

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดใบโดยวิธีหมัก (Maceration)

สารสกัดหยาบชั้น methanol จากใบของกระดังงาจีนมีน้ำหนักหลังจากระเหยให้แห้ง 45.1 g

4.2 ผลการแยกสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดชั้น Methanol จากใบจำนวน 30 g มาแยกให้เป็นส่วนสกัดย่อยด้วยเทคนิค column chromatography ด้วย silica gel และใช้ตัวทำละลายผสม ethyl acetate : methanol (100:0-0:10) เป็นตัวชะสารจากนั้น รวมสารสกัดย่อยที่มีลักษณะเหมือนกันด้วย TLC จะได้ส่วนสกัดย่อย 7 ส่วนสกัดย่อย (fraction) น้ำหนักสารที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตาราง 1 น้ำหนักส่วนสกัดย่อยของสารสกัดหยาบชั้น methanol ที่แยกด้วย column chromatography

Fraction	น้ำหนักสารที่ได้ (g)
A-1	9.52
A-2	7.25
A-3	2.87
A-4	0.98
A-5	0.82
A-6	1.38
A-7	2.13

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบ

เมื่อนำส่วนสกัดย่อย 7 ส่วน ของใบกระดังงาจีนที่แยกได้มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ส่วนสกัดย่อย A5 แสดง % ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 21.48 ± 8.89 และมี % ยับยั้ง tyrosinase 40.51 ± 4.81 ขณะที่ส่วนสกัดย่อย A6 แสดง % ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 40.54 ± 1.18 และมี % ยับยั้ง tyrosinase 43.60 ± 7.49 ผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยทั้งหมดแสดงในตาราง 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้ง Tyrosinase ของส่วนสกัดย่อยจากกระดังงาจีน

ส่วนสกัดย่อย	% DPPH scavenging activity (mean±S.D.)	% Tyrosinase inhibitory activity (mean±S.D.)
A1	19.98±2.64	10.66±8.58
A2	25.80±1.92	22.09±3.05
A3	30.01±2.54	19.48±0.54
A4	31.89±0.36	19.66±4.41
A5	21.48±8.89	40.51±4.81
A6	40.54±1.18	43.61±7.49
A7	26.03±1.11	13.03±12.41
L-ascorbic acid	72.06±1.24	-
Kojic acid	-	76.14±1.30

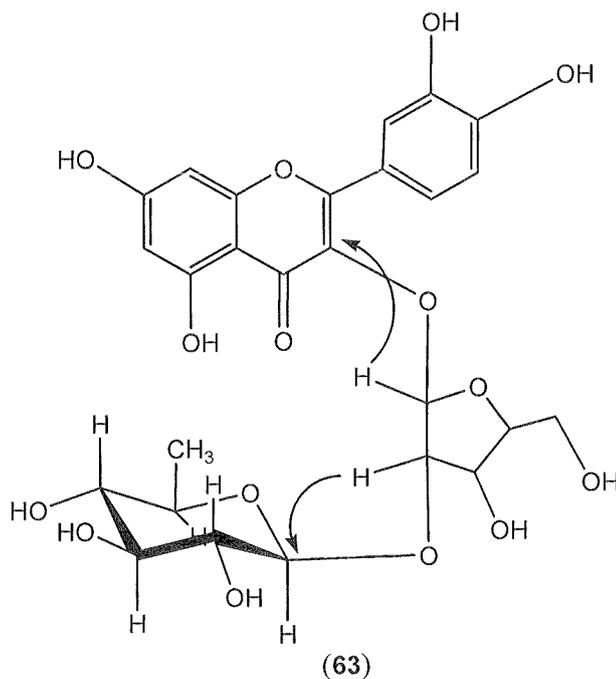
4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำส่วนสกัด A-5 และ A-6 จากใบกระดังงาจีนที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ มาแยกสารจากด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีต่างๆซึ่งได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 3 ชนิด จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์สารเหล่านี้ด้วย เทคนิคทางสเปกโทรเมทรีได้แก่แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometr), นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์แบบ 1 มิติและ 2 มิติ (1D และ 2D NMR spectrometer)

4.4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-1

สารประกอบ AH-1 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ข้อมูล FAB-MS แสดง $[M+H]^+$ ที่ m/z 581 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{26}H_{28}O_{15}$ จากข้อมูลของ 1H NMR แสดง meta coupling doublet protons ระหว่าง H-6 และ H-8 ที่ δ 6.19 และ 6.36 ppm ($J=1.0$ Hz, each) ส่วน ABX coupling type protons ที่ δ 6.89 ($J= 8.4$ Hz), 7.48 ($J= 8.4, 1.6$ Hz) และ 7.84 ($J= 1.6$ Hz) ppm ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ได้แก่ H-5', H-6' และ H-2' สูตรโครงสร้างนี้เป็น quercetin เป็นส่วนของ aglycone ค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 5.66 (H-1''), 4.42 (H-2''), 3.40 (H-3''), 3.88 (H-4''), 3.48 (H-5'') ppm แสดงถึงการมี arabinose ในสูตรโครงสร้าง และจาก ค่า coupling constant ระหว่าง H-1'' และ H-2'' ($J=1.0$ Hz) แสดงให้เห็นถึง α -configuration ของ aabinofuranoside ส่วนของน้ำตาลอีก 1 โมเลกุลเมื่อพิจารณาค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 4.94 (H-1'''), 3.79 (H-2'''), 3.59 (H-3'''), 3.37 (H-4'''), 3.66 (H-5'''), 1.20

(CH₃-6''') ppm แสดงถึงการมี rhamnose ในสูตรโครงสร้าง จาก ค่าcoupling constant ระหว่าง H-1'' และ H-2'' ($J=1.6$ Hz) แสดงให้เห็นถึง α -configuration ของ rhamnopyranoside จากการศึกษานิวเคลียสแม่เหล็ก (HMBC) spectrum ยืนยันตำแหน่งที่น้ำตาล arabinofuranose เกาะที่ตำแหน่ง C-3 ของ quercetin โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-1'' (δ_H 5.66 ppm) กับ C-3 (δ_C 134.8 ppm) ส่วนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาล rhamnopyranose เกาะที่ตำแหน่ง 2 ของ arabinofuranose โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-2'' (δ_H 4.42 ppm) กับ C-1''' (δ_C 101.3 ppm) ตำแหน่ง carbons และ protons ที่เหลือทั้งหมดยืนยันด้วย HSQC และ HMBC spectra ดังนั้นสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-1 ได้ว่าเป็นสาร quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinofuranoside (**63**) (Li et al, 1997)



เอกลักษณ์ทางสเปกโทรเมตรีของสารประกอบ AH-1

FABMS: m/z (%) 581 ($[M+H]^+$, 1), 324 (33), 114 (100)

¹H NMR (500 MHz, methanol-*d*₄): แสดงในตารางที่ 3

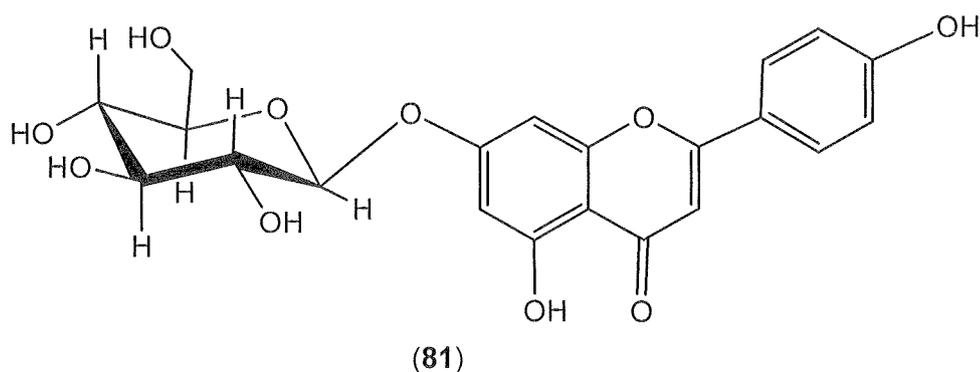
¹³C NMR (125 MHz, methanol-*d*₄): แสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound AH-1 in methanol- d_4

Position	^1H δ (ppm), J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2		149.9
3		134.8
4		179.7
5		163.0
6	6.19 (1H, <i>d</i> , 1.0)	100.1
7		166.9
8	6.36 (1H, <i>d</i> , 1.0)	94.9
9		158.6
10		107.7
1'		123.0
2'	7.84 (1H, <i>d</i> , 1.6)	117.1
3'		146.4
4'		158.9
5'	6.89 (1H, <i>d</i> , 8.4)	116.5
6'	7.48 (1H, <i>dd</i> , 8.4, 1.6)	122.9
1''	5.66 (1H, <i>d</i> , 1.0)	105.3
2''	4.42 (1H, <i>dd</i> , 1.0, 2.75)	88.4
3''	3.40 (1H, <i>dd</i> , 2.75, 4.34)	77.2
4''	3.88 (1H, <i>dd</i> , 4.34, 5.35)	87.7
CH ₂ -5''	3.48 (1H, <i>dd</i> , 4.34, 8.1)	62.4
1'''	4.94 (1H, <i>d</i> , 1.68)	101.3
2'''	3.79 (1H, <i>dd</i> , 1.68, 2.0)	72.3
3'''	3.59 (1H, <i>dd</i> , 2.0, 9.47)	72.1
4'''	3.37 (1H, <i>t</i> , 9.47)	73.9
5'''	3.66 (1H, <i>dd</i> , 9.47, 6.1)	70.4
CH ₃ -6'''	1.20 (3H, <i>d</i> , 6.1)	17.8

4.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-2

สารประกอบ AH-2 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ข้อมูล EIMS แสดง $[M]^+$ ที่ m/z 432 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{21}H_{20}O_{10}$ จากข้อมูลของ 1H NMR แสดง meta coupling doublet protons ระหว่าง H-6 และ H-8 ที่ δ 6.81 และ 6.49 ppm ($J=2.1$ Hz, each) ส่วน ABA'B' coupling type protons ที่ δ 7.87 ($J= 8.8$ Hz) และ 6.91 ($J= 8.8$ Hz) ppm ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ได้แก่ H-2', H-6' และ H-3', H-5' และมี H-3 เป็น singlet proton ที่ δ 6.65 ppm สูตรโครงสร้างนี้เป็นส่วนของ aglycone คือ apigenin ส่วนของน้ำตาลแสดงค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 5.05 (H-1''), 3.50 (H-2''), 3.48 (H-3''), 3.38 (H-4''), 3.52 (H-5''), 3.69 และ 3.91 (H-6'') ppm แสดงถึงการมี glucose ในสูตรโครงสร้าง และจาก ค่า coupling constant ระหว่าง H-1'' และ H-2'' ($J=7.1$ Hz) แสดงให้เห็นถึง β -configuration ของ glucopyranose ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยแยกสารชนิดนี้ได้ ดังนั้นสารประกอบ AH-2 จึงเป็นสาร apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside (**81**) (Moussaoui et al, 2010), (Markham et al, 1978)



เอกลักษณ์ทางสเปกโทรเมตรีของสารประกอบ AH-2

EIMS: m/z (%) 432 ($[M]^+$, 5), 132 (100), 114 (65)

1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): แสดงในตาราง 4

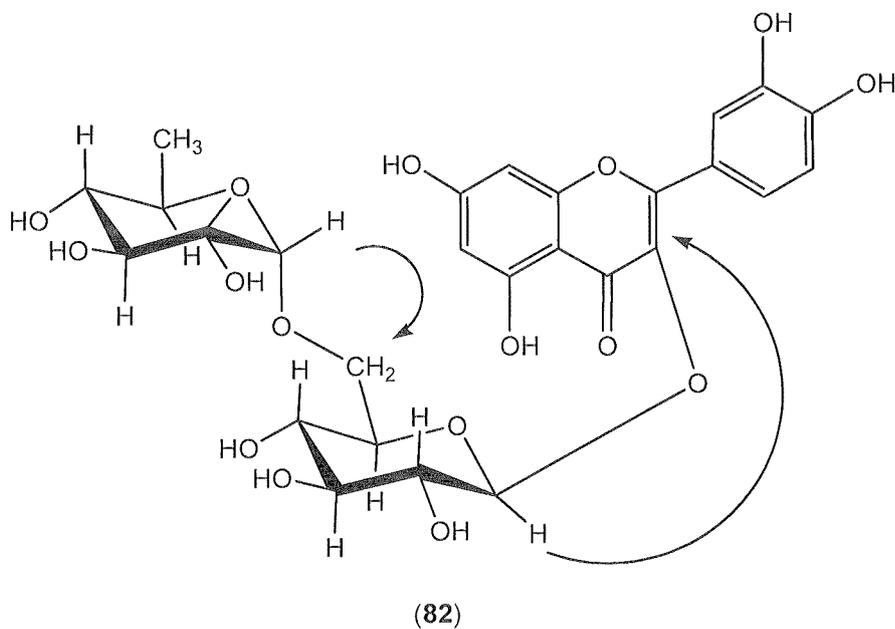
^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): แสดงในตาราง 4

ตาราง 4 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound AH-2 in methanol- d_4

Position	^1H δ (ppm), J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2		166.7
3	6.65 (1H, <i>s</i>)	149.8
4		184.0
5		158.9
6	6.81 (1H, <i>d</i> , 2.1)	98.7
7		164.8
8	6.49 (1H, <i>d</i> , 2.1)	93.5
9		162.9
10		103.9
1'		123.0
2'	7.87 (1H, <i>d</i> , 8.8)	129.6
3'	6.91 (1H, <i>d</i> , 8.8)	117.0
4'		162.9
5'	6.91 (1H, <i>d</i> , 8.8)	117.0
6'	7.87 (1H, <i>d</i> , 8.8)	129.6
1''	5.05 (1H, <i>d</i> , 7.1)	101.6
2''	3.50 (1H, <i>dd</i> , 9.1, 5.1)	77.8
3''	3.48 (1H, <i>dd</i> , 9.1, 8.4)	74.7
4''	3.38 (1H, <i>dd</i> , 8.4, 9.5)	71.2
5''	3.52 (1H, <i>m</i>)	78.3
6'' α	3.91 (1H, <i>dd</i> , 2.09, 12.22)	62.4
6'' β	3.69 (1H, <i>dd</i> , 5.8, 12.22)	

4.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-3

สารประกอบ AH-3 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ข้อมูล FAB-MS แสดง $[M+H]^+$ ที่ m/z 610 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{30}O_{16}$ จากข้อมูลของ 1H NMR แสดงให้เห็นส่วน ABX coupling type protons ของ H-2', H-5' และ H-6' ที่ δ 7.65 ($J=2.1$ Hz), 6.86 ($J=8.55$ Hz) และ 7.61 ($J=8.55, 2.1$ Hz) ppm ตามลำดับ ส่วน H-6 และ H-8 ที่ δ 6.20 และ 6.39 ppm และมีค่า coupling constant (J) เท่ากับ 1.9 Hz เมื่อนำข้อมูลมาประกอบกันพบว่าคล้ายกับ aglycone ของ AH-1 นั่นคือมี quercetin แต่ส่วนของน้ำตาลแสดงค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 5.08 (H-1''), 3.30 (H-2''), 3.45 (H-3''), 3.25 (H-4''), 3.38 (H-5''), 3.36 และ 3.78 (H-6'') ppm แสดงถึงการมี glucose ในสูตรโครงสร้าง และจาก ค่า coupling constant ระหว่าง H-1'' และ H-2'' ($J=7.6$ Hz) แสดงให้เห็นถึง β -configuration ของ glucopyranose ส่วนของน้ำตาลอีก 1 โมเลกุลเมื่อพิจารณาค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 4.51 (H-1'''), 3.62 (H-2'''), 3.52 (H-3'''), 3.29 (H-4'''), 3.43 (H-5'''), 1.10 (CH_3-6''') ppm แสดงถึงการมี rhamnopyranose ในสูตรโครงสร้าง จาก ค่า coupling constant ระหว่าง H-1''' และ H-2''' ($J=1.52$ Hz) แสดงให้เห็นถึง α -configuration ของ rhamnopyranoside จากการศึกษา HMBC spectrum ยืนยันตำแหน่งที่น้ำตาล glucose เกาะที่ตำแหน่ง C-3 ของ quercetin โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-1'' (δ_H 5.08 ppm) กับ C-3 (δ_C 135.6 ppm) ส่วนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาล rhamnopyranose เกาะที่ตำแหน่ง 6 ของ glucopyranose โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-6'' (δ_H 3.36 และ 3.78 ppm) กับ C-1''' (δ_C 102.4 ppm) ตำแหน่ง carbons และ protons ที่เหลือทั้งหมดยืนยันด้วย HSQC และ HMBC spectra ดังนั้นสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-3 ได้ว่าเป็นสาร quercetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (82) (Abdullah et al, 2008)



เอกลักษณ์ทางสเปคโตรเมทรีของสารประกอบ AH-3

FABMS: m/z (%) 611 ($[M+H]^+$, 1), 324 (35), 132 (70), 114 (100)

^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4): แสดงในตาราง 5

^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4): แสดงในตาราง 5

ตาราง 5 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound AH-3 in methanol- d_4

Position	^1H δ (ppm), J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2		149.7
3		135.6
4		179.3
5		162.9
6	6.20 (1H, <i>d</i> , 1.9)	99.9
7		166.0
8	6.39 (1H, <i>d</i> , 1.9)	94.8
9		158.4
10		105.5
1'		123.1
2'	7.65 (1H, <i>d</i> , 2.1)	117.6
3'		145.8
4'		159.3
5'	6.86 (1H, <i>d</i> , 8.55)	116.0
6'	7.61 (1H, <i>dd</i> , 8.55, 2.1)	123.5
1''	5.08 (1H, <i>d</i> , 7.6)	104.7
2''	3.30 (1H, <i>m</i>)	77.1
3''	3.45 (1H, <i>d</i> , 7.79)	75.7
4''	3.25 (1H, <i>m</i>)	71.3
5''	3.38	78.1
6'' $_{\alpha}$	3.78 ((1H, <i>dd</i> , 11.3, 1.37)	68.5
6'' $_{\beta}$	3.36 (1H, <i>d</i> , 11.3)	

ตาราง 5 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound AH-3 in methanol- d_4 (ต่อ)

1'''	4.51 (1H, <i>d</i> , 1.52)	102.4
2'''	3.62 (1H, <i>dd</i> , 1.52, 3.36)	72.0
3'''	3.52 (1H, <i>dd</i> , 3.36, 9.62)	72.2
4'''	3.29 (1H, <i>m</i>)	73.9
5'''	3.43 (1H, <i>dd</i> , 8.4, 6.2)	69.7
CH ₃ -6'''	1.10 (3H, <i>d</i> , 6.2)	17.8

4.5 ผลการทดสอบและการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร AH-1, AH-2, AH-3

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของสาร AH-1, AH-2, AH-3พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ได้ดีที่สุดคือ สารประกอบ AH-2 ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงในตารางที่ 7

จากผลการศึกษาพบว่าสารประกอบทั้ง 3 ชนิดเป็นสารกลุ่ม flavonoids โดยที่สารประกอบ AH-1 และ AH-3 มีส่วน aglycone เป็น flavonol แต่สารประกอบ AH-2 ส่วน aglycone เป็น flavone AH-1 และ AH-3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสารประกอบ AH-2 เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างเคมีกับการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด พบว่าส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ flavonoids จะอยู่ที่การมี 3',4'-ortho-dihydroxy ของ ring B ซึ่งจะพบในสารประกอบ AH-1 และ AH-3 แต่สารประกอบ AH-2 มีเพียง 4'-hydroxy บน ring B จึงทำให้สารประกอบมีฤทธิ์ไม่ดีเท่าสารประกอบ AH-1 และ AH-3 ส่วน ring A ไม่ค่อยมีผลต่อการออกฤทธิ์ ดังนั้นการมีน้ำตาลแทนที่อยู่ที่ตำแหน่งที่ 7 จึงไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ AH-2 (Rice-Evan et al, 1997)

ตาราง 6 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร AH-1, AH-2, AH-3

สารประกอบ	Concentration (mg/ml)	% DPPH scavenging activity (Mean \pm SD)	IC ₅₀ (μ M)
AH-1	0.001	2.16 \pm 2.75	13.39
	0.01	10.84 \pm 3.64	
	0.1	58.50 \pm 1.78	
	1.00	96.54 \pm 0.88	
AH-2	0.001	0.85 \pm 0.00	687.5
	0.01	1.63 \pm 0.09	
	0.1	5.40 \pm 1.16	
	1.00	35.37 \pm 1.05	
AH-3	0.001	53.29 \pm 1.07	11.25
	0.01	55.69 \pm 1.08	
	0.1	58.49 \pm 6.86	
	1.00	96.54 \pm 0.88	
Ascorbic acid	0.001	9.46 \pm 2.68	17.98
	0.01	10.79 \pm 2.73	
	0.1	97.91 \pm 0.17	
	1.00	99.27 \pm 0.13	

4.6 ผลการทดสอบและการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของสาร AH-1, AH-2, AH-3

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของสาร AH-1, AH-2, AH-3พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ได้ดีที่สุดคือ สารประกอบ AH-2 ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงในตารางที่ 7

สมมติฐานของกลไกหนึ่งของการออกฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของ flavonoids เนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase พบว่าสาร AH-2 ออกฤทธิ์ดีกว่าสาร AH-1 และ AH-3 เล็กน้อย ถึงแม้สารประกอบ AH-1 และ AH-3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารประกอบ AH-2 อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการมีจำนวนโมเลกุลของน้ำตาล และตำแหน่งที่แทนที่บน aglycone ที่ต่างกัน โดยที่ AH-1 และ AH-3 จะเป็น 3-O-diglycoside ส่วนสารประกอบ AH-2 จะเป็น 7-O-glycoside ซึ่งตำแหน่งการแทนที่และจำนวนโมเลกุลน้ำตาลอาจจะส่งผลกระทบต่อผลของการเข้าจับกับ active site ของ tyrosinase ดังนั้นนอกจากสมมติฐานกลไกการออกฤทธิ์

ยับยั้ง tyrosinase ของ flavonoids ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังอาจจะออกฤทธิ์ผ่านกลไกการอื่นๆ เช่น การเป็น substrate ของ enzyme (No et al. 1999)

ตาราง 7 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง ไทโรซิเนสของสาร AH-1, AH-2, AH-3

สารประกอบ	Concentration (mg/ml)	% Tyrosinase inhibitory activity (Mean \pm SD)	IC ₅₀ (μ M)
AH-1	0.001	3.10 \pm 2.28	38.52
	0.01	9.30 \pm 4.96	
	0.1	14.49 \pm 3.08	
	1.00	41.79 \pm 13.18	
AH-2	0.001	5.13 \pm 7.41	23.15
	0.01	15.37 \pm 3.44	
	0.1	32.02 \pm 4.17	
	1.00	43.18 \pm 7.23	
AH-3	0.001	8.31 \pm 7.93	42.91
	0.01	5.46 \pm 2.95	
	0.1	18.37 \pm 4.35	
	1.00	40.64 \pm 2.96	
Kojic acid	0.0005	42.66 \pm 2.05	1.97
	0.005	68.87 \pm 4.14	
	0.05	78.51 \pm 1.38	
	0.5	90.05 \pm 0.8	