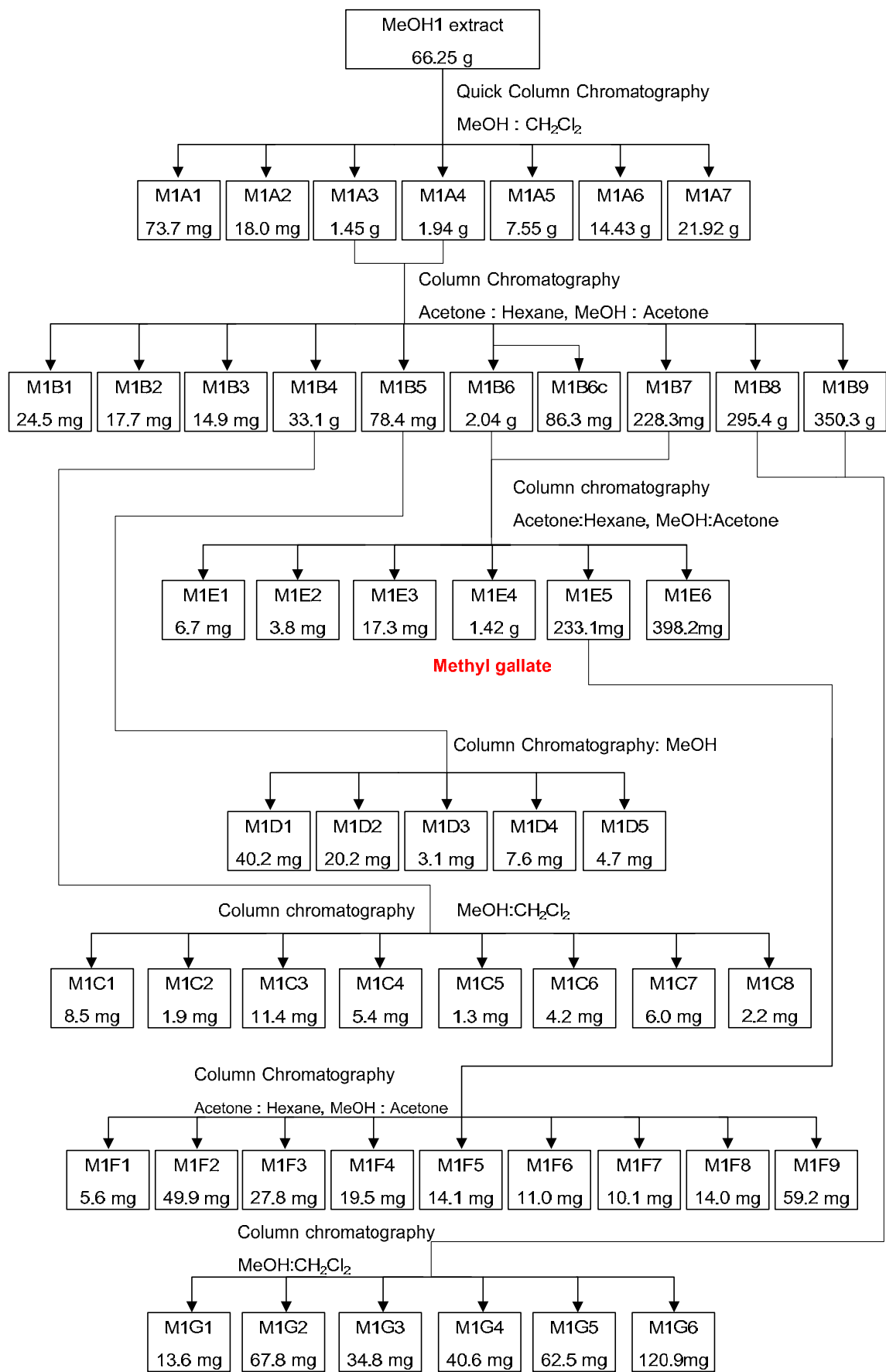
Solvent system : MeOH : EtOAc [1.5 : 8.5] + 1% Formic acid

Detector : A = UV 254 nm, B = UV 366 nm, C = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, D = 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ UV 366 nm

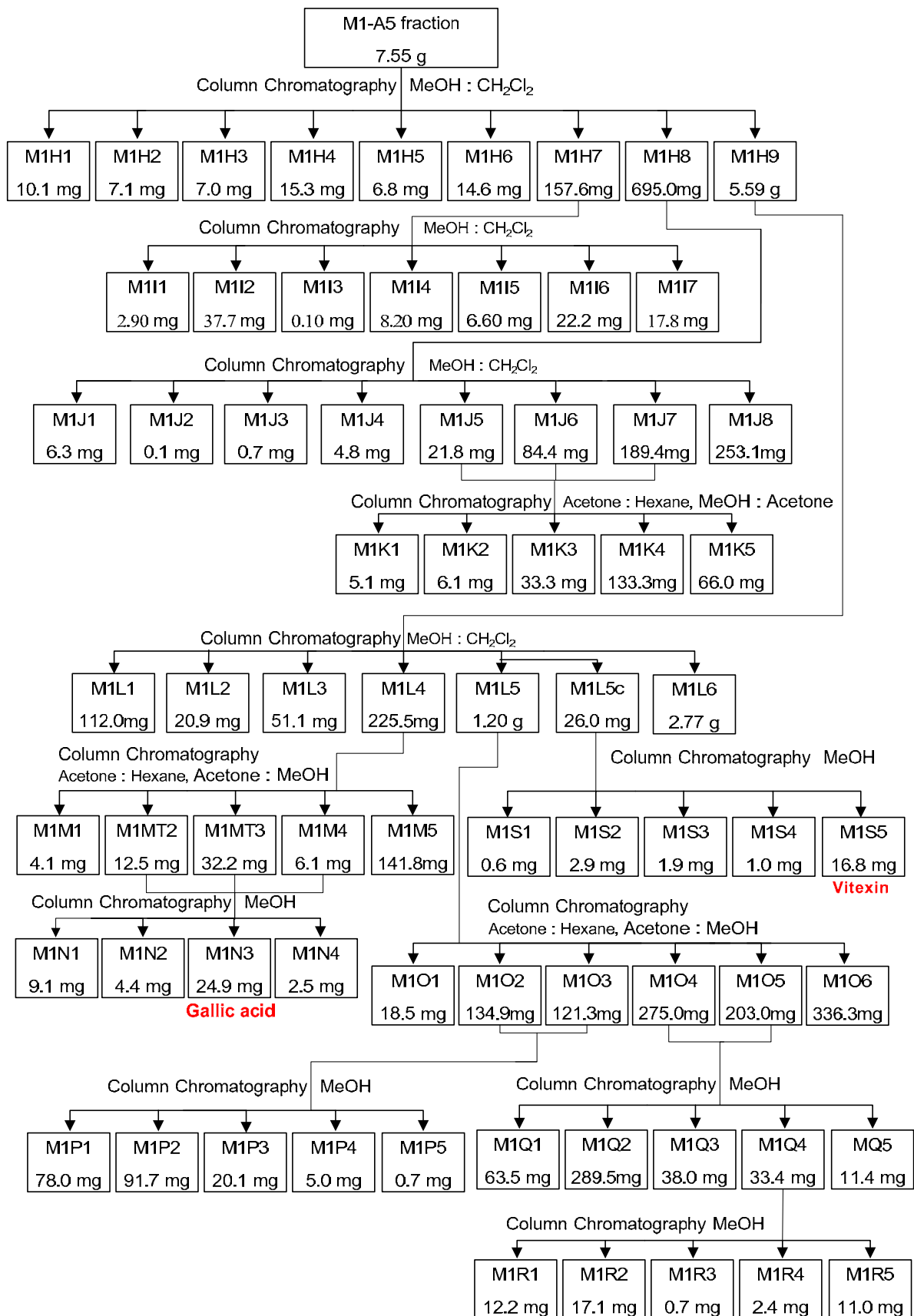
ดังนั้นการสกัดแยกสารจากใบสมเส็ดได้สารบริสุทธิ์ 6 ชนิด ดังแสดงแผนผังการแยกที่ 218-220 โดยสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต สามารถแยกได้สารในกลุ่ม terpenoid 1 ชนิด คือ stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (5) และสารสกัดชั้นเมทานอลสามารถแยกได้สารในกลุ่ม polyphenol อีก 5 ชนิด คือ methyl gallate (9), gallic acid (6), apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) (10), luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) (11) และ luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin) (12)



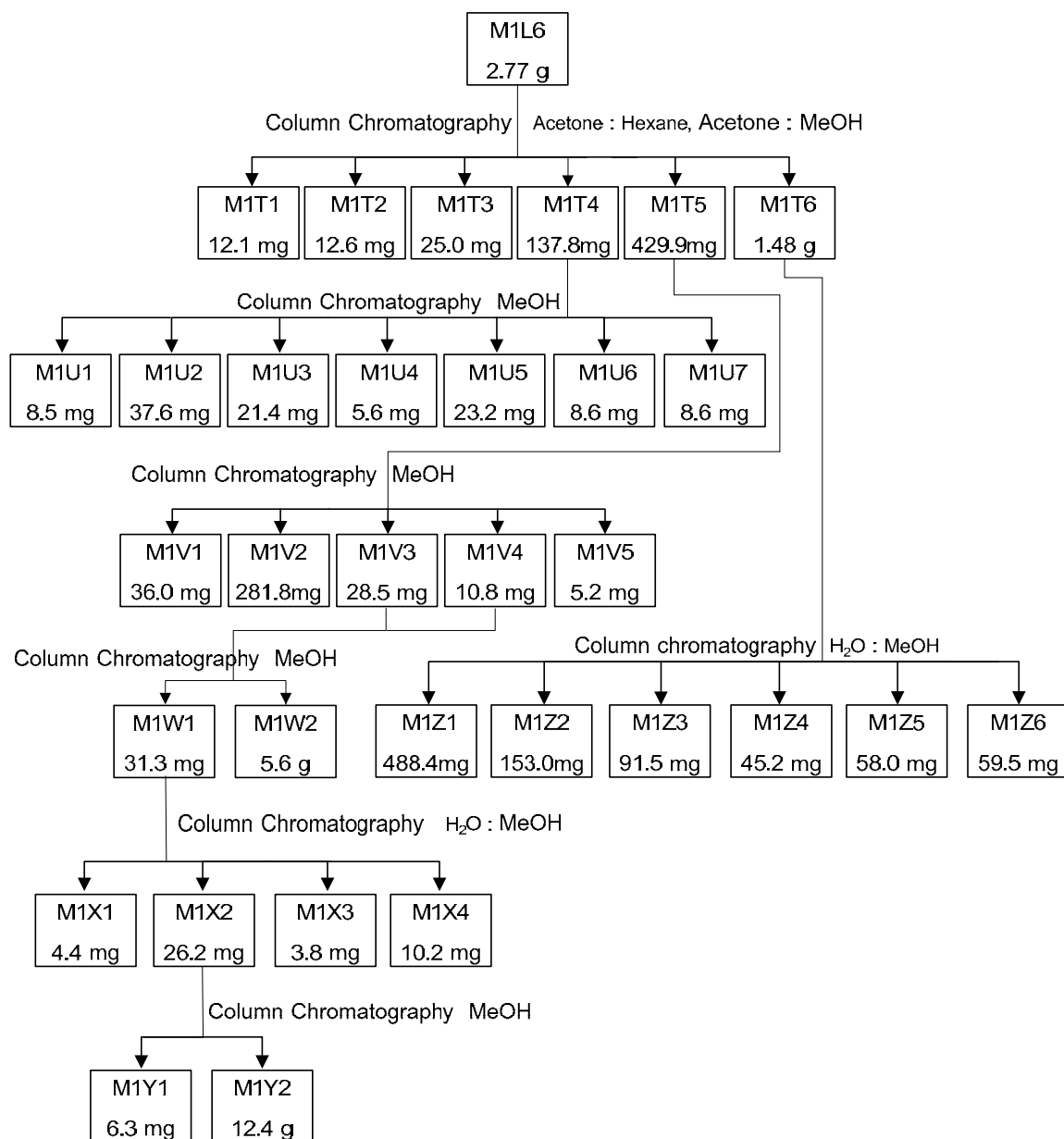
รูปที่ 218. แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตของใบสมเส็ด



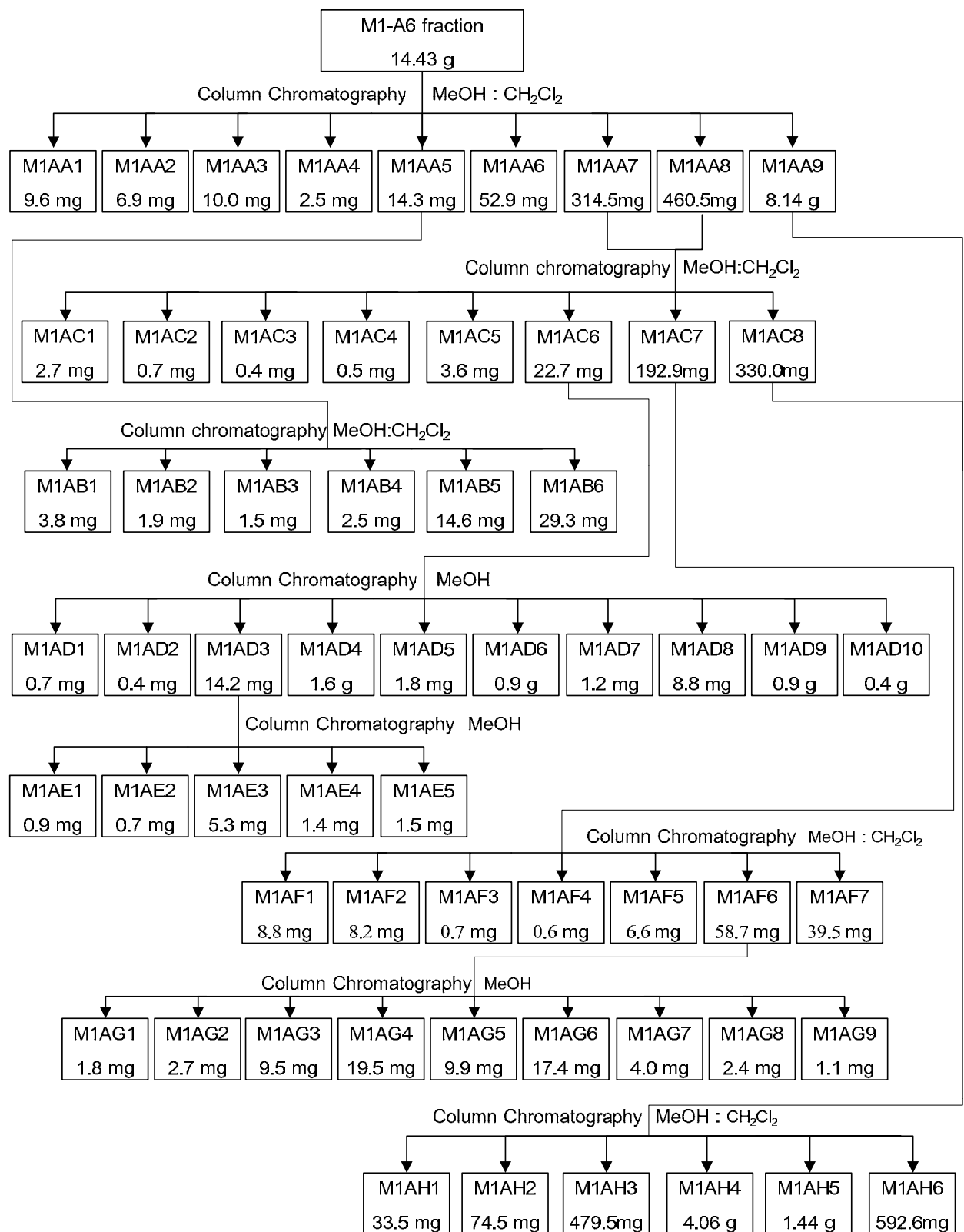
รูปที่ 219. แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลครั้งที่ 1 ของใบสมเ็็ด



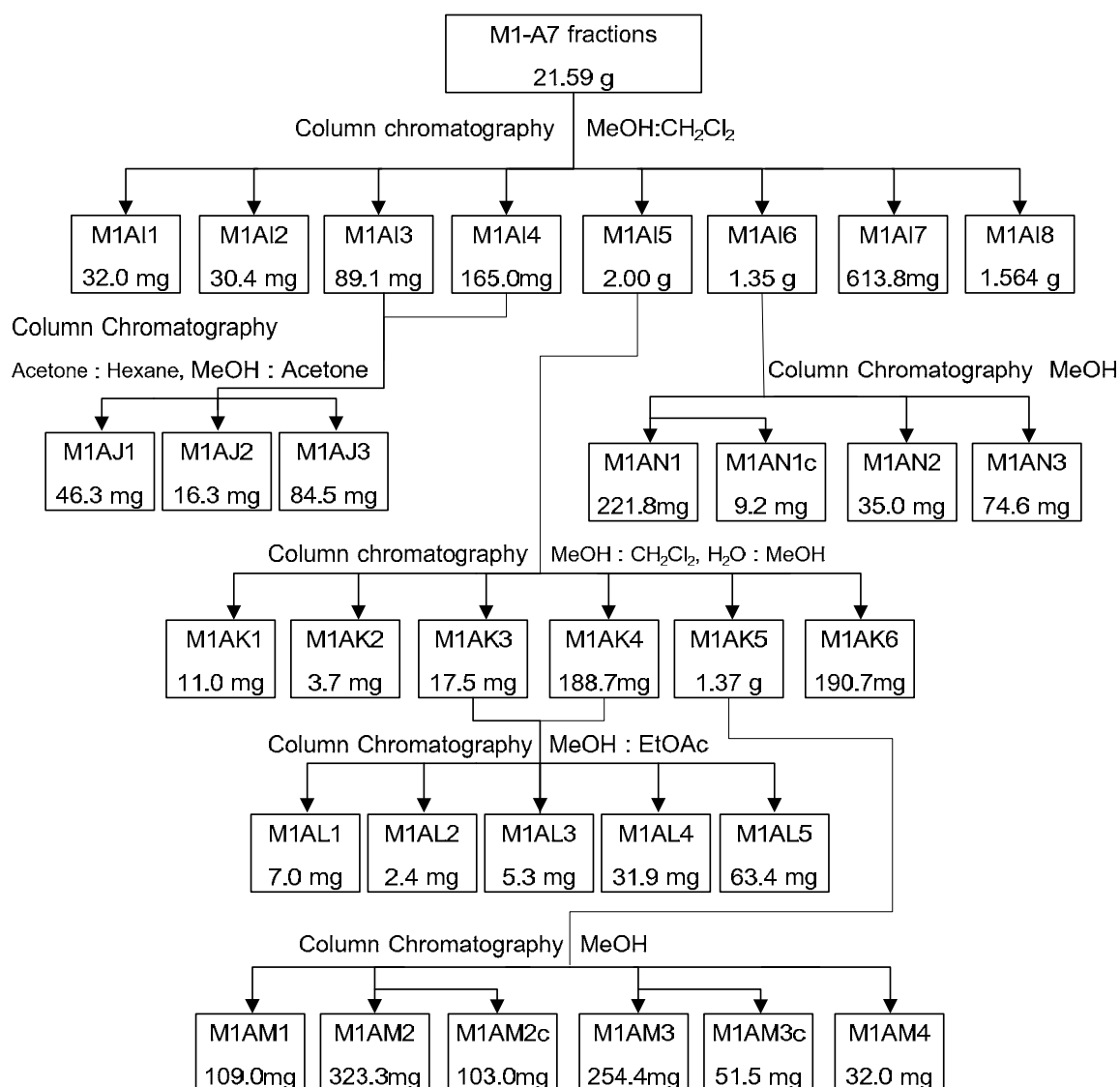
รูปที่ 219. (ต่อ) แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลครั้งที่ 1 ของใบสมเล็ด



รูปที่ 219. (ต่อ) แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลครั้งที่ 1 ของใบสมเ็็ด

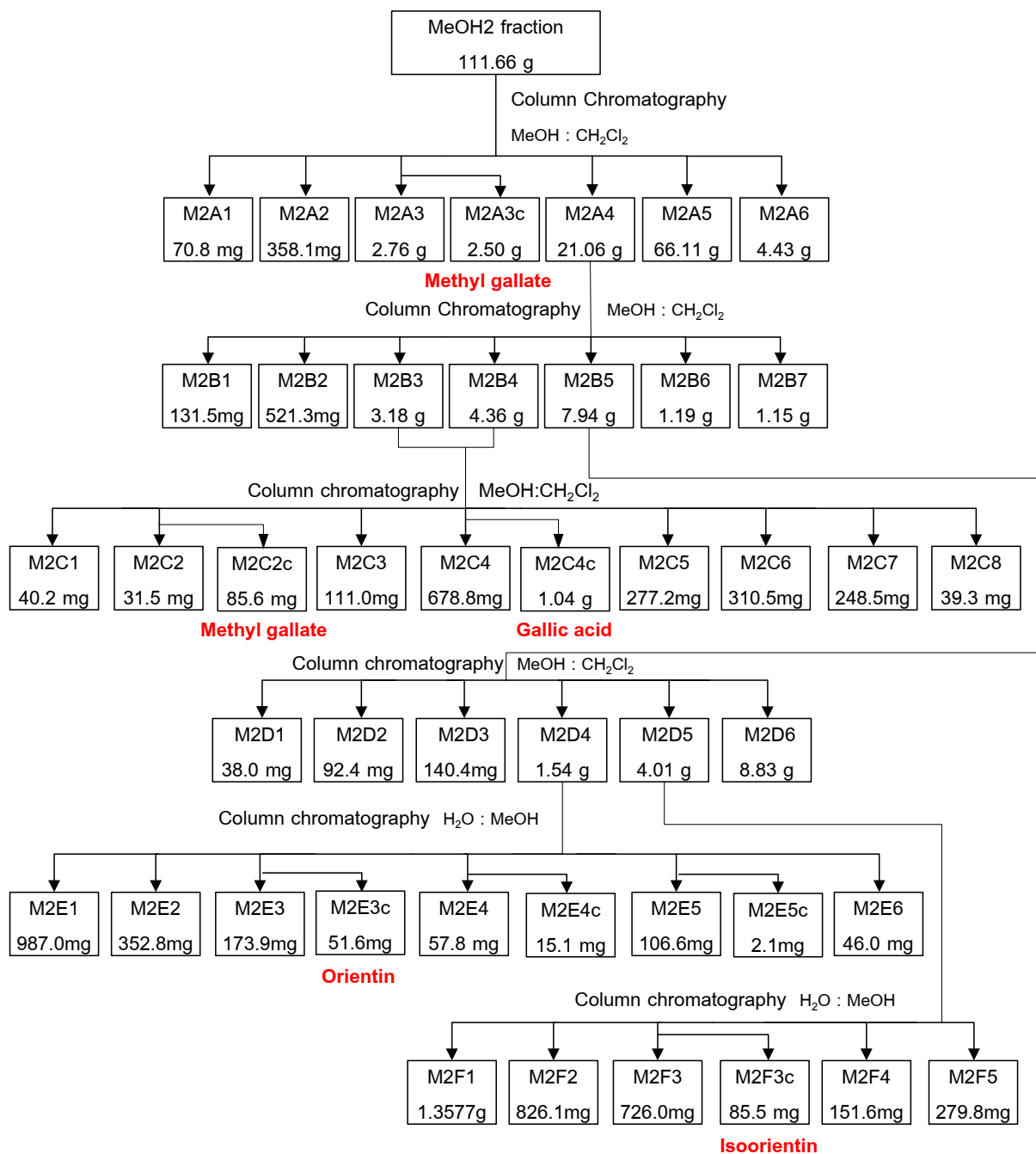


รูปที่ 219. (ต่อ) แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลครั้งที่ 1 ของใบสมเล็ด



รูปที่ 219. (ต่อ) แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลครั้งที่ 1 ของใบสมเ็ด



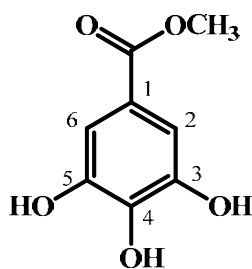


รูปที่ 220. แผนผังรวมของการแยกสารจากสารสกัดหยาบเมทานอลครั้งที่ 2 ของใบสมเ็็ด

## 5.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

**5.4.3** ของแข็งสีขาวที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด EtOAc-E5c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside เช่นเดียวกับ EtOAc-N9c (compound 5) ที่แยกได้จากยอดเสม็ดชุน ดังรูปที่ 106 โดยเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (ใน pyridine- $d_5$ ) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Faizi, 2007) ดังตารางที่ 59

**5.4.4** ผงสีขาวที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด MeOH1-E4, MeOH2-A3c และ MeOH2-C2c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น methyl gallate ดังรูป ที่ 221 โดยเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (ใน DMSO- $d_6$ ) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Said, 2009) ดังตารางที่ 117



รูปที่ 221. โครงสร้าง methyl gallate

Physical characteristics: white needles from MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , m.p. 200-203  $^{\circ}\text{C}$

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 274.80(4.19), 227.80(4.28)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3410, 3297, 1678, 1613, 1550, 1465, 1338, 1310, 1263, 1206, 1036, 1003.

EIMS m/z (% relative intensity): 184 [M] $^{+}$ (63), 153 (100), 125 (23)

HR-ESI-MS: m/z found: 207.0277 [M+Na] $^{+}$  calcd. For  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5\text{Na}$  m/z 207.0269

ตารางที่ 117.  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  spectroscopic data of compound 9 และ methyl gallate (Said, 2009)

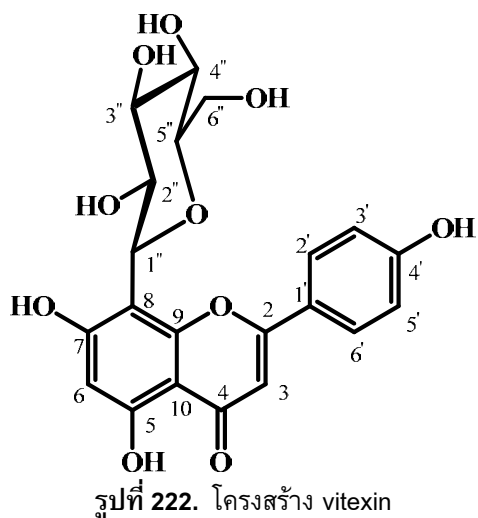
Positions	MeOH1-E4C $^{*}$		Methyl gallate $^{**}$	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J (Hz))	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., J (Hz))
1	119.4		119.8	-
2, 6	108.5	6.93 (2H, s)	109.0	6.94 (2H, s)
3, 5	145.6		146.0	-
4	138.4		138.9	-
1-CO	166.4		166.8	-
-OCH $_3$	51.6	3.73 (3H, s)	52.0	3.73 (3H, s)
3-, 5-OH	-	9.29 (2H, brs)	-	-
4-OH	-	8.97 (1H, brs)	-	-

$^{*}$  Both  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz) and  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) were recorded in DMSO- $d_6$ .

$^{**}$  Both  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz) and  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz) were recorded in DMSO- $d_6$ .

**5.4.5** ผงสีขาวที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด MeOH1-N3c และ MeOH2-C4c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น gallic acid เช่นเดียวกับ MeOH-S3c (compound 6) ที่แยกได้จากยอดเสม็ดชุน ดังรูปที่ 107 โดยเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (ใน DMSO- $d_6$ ) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Said, 2009) ดังตารางที่ 60

**5.4.6** ผงสีเหลืองที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด MeOH1-S5 สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) ดังรูปที่ 222 โดยเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  (ใน DMSO- $d_6$ ) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Rayyan, 2005) ดังตารางที่ 118



Physical characteristics: yellow powder from MeOH

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 333.5 (3.10), 270.0 (3.12), 214.5 (3.38)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3373, 3214, 2910, 2871, 1650, 1614, 1567, 1506, 1421, 1385, 1361, 1297, 1266, 1251, 1223, 1178, 1107, 1091, 1057, 1039, 1014, 986, 970

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ : -11.5° (c 0.5, pyridine) [(Harborne, 1975)  $[\alpha]_{\text{D}}$ : -14.0° (pyridine)]

EIMS m/z (% relative intensity): 324 (18), 312 (17), 294 (17), 283 (100), 270 (15), 165 (23)

HR-ESI-MS: m/z found: 455.0848  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. For  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}\text{Na}$  m/z 455.0954

ตารางที่ 118.  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  spectroscopic data of compound **10** และ vitexin (Rayyan, 2005)

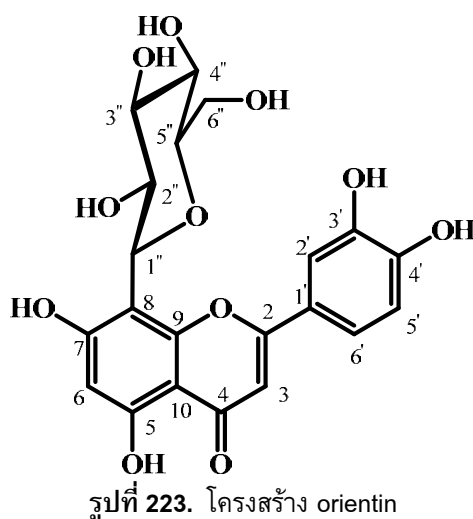
Positions	MeOH1-S5 <sup>*</sup>		Vitexin <sup>**</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))
2	164.05	-	164.02	-
3	102.51	6.77 (1H, s)	102.52	6.77 (1H, s)
4	182.16	-	182.18	-
5	160.46	-	160.46	-
6	98.21	6.27 (1H, s)	98.20	6.26 (1H, s)
7	162.63	-	162.63	-
8	104.66	-	104.68	-
9	156.07	-	156.06	-
10	104.11	-	104.12	-
1'	121.68	-	121.68	-
2', 6'	129.02	8.01 (2H, d, $J$ = 8.8 Hz)	129.05	8.01 (2H, d, $J$ = 8.6 Hz)
3', 5'	115.91	6.88 (2H, d, $J$ = 8.8 Hz)	115.87	6.88 (2H, d, $J$ = 8.6 Hz)
4'	161.19	-	161.22	-
1''	73.44	4.67 (1H, d, $J$ = 9.9 Hz)	73.45	4.67 (1H, d, $J$ = 9.8 Hz)
2''	70.93	3.82 (1H, d, $J$ = 9.3 Hz)	70.89	3.82 (1H, t, $J$ = 9.6 Hz)
3''	78.72	3.25 (1H, m)	78.70	3.24 (1H, m)
4''	70.64	3.36 (1H, m)	70.25	3.37 (1H, t, $J$ = 9.4 Hz)

Positions	MeOH1-S5 <sup>*</sup>		Vitexin <sup>**</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))
5''	81.86	3.23 (1H, m)	81.74	3.21 (1H, m)
6''	61.38	3.82 (1H, dd, <i>J</i> = 3.8, 11.0 Hz)	61.27	3.75 (1H, dd, <i>J</i> = 1.4, 11.6 Hz)
		3.53 (1H, m)		3.51 (1H, dd, <i>J</i> = 6.7, 11.6 Hz)
5-OH		13.16 (1H, s)		

<sup>\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

<sup>\*\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

5.4.5 ฟังก์ชันที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด MeOH2-ME3c สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น Luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) ดังรูปที่ 223 โดยเปรียบเทียบข้อมูล <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR (ใน DMSO-*d*<sub>6</sub>) กับ ข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Zhou, 2005) ดังตารางที่ 119



Physical characteristics: yellow powder from MeOH

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 348.5 (3.28), 294.0 (2.99), 269.0 (3.24), 256.50 (3.24), 210.0 (3.58)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3515, 3380, 2896, 1653, 1609, 1578, 1551, 1513, 1425, 1370, 1323, 1290, 1249, 1117, 1105, 1045, 1006

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ : - 50.6 (c 0.1, methanol)

EIMS *m/z* (% relative intensity): 450  $[\text{M}+2\text{H}]^+$  (2.69), 394 (11), 299 (100), 283 (19), 270 (18), 165 (21)

HR-ESI-MS: *m/z* found: 471.0867  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. For  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}\text{Na}$  *m/z* 471.0903

ตารางที่ 119. <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic data of compound 11 และ orientin (Zhou, 2005)

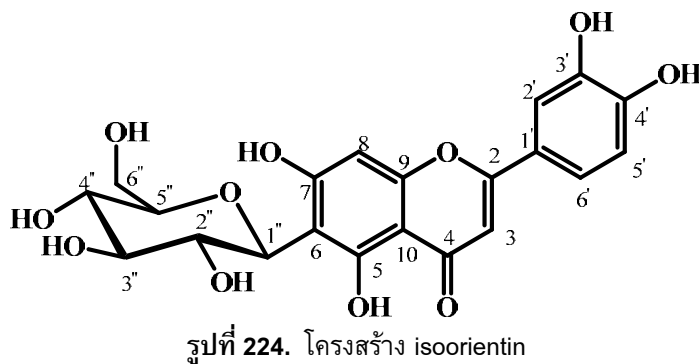
Positions	MeOH2-E3c <sup>*</sup>		orientin <sup>**</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> (Hz))
2	164.28	-	164.16	-
3	102.61	6.64 (1H, s)	102.41	6.65 (1H, s)
4	182.23	-	182.03	-
5	160.58	-	160.47	-
6	98.30	6.26 (1H,s)	98.31	6.25 (1H,s)
7	162.74	-	162.80	-

Positions	MeOH2-E3c <sup>*</sup>		orientin <sup>**</sup>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., $J$ (Hz))	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult., $J$ (Hz))
8	104.72	-	104.65	-
9	156.20	-	156.01	-
10	104.23	-	103.99	-
1'	122.22	-	121.97	-
2'	114.25	7.47 (1H, d, $J$ = 1.9 Hz)	114.07	7.44 (1H, d, $J$ = 2.1 Hz)
3'	145.97	-	145.95	-
4'	149.77	-	149.90	-
5'	115.84	6.86 (1H, d, $J$ = 8.3 Hz)	115.78	6.90 (1H, d, $J$ = 8.2 Hz)
6'	119.58	7.53 (1H, dd, $J$ = 1.9, 8.3 Hz)	119.45	7.50 (1H, dd, $J$ = 2.1, 8.0 Hz)
1''	73.58	4.67 (1H, d, $J$ = 9.9 Hz)	73.50	4.72 (1H, d, $J$ = 9.0 Hz)
2''	70.95	3.82 (1H, t, $J$ = 9.3 Hz)	70.90	D-glucose
3''	78.93	2.59 (1H, t, $J$ = 8.5 Hz)	78.88	
4''	70.87	2.69 (1H, t, $J$ = 8.9 Hz)	70.83	
5''	82.18	2.59 (1H, m)	82.04	
6''	61.81	3.78 (1H, d, $J$ = 11.6 Hz)	61.76	
		3.54 (1H, dd, $J$ = 6.2, 11.6 Hz)		
5-OH		13.17		13.15 (1H, s)

<sup>\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

<sup>\*\*</sup> Both <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz) and <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) were recorded in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

5.4.6 ผงสีเหลืองที่แยกได้จากส่วนของสารสกัด MeOH-MT3C สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้เป็น Luteolin 8-C-β-D-glucopyranoside (isoorientin) ดังรูปที่ 224 โดยเปรียบเทียบข้อมูล <sup>1</sup>H-NMR และ <sup>13</sup>C-NMR (ใน DMSO-*d*<sub>6</sub>) กับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Rayyan, 2005) ดังตารางที่ 120



Physical characteristics: yellow powder from MeOH

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 349.0 (2.91), 268.6 (2.93), 258.4 (2.92), 215.4 (3.55)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3337, 1652, 1625, 1580, 1493, 1451, 1360, 1305, 1190, 1173, 1159, 1083, 1072

$[\alpha]_D^{25}$ : +7.1 ° (c 1.0, pyridien) [(Harborne, 1975)  $[\alpha]_D$ : +31.0 ° (pyridien)]

EIMS  $m/z$  (% relative intensity): 450  $[M+2H]^+$  (2.58), 394 (19), 299 (100), 286 (31), 270 (26), 165 (33)

HR-ESI-MS:  $m/z$  found: 471.0892  $[M+Na]^+$  calcd. For C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>Na  $m/z$  471.0903

ตารางที่ 120.  $^1\text{H}$ -NMR และ  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopic data of compound **12** และ isoorientin (Rayyan, 2005)

Positions	MeOH-AR3C <sup>*</sup>		isoorientin <sup>**</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., $J$ (Hz))
2	163.98	-	163.71	-
3	103.10	6.66 (1H, s)	102.87	6.66 (1H, s)
4	182.19	-	181.93	-
5	160.98	-	160.76	-
6	109.15	-	108.95	-
7	163.62	-	163.35	-
8	93.84	6.47 (1H,s)	93.57	6.47 (1H,s)
9	156.54	-	156.26	-
10	103.69	-	103.46	-
1'	121.72	-	121.49	-
2'	113.56	7.38 (1H, d, $J$ = 2.2 Hz)	113.38	7.39 (1H, d, $J$ = 2.2 Hz)
3'	146.06	-	145.82	-
4'	150.04	-	149.78	-
5'	116.38	6.88 (1H, d, $J$ = 8.3 Hz)	116.12	6.88 (1H, d, $J$ = 8.4 Hz)
6'	119.30	7.40 (1H, dd, $J$ = 2.2, 8.3 Hz)	119.04	7.41 (1H, dd, $J$ = 2.2, 8.4 Hz)
1''	73.35	4.57 (1H, d, $J$ = 9.8 Hz)	73.12	4.57 (1H, d, $J$ = 9.7 Hz)
2''	70.50	4.03 (1H, t, $J$ = 9.1 Hz)	70.27	4.03 (1H, t, $J$ = 9.4 Hz)
3''	79.24	3.19 (1H, t, $J$ = 8.5 Hz)	79.02	3.19 (1H, t, $J$ = 8.6 Hz)
4''	70.91	3.11 (1H, t, $J$ = 9.1 Hz)	70.70	3.11 (1H, t, $J$ = 9.2 Hz)
5''	81.85	3.15 (1H, m)	81.65	3.15 (1H, m)
6''	61.80	3.67 (1H, d, $J$ = 11.4 Hz)	61.57	3.68 (1H, dd, $J$ = 1.8, 12.0 Hz)
		3.40 (1H, dd, $J$ = 5.6, 11.4 Hz)		3.40 (1H, dd, $J$ = 6.3, 12.0 Hz)
5-OH		13.54 (1H, s)		13.15 (1H, s)

<sup>\*</sup> Both  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) and  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) were recorded in DMSO- $d_6$ .

<sup>\*\*</sup> Both  $^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz) and  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz) were recorded in DMSO- $d_6$ .

## บทที่ 6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

### 6.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยวิธี microplate ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากยอดเสม็ดชุน และใบสมเล็ด แสดงค่าเป็น % inhibition ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL และ IC<sub>50</sub> ดังตารางที่ 121

ตารางที่ 121. ผลการทดสอบต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารบริสุทธิ์

compounds	% inhibition (ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Vitamin C	-	10.52 ± 0.48
Trolox	-	12.54 ± 0.89
betulinic acid (1)	15.90 ± 0.87 (19.33)	inactive
ursolic acid (2)	12.69 ± 1.33	inactive
jacoumaric acid (3)	19.40 ± 2.51	inactive
2 <i>α</i> -hydroxyursolic acid (4)	3.61 ± 0.63	inactive
stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (5)	4.11 ± 0.81	inactive
gallic acid (6)	95.80 ± 0.32	2.46 ± 0.05
myricitrin (7)	95.27 ± 0.45	14.40 ± 0.42
quercitrin (8)	93.16 ± 0.11	17.19 ± 0.33
methyl gallate (9)	93.46 ± 0.34	4.22 ± 0.08
vitexin (10)	49.01 ± 0.38	inactive
orientin (11)	93.19 ± 0.05	12.97 ± 0.12
isoorientin (12)	95.59 ± 0.52	11.14 ± 0.18

### 6.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetyltransferase

ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetyltransferase โดยวิธี microplate ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากยอดเสม็ดชุน และใบสมเล็ด แสดงค่าเป็น % inhibition ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL และ IC<sub>50</sub> ดังตารางที่ 122

ตารางที่ 122. ผลการทดสอบฤทธิ์ anti-AChE ของสารบริสุทธิ์

compounds	% inhibition (ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Galanthamine*	-	*4.24 ± 0.18 **1.73 ± 0.12 ***0.91 ± 0.07
betulinic acid (1)	*39.95 ± 1.53	inactive
ursolic acid (2)	***9.54 ± 0.46	inactive
jacoumaric acid (3)	*29.73 ± 3.12	inactive
2 <i>α</i> -hydroxyursolic acid (4)	**11.18 ± 0.30	inactive
stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (5)	**5.53 ± 1.47	inactive



compounds	% inhibition (ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
gallic acid ( <b>6</b> )	**75.52 ± 3.54	not determine
myricitrin ( <b>7</b> )	**10.91 ± 1,69	inactive
quercitrin ( <b>8</b> )	**10.21± 1.26	inactive
methyl gallate ( <b>9</b> )	*21.04 ± 0.88	inactive
vitexin ( <b>10</b> )	not determine	not determine
orientin ( <b>11</b> )	**30.20 ± 0.73	inactive
isoorientin ( <b>12</b> )	**19.50 ±1.60	inactive

\*50% DMSO-20% Tween20, \*\*50% methanol, \*\*\*β-cyclodextrin-50% methanol

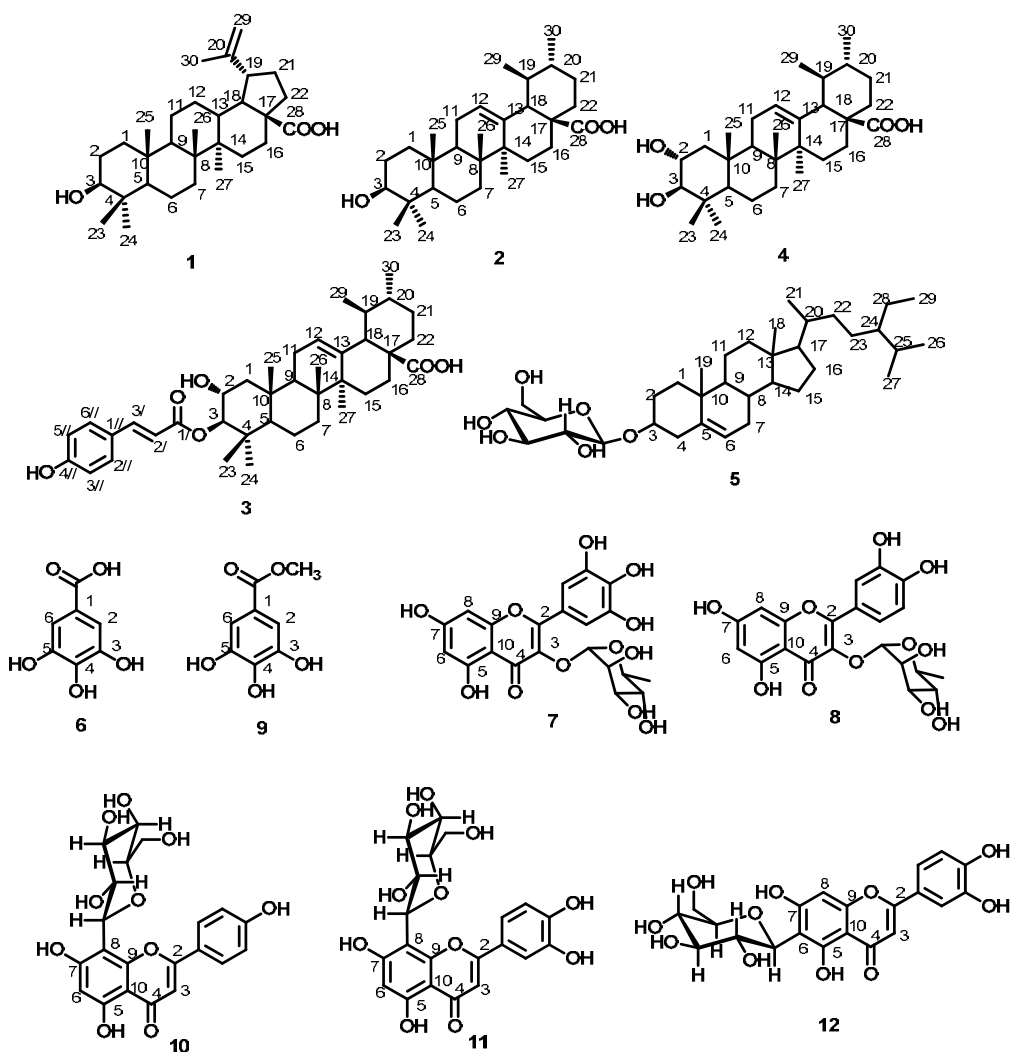
## สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหาร และก่อให้เกิดการแพ้ ของพืชพื้นเมืองภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วย 80% เมทานอล ของผักพื้นบ้านทั้ง 21 ชนิด ได้แก่ ลูกเหรี้ง (*Parkia timoriana*) มั่นปู้ (*Glochidion wallichianum*) สมเสียด (*Glochidion hypoleucum*) ดอกดาหลา (*Niolaia elatior*/ *Etlingera elatior*) แฉง (*Maerua siamensis*) ผักกูด (*Diplazium esculentum*) ผักก้านจอง (*Limnocharis flava*) กระถิน (*Leucaena glauca*/ *Leucaena leucocephala*) ผักคราดหัวแหวน (*Spilanthes acmella*) ดอกขจร (*Telosma minor*) กระโดนบก (*Careya sphaerica*) เสม็ดชุน (*Syzygium gratum*) มะมุด (*Mangifera foetida*) ผักพุ่ม (*Champereia manillana*) ดอกโสน (*Sesbania aculeata*) ผักแฉะ (*Momordica subangulata*) เมาไขปลา (*Antidesma ghaesembilla*) กระโดนน้ำ (*Barringtonia acutangula*) ผักเหลียง (*Gnetum gnemon*) ผลขำมะเรียง (*Lepisanthes fruticosa*) และพลองเหมือด (*Memecylon edule*) พบว่าสารสกัดผักพื้นบ้านทั้ง 21 ชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหาร และก่อให้เกิดการแพ้ ดังนั้นการพิจารณาเลือกผักพื้นบ้านเพื่อนำมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะพิจารณาจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านออกซิเดชันเบื้องต้น ซึ่งพบว่าผักพื้นบ้านที่มีศักยภาพที่จะนำมาศึกษาต่อคือ เสม็ดชุน มั่นปู้ สมเสียด กระโดนน้ำ และกระโดนบก เนื่องจากสารสกัดด้วย 80% เมทานอล ของผักทั้ง 5 ชนิด แสดงฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านออกซิเดชันได้ดี และยังไม่มีรายงานการศึกษาสารสำคัญของต้นเสม็ดชุน และสมเสียดมาก่อน จึงเลือกเสม็ดชุน และสมเสียดมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์ต่อ โดยการสกัดยอดเสม็ดชุน และสมเสียดด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลายจากข้าวเหนียวไปชั่วมาก ได้สารสกัดหยาบจากเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นพบว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และเมทานอลของยอดเสม็ดชุน และสมเสียดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี นอกจากนี้สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้งสองชนิดยังมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ดังนั้นจึงนำสารสกัดชั้น เอทิลอะซิเตต และเมทานอลของพืชทั้งสองชนิดมาแยกหาสารออกฤทธิ์ต่อด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี

การสกัดแยกสารจากยอดเสม็ดชุนได้สารบริสุทธิ์ 8 ชนิด โดยสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต สามารถแยกได้สารในกลุ่ม terpenoid 5 ชนิด คือ betulinic acid (1), ursolic acid (2), jacoumaric acid (3), 2 $\alpha$ -hydroxyursolic acid (4) และ stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (5) และสารสกัดชั้นเมทานอลสามารถแยกได้สารในกลุ่ม polyphenol อีก 3 ชนิด คือ gallic acid (6), myricetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (myricitrin) (7) และ quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) (8)

การสกัดแยกสารจากใบสมเสียดได้สารบริสุทธิ์ 6 ชนิด โดยสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต สามารถแยกได้สารในกลุ่ม terpenoid 1 ชนิด คือ stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside (5) และสารสกัดชั้นเมทานอลสามารถแยกได้สารในกลุ่ม polyphenol อีก 3 ชนิด คือ methyl gallate (9), gallic acid (6), apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) (10), luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) (11) และ luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin) (12)

สารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้จากยอดเสม็ดชุนและสมเสียดนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase พบว่าสารในกลุ่ม polyphenol ได้แก่ gallic acid (6), methyl gallate (9), myricetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (myricitrin) (7), quercetin 3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside (quercitrin) (8), apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) (10), luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) (11) และ luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin) (12) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH นอกจากนี้สาร gallic acid (6) ยังมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase



จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase และต้านแบคทีเรียของผักพื้นบ้านทั้ง 21 ชนิด จะเห็นว่าผักพื้นบ้านหลายชนิดนอกจากจะขึ้นเองตามธรรมชาติ ทำให้ไม่มีสารเคมีสังเคราะห์หรือยาฆ่าแมลง ไม่มีอันตรายจากสารพิษตกค้างแล้ว ยังมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านอนุมูลอิสระ และผักพื้นบ้าน เพื่อช่วยเพิ่มเติมข้อมูลการนำผักดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ทางด้านการดูแลสุขภาพมากขึ้น และช่วยส่งเสริมให้ทุกคนหันมารับประทานผักพื้นบ้านมากขึ้น

การศึกษาหาสารที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เป็นองค์ประกอบในผักพื้นบ้านนั้นมีความสำคัญที่นำไปศึกษาและพัฒนาต่อไปเป็นพืชสมุนไพร หรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่าง ๆ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชผักดังกล่าว ทำให้เป็นพืชเศรษฐกิจ เพิ่มรายได้ให้กับชุมชนมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นนำข้อมูลการวิจัยไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ การพัฒนาการปลูก ศึกษาเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีสารสำคัญในการออกฤทธิ์มากที่สุด นอกจากนี้ยังทำให้รู้ถึงวิธีการเตรียมหรือการสกัดสารสกัดหยาบที่เหมาะสม เพื่อนำไปพัฒนาเป็นตำรับยาสมุนไพรที่มีคุณภาพ และมีประสิทธิภาพดี

## เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา ดีวิเศษ, บรรณาธิการ. ผักพื้นบ้านภาคกลาง. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2542, 279 หน้า.
- กาญจนา ดีวิเศษ, บรรณาธิการ. ผักพื้นบ้านภาคใต้. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2542, 279 หน้า.
- เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: พันธุ์พืชบลิซซิง, 2544.
- ล้นทม จอนจบทรง, ผักพื้นบ้าน (ภาคใต้). กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2537, 144 หน้า.
- สุรีย์ ภูมิภมร อนันต์ คำคง, บรรณาธิการ. ไม้ดอกประสมศักดิ์กนิได้. กรุงเทพมหานคร: เฟื่องฟ้า พรินติ้ง, 2540, 486 หน้า.
- อุไร จิรมงคลการ. ผักพื้นบ้าน เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: อมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, 2547, 223 หน้า.
- Alzoreky N, Nakahara K. Antioxidant activity of some edible Yemeni plants evaluated by ferrylmyoglobin/ABTS<sup>+</sup> assay. Food Sci Technol Res 2001;7(2): 141–4.
- Bureemas J., Kukongviriyapan V., Kukongviriyapan U., Senggunprai L., Jetsrisuparb A. Affect of *Syzygium granum* on antioxidant system in  $\beta$ -thalassemia/ Hb-E patients. KKU Res J. 2007;7(2): 15-21.
- De Leo M, Braca A, Sanogo R, Cardile V, DeTommasi N, Russo A. Antiproliferative activity of *Pteleopsis suberosa* leaf extract and its flavonoid components in human prostate carcinoma cells. Planta Med. 2006;72(7):604-10.
- Faizi S, Ali M, Saleem R, Irfanullah, Bibi S. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucosides and its acetyl derivative. Magn Reson Chem 2001;39:399-405.
- Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H. The flavonoids. 1<sup>st</sup> ed. London: Redwood Burn Limited Trawbridge & Esher, 1975, pp1204.
- Jang DS, Kim JM, Lee GY, Kim J, Kim JS, Ursane-type triterpenoids from the aerial parts of *Potentilla discolor*. Agric. Chem. Biotechnol. 2006;49:48–50.
- Kiem PV, Minh CV, Dat NT, Cai XF, Lee JJ, Kim YH. Two new phenylpropanoid glycosides from the stem bark of *Acanthopanax trifoliatum*. Arch Pharm Res. 2003;26(12):1014-7.
- Kriwacki RW., Pitner TP. Current aspects of practical two-dimensional (2D) Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy: Applications to structure elucidation. Pharm Res. 1989;6(7):531-54.
- Kukongviriyapan U., Luangaram S., Leekhaosoong K., Kukongviriyapan V., Preeprame S. Antioxidant and vascular protective activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*. Bio Pharm Bull. 2007;30(4):661-6.
- Lee SM, Min BS, Lee CG, Kim KS, Kho YH. Cytotoxic triterpenoids from the fruits of *Zizyphus jujuba*. Planta Med 2003; 69: 1051-1054.
- Lee TH, Juang SH, Hsu FL, Wu CY. Triterpene acids from the leaves of *Planchonella duclitan*. J. Chin. Chem. Soc. 2005;52(6):1275-80.
- Luangaram S, Kukongviriyapan U, Kukongviriyapan V, Pakdeechote P. Efficacy of *Eugenia grata* extract in reduction of oxidative damage in hemolytic anemic rats. KKU Res J. 2004;4:56-62.
- Numata A, Yang P, Takahashi C, Fujiki R, Nabae M, Fujita E. Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, Goreishi. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1989;37(3):648-51.

- Panpipat W, Suttirak W, Chaijan M. Free radical scavenging activity and reducing capacity of five southern Thai indigenous vegetable extracts. *Walailak Journal Science and Technology* 2010;7(1): 51-60.
- Peng C, Bodenhausen G, Qiu S, Fong H, Farnsworth N, Yuan S, Zheng C: Computer-assisted structure elucidation: Application of CISOC-SES to the resonance assignment and structure generation of betulinic acid. *Magn Reson Chem* 1998;36(4):267-8.
- Rayyan S, Fossen T, Solheim Nateland H, Andersen ØM. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug 'Crataegi Folium Cum Flore' (Hawthorn). *Phytochem Anal* 2005;16:334-41.
- Rungseevijitprapa W., Prasitpuriprecha C. Development of *Eugenia grata* Extract Film Strip for Oral Hugiene. *Isan J Pharm Sci.* 2007;3(1):17-24.
- Said A, Hawas UW, Nofal SM, Rashed K, Huefner A. Pharmacological studies on the aqueous methanolic extract of *Diospyros lotus* Leaves. *Res J Phytochem.* 2009;3(1):1-12.
- Sidana J, Neeradi D, Choudhary A, Singh S, Foley WJ, Singh IP. Antileishmanial polyphenols from *Corymbia maculate*. *J Chem Sci.* 2013;125(4):765-75.
- Tangkanakul P, Trakoontivakorn G, Jariyavattanavijit C. Extracts of Thai indigenous vegetables as rancid inhibitor in a model system. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 2005;39: 274-83.
- Taketa, Alexandre TC. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). *J Braz Chem Soc.* 2004;15(2):205-11.
- Thuong PT, Min BS, Jin W, Na M, Lee J, Seong R, Lee YM, Song K, Seong Y, Lee HK, Bae K, Kang SS. Anti-complementary activity of ursane-type triterpenoids from *Weigela subsessilis*. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(4):830-3.
- Zhou X, Peng J, Fan G, Wu Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. *J Chromatogr A.* 2005;1092(2):216-221.

**Polyphenolic Compounds, the Antioxidants in the Leaves of *Glochidion hypoleucum*.**

Natthinee Anantachoke<sup>1\*</sup>, Worawan Kitphati<sup>2</sup>, Supachoke Mangmool<sup>3</sup>, Nuntavan Bunyapraphatsara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

**Keywords** : Polyphenolic compound, Flavonol-C-glycoside, Antioxidant, *Glochidion hypoleucum*.

**ABSTRACT**

Bioassay-guided fractionation of the methanol extract of *Glochidion hypoleucum* (Miq.) Boerl leaves led to the isolation of five polyphenolic compounds, methyl gallate, gallic acid, apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin), luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) and luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin). The chemical structures of the isolated compounds were identified on the basis of spectroscopic techniques (NMR, EI-MS, HR-MS, UV-Vis, and IR). The antioxidative properties of the extract and isolated polyphenols were evaluated using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) methods and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The polyphenols could inhibit DPPH radicals with the IC<sub>50</sub> values ranging from 2.46  $\pm$  0.05 to 12.97  $\pm$  0.12  $\mu$ g/mL and showed ferric reducing ability with the FRAP values ranging from 249.46 to 257.99 mmol FeSO<sub>4</sub>/100g dried sample.

**1. Introduction**

*Glochidion hypoleucum* (Miq.) Boerl is a shrub to tree in the family Euphobiaceae and distributed in evergreen forest in Myanmar, Thailand, Indochina, South China, and throughout Malesia (Welzen & Chayamarit, ). The plant is indigenous vegetables of Southern Thailand. It's young shoots and leaves are consumed raw and cooked similar to the plant in the same genus, *Glochidion perakensense* Hook. f. and *Glochidion wallichianum* Müll. Arg. It has been reported that the alcoholic extract of *G. perakensense* and *G. wallichianum* leaves exhibited potent antioxidant property and high phenolic content (Alzoreky et al, 2001; Panpipat et al, 2010; Tangkanakul et al, 2005).

Indigenous vegetables occur naturally in some area and climate. Almost of them are pesticide-free therefore they are safe to consume. It is necessary to pay much attention to the chemical constituents and physiological functions especially for antioxidant capacity of the indigenous vegetables in order to add value of them in prevention of various diseases related to free radicals and oxidative stress such as aging, cancer, diabetes and cardiovascular diseases. During the antioxidant screening of methanolic extracts of many of Thai indigenous vegetables found that among those the shoots and leaves of *G. hypoleucum* exhibited strong antioxidant activities tested by DPPH and FRAP assays. Consequently, we herein report the antioxidants isolated from the shoots and leaves of this plant.

**2. Materials and methods**

**2.1 General**

Melting points (m.p., °C) were measured with Electrothermal 9100. Optical rotations were performed using JASCO DIP-370 digital polarimeter, 50 mm microcell. IR and UV spectra were performed acquired using NICOLET 6700 and SHIMADZU UV-2600, respectively. NMR spectra were recorded on Bruker AV 500 and Bruker AVANCE III HD 400 with DMSO- $d_6$  (Merck) as solvent. ESI-MS and EI-MS data were obtained by using Bruker microTOF spectrometer and Thermo Finnigan Polaris Q, respectively. TLC was carried out on silica gel 60 F254 (Merck, layer thickness 0.2 mm). Column chromatography was done over silica gel 60 63-200  $\mu\text{m}$  (Merck) and 40-63  $\mu\text{m}$  (Silicycle)) and reverse phase silica gel C-18 (40-63  $\mu\text{m}$  (Silicycle)). The antioxidant activities were determined by spectrophotometric assay using Infinite M200 Microplate reader (Tecan).

## 2.2 Plant materials

The leaves of *G. hypoleucum* were collected from Songkhla Province, Thailand. The plant was identified by Ms. Rumrada Meeboonya, the researcher of Office of the Forest Herbarium, Thailand. The voucher specimen (BKF number 168401) was deposited in The Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok, Thailand.

## 2.3 Analytical reagents and chemicals

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox<sup>®</sup>), 2,4,6-tripyridyl-1,3,5-triazine (TPTZ), ferric chloride, and ferrous sulfate were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louise, Mo., U.S.A.). Sodium acetate trihydrate

## 2.4 Extraction and isolations

The ground dried shoots and leaves of *G. hypoleucum* (1.26 kg) was successively extracted with hexane (6Lx10 days), ethyl acetate (6Lx14 days), and methanol (6Lx14 days) using a Soxhlet extractor. The solvents were removed under reduced pressure to give crude hexane (47.61 g), ethyl acetate (21.60 g) and methanol (190.72 g) extracts. The crude extracts were evaluated for antioxidant activity by DPPH and FRAP methods. The bioactive methanol extract (111.66 g) was separated on a flash silica gel CC eluted with a gradient of 100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to 100% MeOH. The fractions were combined into 6 fractions (A1-A6) based on their TLC characteristics. Recrystallization of fraction A3 with methanol yielded compound **2** (2.5 g) as white crystals. Fraction A4 (21.06 g) was further isolated on silica gel CC with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH gradient as eluent to give 6 fractions (B1-B6). Fraction B3 (7.54 g) was rechromatographed over silica gel column eluted with gradient mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH to yield 8 fractions (C1-C8). Compounds **2** (85.6 mg) and **1** (1.04 g) were obtained as white crystals by recrystallization of fraction C2 and C4, respectively. Fraction B5 (7.94 g) was further separated, using silica gel CC eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH gradient, to afford 6 fractions (D1-D6). Fraction D4 (1.54 g) was isolated by CC over RP silica gel using 50% MeOH in water as mobile phase to afford 6 fractions (E1-E6). Recrystallization of fraction E3 with methanol led to the isolation of compound **4** (51.6 mg) as a yellow powder. Fraction D5 (4.01 g) was subjected to RP silica gel column eluting with 50% methanol in water to give 5 fraction (F1-F5). Compound **5** (85.5 mg) was obtained as a yellow powder by recrystallization of fraction F3.

## 2.5 Bioassays

The crude extracts of the shoots and leaves of *G. hypoleucum* and isolated compounds were evaluated for antioxidant activities using DPPH and FRAP assays.



DPPH radical scavenging activity was carried out according to (). The test samples were prepared at least five concentrations in 80% methanol. 100  $\mu$ L of the sample solutions were added in 96-well microtiter plates and mixed with 100  $\mu$ L of 0.2 mg/mL DPPH radical methanolic solution in triplicate. The reaction mixtures were incubated at room temperature in the dark for 10 min, and the absorbances were recorded at 517 nm. Trolox<sup>®</sup> was used as positive control. The free radical scavenging activity of each sample solution was calculated as percent inhibition by the equation: % Inhibition =  $100 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$ . The result was expressed as the concentration that could inhibit the DPPH radical formation by 50% (IC<sub>50</sub>).

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay according to (Firuzi et al, 2005) was used for determining the reducing capacity of extracts and isolates. The sample solutions were prepared at concentration 2 mg/mL. 25  $\mu$ L of the solutions were mixed with 175  $\mu$ L of FRAP reagent made of equal volumes of 300 mM acetate buffer pH 3.6 (3.1 g sodium acetate and 16 ml glacial acetic acid), 10 mM TPTZ prepared in 40 mM HCl and 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 vol each. The mixtures were incubated at 37°C for 1 min and then the absorbances were measured at 593 nm. The reducing capacity was expressed as FRAP values (mmol FeSO<sub>4</sub> equivalents per 100 g of sample) which were determined by comparison the absorbance ( $A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} - A_{\text{control}}$ ) to the standard curve of FeSO<sub>4</sub> solutions at a concentration ranging from 0.01 to 0.50 mM.

### 3. Results and discussion

The qualitative DPPH assay on TLC of the crude hexane, ethyl acetate and methanol extracts from shoots and leaves of *G. hypoleucum* revealed that the methanol extract exhibited strongest activities. Therefore, the methanol extract was further purified to yield 5 active compounds (**1-5**) of which the structures were characterised on the basis of spectroscopic methods as methyl galate (**1**), gallic acid (**2**), apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) (**3**), luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin) (**4**), and luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin) (**5**).

Compounds **1** and **2** were obtained as white crystals. UV absorption spectra of these compounds represented the substituted aromatic moiety. The IR spectra showed absorption bands hydroxyl group at 3410 and 3400 cm<sup>-1</sup> and carbonyl group at 1678 and 1701 cm<sup>-1</sup>. In <sup>1</sup>H-NMR spectra, singlet signals at  $\delta$  6.93 ppm of **1** and  $\delta$  6.91 ppm of **2** are the symmetric aromatic protons at position 2 and 6. Moreover, another singlet at 3.73 ppm of **1** belongs to proton signal of methoxyl group. <sup>13</sup>C-NMR spectra of these compounds showed typical pattern of carbons in polyphenolic ester and acid, therefore compound **1** and **2** were identified to be methyl gallate and gallic acid, respectively. (Said et al, 2009)

UV absorption spectra of compounds **3-5** showed characteristic absorption band of flavones (Ham et al, 1994). IR absorption spectra of the hydroxyl and the conjugated carbonyl groups of these compounds appeared at 3337-3515 cm<sup>-1</sup> and 1652-1653 cm<sup>-1</sup>, respectively. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of compound **3** showed characteristic signals of apigenin glucoside. In <sup>1</sup>H NMR spectrum, A2B2 splitting pattern of two doublet signals at  $\delta$  8.01 ppm (H-2', 6') and 6.88 ppm (H-3', 5') with a coupling constant of 8.8 Hz suggested that there is one substituent at C-4' of flavonoid ring B. Furthermore, two singlets at  $\delta$  6.77 and 6.27 ppm were established to be the signals of H-3 in ring C and H-6 in ring A. The doublet at  $\delta$  4.67 ppm

(1H, d, J = 9.9 Hz) is the signal of beta anomeric proton H-1'' of D-glucose. The HMBC experiment revealed that the sugar connect to the flavone moiety at C-8. In addition, the  $^{13}\text{C}$  NMR signal of C-8 is detected at  $\delta$  104.66 ppm suggested that compound **3** is C-glycoside. Consequently, compound **3** was identified to be apigenin-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexin) of which the spectroscopic data were similar to the previously reported data (Kim et al, 2005; Rayyan et al, 2005).

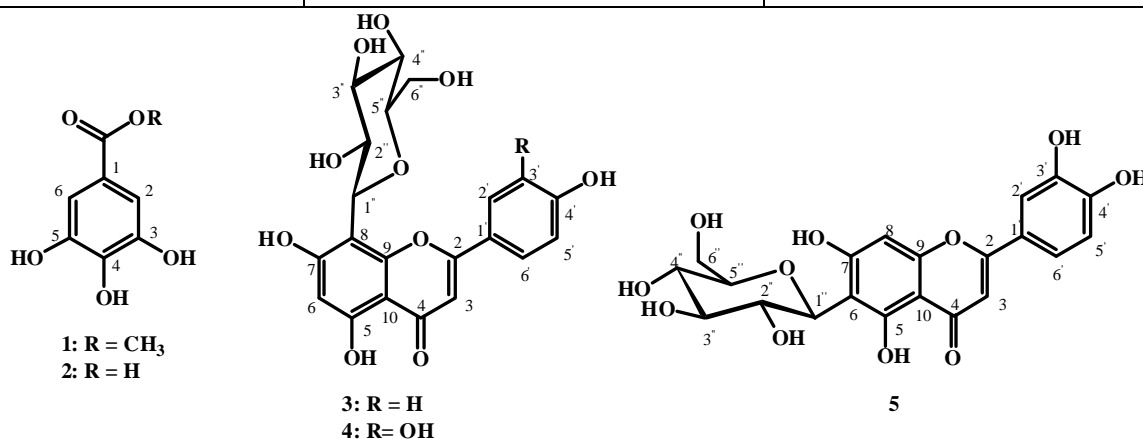
The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **4** is different from compound **3** in that the proton signals of ring B were detected at  $\delta$  7.47 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.86 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), and 7.53 (1H, dd, J = 1.9, 8.3 Hz, H-6') which are the typical pattern for 3',4'-disubstituted B ring. Moreover, the  $^{13}\text{C}$  NMR and 2D NMR spectrum showed that ring B has two carbon carrying oxygen atom at C-3' (145.97 ppm) and C-4' (149.77 ppm), together with the data from mass spectrometry indicating that the substituents at C-3' and C-4' are hydroxyl groups. Comparison of the spectroscopic data with the previous report (Zhou et al, 2005), compound **4** was identified as luteolin 8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (orientin).

Compound **5** was established as an isomer of compound **4**, luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (isoorientin), because the data from HMBC experiment indicated that D-glucose bind to flavonoid ring A at C-6 of which the carbon signal was detected at  $\delta$  109.15 ppm. (Rayyan et al, 2005)

The antioxidant capacities of the isolated compounds **1-5** were shown in table 1.

**Table 1.** Antioxidant capacities of the extracts and isolated compounds of the shoots and leaves of *G. hypoleucum*.

Extract and compounds	FRAP value (mmol FeSO <sub>4</sub> /100 g dried sample)	DPPH IC <sub>50</sub> (μg/ml)
Vit C*	225.77	10.52 ± 0.48
Trolox*	226.82	12.54 ± 0.89
MeOH extract	62.28	39.97 ± 0.26
Methyl gallate ( <b>1</b> )	249.46	4.22 ± 0.08
Gallic acid ( <b>2</b> )	257.99	2.46 ± 0.05
Vitexin ( <b>3</b> )		-
Orientin ( <b>4</b> )		12.97 ± 0.12
Isoorientin ( <b>5</b> )		11.14 ± 0.18



**Figure 1.** Chemical structure of isolated compounds

*Methyl gallate (1)* : Physical characteristics: white needles from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, m.p. 200-203 °C

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 275 (4.19), 228 (4.28)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3410, 3297, 1678, 1613, 1550, 1465, 1338, 1310, 1263, 1206, 1036, 1003.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 6.93 (2H, s, H-2,6), 3.73 (3H, s, OCH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 119.4 (C-1), 108.5 (C-2,6), 145.6 (C-3,5), 138.4 (C-4), 166.4 (C=O), 51.6 (OCH<sub>3</sub>)

EIMS *m/z* (% relative intensity): 184 [M]<sup>+</sup> (63), 153 (100), 125 (23)

HR-ESI-MS: *m/z* found: 207.0277 [M+Na]<sup>+</sup> calcd. For C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>Na *m/z* 207.0269

*Gallic acid (2)* : Physical characteristics: white needles from MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, m.p. 258.7 °C

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 270 (4.08), 228 (4.14)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3400, 3286, 1701, 1617, 1541, 1450, 1339, 1247, 1026, 866.

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 6.91 (2H, s, H-2,6)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 120.6 (C-1), 108.9 (C-2,6), 145.6 (C-3,5), 138.2 (C-4), 167.7 (C=O)

EIMS *m/z* (% relative intensity): 167 [M]<sup>+</sup> (100), 149 (97), 125 (27)

HR-ESI-MS: *m/z* found: 193.0139 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Na, 193.0113.

*Apigenin-8-C-β-D-glucopyranoside (vitexin) (3)*: Physical characteristics: yellow powder from MeOH

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 333.5 (3.10), 270.0 (3.12), 214.5 (3.38)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3373, 3214, 2910, 2871, 1650, 1614, 1567, 1506, 1421, 1385, 1361, 1297, 1266, 1251, 1223, 1178, 1107, 1091, 1057, 1039, 1014, 986, 970

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> : - 11.5 ° (c 0.5, pyridine)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 6.77 (H, s, H-3), 6.27 (1H, s, H-6), 8.01 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 4.67 (1H, d, J = 9.9 Hz, H-1''), 3.82 (1H, d, J = 9.3 Hz, H-2''), 3.25 (1H, m, H-3''), 3.36 (1H, m, H-4''), 3.23 (1H, m, H-5''), 3.82 (1H, dd, J = 3.8, 11.0 Hz, H-6''), 3.53 (1H, m, H-6''), 13.16 (1H, s, 5-OH)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 164.05 (C-2), 102.51 (C-3), 182.16 (C-4), 160.46 (C-5), 98.21 (C-6), 162.63 (C-7), 104.66 (C-8), 156.07 (C-9), 104.11 (C-10), 121.68 (C-1'), 129.02 (C-2', 6'), 115.91 (C-3', 5'), 161.19 (C-4'), 73.44 (C-1''), 70.93 (C-2''), 78.72 (C-3''), 70.64 (C-4''), 81.86 (C-5''), 61.38 (C-6'')

EIMS *m/z* (% relative intensity): 324 (18), 312 (17), 294 (17), 283 (100), 270 (15), 165 (23)

HR-ESI-MS: *m/z* found: 455.0848 [M+Na]<sup>+</sup> calcd. For C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>Na *m/z* 455.0954

*Luteolin 8-C-β-D-glucopyranoside (orientin) (4)*: Physical characteristics: yellow powder from MeOH

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 348.5 (3.28), 294.0 (2.99), 269.0 (3.24), 256.50 (3.24), 210.0 (3.58)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3515, 3380, 2896, 1653, 1609, 1578, 1551, 1513, 1425, 1370, 1323, 1290, 1249, 1117, 1105, 1045, 1006.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> : - 50.6 (c 0.1, methanol)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) : 6.64 (H, s, H-3), 6.26 (1H, s, H-6), 7.47 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-2'), 6.86 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5'), 7.53 (1H, dd,  $J = 1.9, 8.3$  Hz, H-6'), 4.67 (1H, d,  $J = 9.9$  Hz, H-1''), 3.82 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H-2''), 2.59 (1H, t,  $J = 8.5$  Hz, H-3''), 3.11 (1H, t,  $J = 9.1$  Hz, H-4''), 2.59 (1H, m, H-5''), 3.78 (1H, d,  $J = 11.6$  Hz, H-6''), 3.54 (1H, dd,  $J = 6.2, 11.6$  Hz, H-6''), 13.17 (1H, s, 5-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) : 164.28 (C-2), 102.61 (C-3), 182.23 (C-4), 160.58 (C-5), 98.30 (C-6), 162.74 (C-7), 104.72 (C-8), 156.20 (C-9), 104.23 (C-10), 122.22 (C-1'), 114.25 (C-2', 6'), 145.97 (C-3'), 149.77 (C-4'), 115.84 (C-5'), 119.58 (C-6'), 73.58 (C-1''), 70.95 (C-2''), 78.93 (C-3''), 70.87 (C-4''), 82.18 (C-5''), 61.81 (C-6'')

EIMS  $m/z$  (% relative intensity): 450  $[\text{M}+2\text{H}]^+$  (2.69), 394 (11), 299 (100), 283 (19), 270 (18), 165 (21)

HR-ESI-MS:  $m/z$  found: 471.0867  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. For  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}\text{Na}$   $m/z$  471.0903

*Luteolin 6-C- $\beta$ -D-glucopyranoside* (isoorientin) (5): Physical characteristics: yellow powder from MeOH

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 349.0 (2.91), 268.6 (2.93), 258.4 (2.92), 215.4 (3.55)

FTIR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3337, 1652, 1625, 1580, 1493, 1451, 1360, 1305, 1190, 1173, 1159, 1083, 1072

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  : +7.1 ( $c$  1.0, pyridien)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) : 6.66 (H, s, H-3), 6.47 (1H, s, H-8), 7.38 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-2'), 6.88 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5'), 7.40 (1H, dd,  $J = 2.2, 8.3$  Hz, H-6'), 4.57 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz, H-1''), 4.03 (1H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-2''), 3.19 (1H, t,  $J = 8.5$  Hz, H-3''), 2.69 (1H, t,  $J = 8.9$  Hz, H-4''), 3.15 (1H, m, H-5''), 3.67 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz, H-6''), 3.40 (1H, dd,  $J = 5.6, 11.4$  Hz, H-6''), 13.54 (1H, s, 5-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) : 163.98 (C-2), 103.10 (C-3), 182.19 (C-4), 160.98 (C-5), 109.15 (C-6), 163.62 (C-7), 93.84 (C-8), 156.54 (C-9), 103.69 (C-10), 121.72 (C-1'), 113.56 (C-2', 6'), 146.06 (C-3'), 150.04 (C-4'), 116.38 (C-5'), 119.30 (C-6'), 73.35 (C-1''), 70.50 (C-2''), 79.24 (C-3''), 70.91 (C-4''), 81.85 (C-5''), 61.80 (C-6'')

EIMS  $m/z$  (% relative intensity): 450  $[\text{M}+2\text{H}]^+$  (2.58), 394 (19), 299 (100), 286 (31), 270 (26), 165 (33)

HR-ESI-MS:  $m/z$  found: 471.0892  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. For  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}\text{Na}$   $m/z$  471.0903.

## Acknowledgements

This study was funded by the Coordinating Centre for Research and Development to Increase Value of the Plants Indigenous to Thailand, Mahidol University and the Thailand Research Fund (RDG5220056). Moreover, the authors are grateful to Ms. Rumrada Meeboonya, the researcher of Office of the Forest Herbarium, Thailand for identified the plant.

## References

- Welzen, P.C. van, & Chayamarit, K. Flora of Thailand Euphorbiaceae. Nationaal Herbarium Nederland, Leiden; Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok.  
[www.nationaalherbarium.nl/thaieuph](http://www.nationaalherbarium.nl/thaieuph)([http://www.nationaalherbarium.nl/ThaiEuph/ThGspecies/ThGlochidion.htm#Glochidion\\_hypoleucum](http://www.nationaalherbarium.nl/ThaiEuph/ThGspecies/ThGlochidion.htm#Glochidion_hypoleucum))
- Alzoreky, N., & Nakahara, K. (2001). Antioxidant activity of some edible Yemeni plants evaluated by ferrylmyoglobin/ABTS+ assay. *Food Science and Technology Research*, 7, 141–144.

- Panpipat, W., Suttirak, W., & Chaijan, M. (2010). Free radical scavenging activity and reducing capacity of five southern Thai indigenous vegetable extracts. *Walailak Journal Science and Technology*, 7, 51–60.
- Tangkanakul, P., Trakoontivakorn, G., & Jariyavattanavijit C. (2005). Extracts of Thai indigenous vegetables as rancid inhibitor in a model system. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 39, 274–283.
- Said, A., Hawas, U.W., Nofal, S.M., Rashed K., & Huefner A. (2009). Pharmaco-chemical studies on the aqueous methanolic extract of *Diospyros lotus* leaves. *Research Journal of Phytochemistry*, 3, 1–12.
- Rayyan, S., Fossen, T., Solheim, N. H., Andersen, ØM. (2005). Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug 'Crataegi Folium Cum Flore' (Hawthorn). *Phytochemical Analysis*, 16, 334–341.
- Kim, J.H., Lee, B.C., Kim, J.H., Sim, G.S., Lee, D.H., Lee, K.E., Yun, Y.P., Pyo, H.B. (2005). The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Archives of Pharmacal Research*, 28, 195–202.
- Zhou, X., Peng, J., Fan, G., Wu, Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. (2005). *Journal of Chromatography A*, 1092, 216-221.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1721,174-184.