สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รหัสโครงการ 38142

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การค้นหาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ และต้านไทโรซิเนสจากใบว่านสาวหลง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา
และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

BK0155034
BK0155034
10 มี.ค. 2560
369340
เริ่มบริการ
18 เม.ย. 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเคมี และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก งานสวนพฤกษศาสตร์ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา สำหรับการอนุเคราะห์พืชตัวอย่าง ขอขอบคุณ ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตรสำหรับการระบุชนิดพืช สุดท้ายขอขอบคุณนางสาวเยาวลักษณ์ เจริญสุข นิสิตคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

บทคัดย่อ

ว่านสาวหลง (*Amomum biflorum* Jack) เป็นพืชที่ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง งานวิจัยนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านการอักเสบของส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง ทำการแยกสารจากใบพืชโดยวิธีฤทธิ์ทางชีวภาพนำการสกัด งานวิจัยนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลของใบว่านสาวหลง โดยทำการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล 2,2-Diphenyl-1-picrylhdrazyl (DPPH) อนุมูลไฮดรอกซี และซุปเปอร์ออกไซด์ ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์และความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ จากการทดสอบพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH และอนุมูลไฮดรอกซี รวมทั้งมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด ในขณะที่ส่วนสกัดเมทานอลของใบว่านสาวหลงมีความสามารถในการคีเลทไอออนสูงที่สุด และเมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าส่วนสกัดเมทานอลจากใบว่านสาวหลงสามารถต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบทำในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่สัมผัสกับ LPS ส่วนสกัดเมทานอลของใบว่านสาวหลงมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ สารออกฤทธิ์ที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอล คือ (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ดังนั้นสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ที่แยกได้จากใบว่านสาวหลงนี้อาจนำไปใช้เป็นสารทำให้ผิวขาว หรือเป็นสารนำในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

คำสำคัญ : ใบว่านสาวหลง, สารต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Abstract

Amomum biflorum Jack. (Zingiberaceae) commonly known as Wan sao long in Thai, which are commonly used in cosmetic products in Thailand. The aim of this study was to evaluate the antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities of various extracts from leaves of *A. biflorum*. The active compound was isolated by bioactivity-guided isolation from the plant leaves. In this study, the antioxidant activities of hexane, ethyl acetate and methanol extracts from leaves of *Amomum biflorum* Jack. were evaluated by various antioxidant activity assays including 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radical scavenging, reducing power and ferrous-ion chelating. The ethyl acetate extract showed the highest DPPH and hydroxyl radical scavenging activities as well as reducing power. Whereas, the methanol extract contained the most ferrous-ion chelating activity. Methanol extract also exhibited the most potent in anti-tyrosinase activity. Anti-inflammatory activity assay was performed in lipopolysaccharide (LPS)-exposed RAW 264.7 macrophages. Methanol extract of *A. biflorum* leaves showed the most potent inhibitory effect on LPS-induced nitric oxide (NO) production in macrophages. The active compound (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene was isolated from the methanol extract and exhibited significant inhibition of tyrosinase activity. It also inhibited nitric oxide production in a dose-dependent manner. Therefore, (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from *A. biflorum* might be useful as a skin-whitening agent in cosmetics and a leading compound for treating inflammation related diseases.

Keywords: *Amomum biflorum* leaves, antioxidant, anti-tyrosinase activity, anti-inflammatory activity

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อ	4
ABSTRACT	5
บทนำ	9
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลอง	22
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	34
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	37
ผลผลิต	38
บรรณานุกรม	41
ภาคผนวก	44
ประวัตินักวิจัย	56

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	แสดงน้ำหนักและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง	23
ตารางที่ 3-2	แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง	24
ตารางที่ 3-3	การยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ LPS โดยส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง	25
ตารางที่ 3-4	แสดงน้ำหนัก และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลจากใบว่าสาวหลง	26
ตารางที่ 3-5	แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดย่อย MFr1-MFr8	27
ตารางที่ 3-6	การยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ LPS โดยส่วนสกัดย่อย MFr1-MFr8	28
ตารางที่ 3-7	การยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ LPS โดยส่วนสกัดย่อย MFr4.1-MFr4.11	29
ตารางที่ 3-8	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene	30

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 3-1	แผนภาพการทำบริสุทธิ์สารจากส่วนสกัดเมทานอลของใบว่านสาวหลง	28
รูปที่ 3-2	โครงสร้างทางเคมีของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene	28
รูปที่ 3--3	เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS	31
รูปที่ 3-4	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนูที่สัมผัสกับสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ที่ความเข้มข้นต่างๆ	31
รูปที่ 3-5	กราฟ Lineweaver–Burk ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในการออกซิเดชัน L-DOPA ที่ pH 6.8 ของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene	32
รูปที่ 3-6	การวิเคราะห์ค่า K_i ของการยับยั้งแบบแข่งขันจากกราฟที่พลอตระหว่างค่าความชันที่ได้จากกราฟ Lineweaver–Burk กับความเข้มข้นของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene	33

บทที่ 1
บทนำ

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

พืชวงศ์ขิงข่า (Zingiberaceae) เป็นพืชล้มลุก มีลำต้นใต้ดินมีลักษณะเป็นเหง้า พบได้ทั่วโลก ประมาณ 1000 ชนิด แต่ที่มีการศึกษาโดยปราโมทย์ ไตรบุญ และคณะ (2548) พบว่าในประเทศไทยพืชวงศ์ขิงข่า อยู่ประมาณ 50 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นพืชถิ่นเดียวของประเทศ 18 ชนิด เป็นพืชที่มีการรายงานเป็นครั้งแรก 11 ชนิด และคาดว่าเป็นพืชชนิดใหม่ของโลก 8 แทกซา และเป็นพืชปลูกเพื่อเป็นเครื่องเทศและสมุนไพรที่ใช้อย่างแพร่หลาย 3 ชนิดคือ ไพล (*Zingiber montanum*) ขิง (*Zingiber officinale*) และไพลดำ (*Zingiber ottensii*) พืชในพืชวงศ์ขิงข่า กระจายพันธุ์ได้ทั่วทั้งประเทศ ในนิเวศของป่าหลายแบบตั้งแต่ความสูงจากระดับน้ำทะเลจนถึงที่ระดับ 2,000 เมตร บางชนิดเป็นพืชหายากและมีความจำเพาะต่อลักษณะวิสัย เช่น ขิงขน (*Zingiber idea*) ซึ่งพบได้ในป่าไผ่แบบผสมใกล้ภูเขาหินปูนในภาคตะวันตก บางชนิดมีการกระจายพันธุ์กว้าง เช่น กระทือ (*Zingiber zerumbet*) พบได้ในป่าดิบแล้ง ตั้งแต่ความสูงจากระดับน้ำทะเลจนถึงที่ระดับประมาณ 1,300 เมตร บางชนิดพบได้ง่าย เช่น ขิงแม่โขง (*Z. mekongense* Gagnep.) พบในบริเวณป่าดิบแล้งในภาคตะวันออกเฉียงใต้

ว่านสาวหลง (*Amomum biflorum* Jack) เป็นต้นไม้ในตระกูล Zingiberaceae มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก มีลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว มีขนนุ่มปกคลุมทั้งสองด้าน ดอกช่อ สีขาว กลีบปากสีเหลือง เป็นพืชสมุนไพรในตำรายาไทยโบราณ ใช้เป็นส่วนประกอบของยาบำรุงร่างกาย และใช้ในการปรุงเครื่องสำอางและเครื่องหอม ทุกส่วนของว่านสาวหลงมีกลิ่นหอม (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550) ในปี พ.ศ. 2547 ศิรินันท์ ทับทิมเทศ และคณะ สกัดน้ำมันหอมระเหยจากทุกส่วนของว่านสาวหลงโดยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ ได้น้ำมันสีเหลืองอ่อนมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว พบว่าน้ำมันหอมระเหยของว่านสาวหลงมีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางของหนูทำให้หนูมีการเคลื่อนที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและมีฤทธิ์เทียบเท่ากับน้ำมันลาเวนเดอร์ ต่อมา พ.ศ. 2550 จักรพันธ์ จุลศรีไกวัล และคณะได้รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบ ลำต้นใต้ดิน และก้านใบของว่านสาวหลง เมื่อเร็วๆ นี้ กล่าวขวัญ ศรีสุขและคณะ (2553) พบว่าส่วนสกัดจากลำต้นใต้ดินของว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง

รายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์หลายฉบับที่แสดงถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการป้องกันและลดการดำเนินไปของโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับภาวะความเครียดจากออกซิเดชัน รวมทั้งช่วยชะลอกระบวนการบางขั้นตอนที่ทำให้เกิดความแก่ รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พืชพื้นบ้านของไทยหลายชนิดรวมทั้งพืชวงศ์ขิงข่า เช่น ขิง ข่า กระวาน ขมิ้นและไพล ได้ถูกพิสูจน์พบว่าประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส อาทิ ปี

2002 Mau และคณะ ศึกษาส่วนประกอบและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นอ้อย *(Curcuma zedoaria* (Berg.) Rosc. พืชในวงศ์ขิงข่า สกัดน้ำมันหอมระเหยจากลำต้นใต้ดินของขมิ้นอ้อยโดยใช้วิธีกลั่นด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลายและแยกส่วนด้วย ซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารประกอบทั้งหมด 36 ชนิด ประกอบด้วยเทอพีน 17 ชนิด แอลกอฮอล์ 13 ชนิด และคีโตน 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 20 mg/ml ของน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นอ้อยมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้ดี ซึ่งสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการการตอบสนองการต้านออกซิเดชันที่ดีคือ 5-isopropylidene-3,8-dimethyl-1(5H)-azulenone

รัชนก เชื้อเตชะ และคณะ (2549) ศึกษาการสกัดสารที่สำคัญจากส่วนเหง้า ลำต้น และใบของพืชสมุนไพรหน่อกะลา (*Alpinia nigra* B.L. Burtt) ในวงศ์ขิงข่า โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่ามีสมบัติในการต้านออกซิเดชันโดยวิธีบีต้า-แคโรทีน/กรดลิโนเลอิกพบว่า สารสกัดจากส่วนใบและลำต้นแสดงสมบัติในการต้านออกซิเดชันสูงสุด โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 12.52 และ 13.26 µg/mL ตามลำดับ และสารสกัดจากส่วนใบให้สมบัติในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงกว่าส่วนสกัดจากส่วนอื่นๆ และยังให้สมบัติดังกล่าวสูงกว่าสารสกัดจากข่า โดยให้ค่า SC_{50} เท่ากับ 0.136 mg/mL

Chan และคณะ (2007) แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดจากใบของพืชจีนัส Etlinger ที่เก็บจากประเทศมาเลเซีย ประกอบด้วย กาหลา (*E. elatior*) กาหลาหอม (*E. fulgens*) ปุดคางคก (*E. littoralis*) ปุดยนแดง (*E.maingayi*) และปุดใบลาย (*E.rubrostriata*) พืชกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อเร็วๆนี้ Chen และคณะ (2008) ยังรายงานฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH และทดสอบ reducing power ของส่วนสกัดเมธานอลของพืชวงศ์ขิงข่าจำนวน 18 ชนิดที่เก็บได้ในประเทศไต้หวัน และส่วนสกัดจากลำต้นใต้ดินนี้ยังสามารถต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของพืชวงศ์ขิงข่า โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีของผิวหนัง สารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงมีศักยภาพในการนำไปทำเป็นสารทำให้ขาว (whitening agent) ที่ปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค Kuo และคณะ (2005) สกัดแยกสาร zingerone and dehydrozingerone ได้จากลำต้นใต้ดินของขิง (*Z.officinale*) และพบว่าสารเหล่านี้ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ถัดมาในปี 2007 มีการรายงานว่า flavonoid mixture และ galangin ที่สกัดได้จาก *Alpinia officinarum* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ขิงข่า สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับหลอดทดลอง และในเซลล์ B 16 mouse melanoma cells (Lu และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากส่วนสกัดจากพืชวงศ์ขิงข่า เช่น Chan และคณะ (2008) พบว่าส่วนสกัดจากใบของพืชวงศ์ขิงข่า จีนัส Etlinger ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ในระดับ 22-55%

ส่วนสกัดจากส่วนต่างๆของพืชในวงศ์ Zingiberaceae สามารถต้านการอักเสบในแบบจำลองเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง อาทิ ในปี 2004, Imanishi และคณะ รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วน

สกัดลำต้นใต้ดินของ *Zingiber offifinale* ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยสารสกัดสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS โดยผ่านกลไกที่ทำให้ปริมาณ mRNA ของ iNOS

Matsuda และคณะ (2006) รายงานผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจจากช่องท้องของหนูที่สัมผัสกับ LPS ของส่วนสกัดย่อย ethyl acetate ของลำต้นใต้ดินของกระชาย (*Alpinia officinarum*) และยังสกัดสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดดังกล่าวที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ เช่น galangin และ diarylheptanoid ในปีเดียวกันนี้มีรายงานจากนักวิจัยไทย พบว่าส่วนสกัด hexane ของลำต้นใต้ดินของว่านชักมดลูกตัวเมีย (*Curcuma comosa*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย สามารถการการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ microglia ของหนู ที่สัมผัสกับ LPS เนื่องจากการลดการแสดงออกของยีน iNOS นอกจากนี้ยังมีผลลดการผลิต proinflammatory cytokine MCP-1 และ IL-6 (Jantaranotai, 2006)

Tewtrakul และ Subhadhirasakul, (2008) รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำของลำต้นใต้ดินของพืชในวงศ์ Zingiberaceae 5 ชนิด คือ กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) ขมิ้นขาว (*Curcuma mangga*) เปราะหอม (*Kaempferia galanga*) กระทือ (*Zingiber zerumbet*) และขิง (*Zingiber officinale*) พบว่าส่วนสกัดสามารถยับยั้งการหลั่งของไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด โดยที่ส่วนสกัดจากกระชายดำมีฤทธิ์สูงที่สุด และยังแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิต PGE2 และ TNF-α อีกด้วย (Tewtrakul และ Subhadhirasakul, 2008) ในปี พ.ศ. 2553 มัลลิกา ปาละโชติได้รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดจากลำต้นใต้ดินของพืชในวงศ์ Zingiberaceae 5 ชนิดที่พบมากทางภาคตะวันออกของไทย ได้แก่ ว่านสาวหลง (*A. biflorum*) เร่วหอม (*Etlingera pavieana*) กระทือป่า (*Zingiber thorelli*) ขิงแม่โขง (*Zingiber makongense*) และว่านริดสีดวง (Curcuma sp.) ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS จากรายงานการวิจัยต่างๆพบว่าการศึกษามุ่งเน้นไปที่ส่วนลำต้นใต้ดินซึ่งเป็นส่วนที่มักถูกนำมาใช้ประโยชน์ของพืชวงศ์ Zingiberaceae อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานทางด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของใบจากพืชวงศ์นี้ โดยเฉพาะใบว่านสาวหลง

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ยาเป็นหนึ่งในปัจจัยสี่ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์เรา ในสมัยเริ่มแรกมนุษย์รู้จักนำเอาวัตถุธรรมชาติที่อยู่ใกล้ตัวมาใช้เป็นยารักษาโรค ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่นำมาใช้เป็นยาเหล่านี้มีทั้งที่ได้จาก พืช สัตว์ และแร่ธาตุ เมื่ออารยธรรมเจริญขึ้น มนุษย์ก็เริ่มรู้จักนำยาสมุนไพรมาแปรสภาพเพื่อให้ง่ายแก่การใช้ เช่น นำมาต้ม ตำ ฝน บด เป็นต้น ต่อมาเมื่อวิทยาการต่างๆ ก้าวหน้าขึ้น จึงได้มีการแยกตัวยาสำคัญจากสมุนไพร มาใช้เป็นยาแทนการใช้ยาจากส่วนสกัดหยาบ แม้ว่าปัจจุบันจะมีการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาเพื่อใช้เป็นยาได้เป็นจำนวนมากแล้วก็ตาม แต่ตัวยาสำคัญๆ หลายชนิดก็ยังได้

จากการสกัดจากพืชสมุนไพร นอกจากจะเป็นแหล่งทางธรรมชาติของตัวยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมากมายหลายชนิดแล้ว พืชสมุนไพรยังเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบเคมีจำนวนมหาศาลที่อาจมีประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ และอุตสาหกรรม ดังจะเห็นได้จากโครงการสำรวจพืชเพื่อหาสารต้านมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นผลทำให้มีการค้นพบสารต้านการเกิดเนื้องอกและมะเร็ง ที่ได้จากพืชเป็นจำนวนหลายพันชนิด นอกจาก นี้ยังมีการสำรวจพืชเพื่อหาสารต้านแบคทีเรีย สารต้านมาลาเรีย และสารต้านไวรัสชนิดต่างๆ

ในปัจจุบันยาจากสมุนไพร (Phytopharmaceuticals หรือ Herbal drugs) ซึ่งเป็นยาจากสมุนไพรรักษาโรค เตรียมได้จากสารสกัดจากพืชได้กลายเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการรักษาสุขภาพภายใต้แนวความคิดของการพัฒนาอย่างยั่งยืนและใช้ทรัพยากรอย่างระมัดระวัง หลายคนที่หันมาบริโภคยาสมุนไพรก็เพราะค้นพบว่า มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ และไม่มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพมากนัก อีกทั้งราคาก็ถูกกว่ายาแผนปัจจุบันอย่างมาก แม้แต่หน่วยงานของรัฐฯ เช่น องค์การเภสัชกรรมก็ได้ริเริ่มผลิตยาจากสมุนไพรออกมาจำหน่ายเอง แต่อย่างไรก็ตามปัญหาอย่างหนึ่งของการพัฒนายาสมุนไพรจากยาแผนโบราณหรือยาพื้นบ้าน คือการขาดข้อมูลที่เป็นผลวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในด้านการวินิจฉัยโรคและการแสดงฤทธิ์ที่จะทำให้ยาสมุนไพรเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรในแง่มุมต่างๆ อาทิ ความรู้เกี่ยวกับองค์ประกอบสำคัญในสมุนไพร การแยกสกัด การหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ และการศึกษากลไกของสารในระดับโมเลกุล จึงมีความสำคัญยิ่งในการศึกษาวิจัยสมุนไพร การพัฒนาการผลิตยาสมุนไพรจะช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศเป็นการประหยัดงบประมาณและอาจนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศได้เพิ่มความสนใจกับยาสมุนไพรไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นซึ่งมีความหลากหลายของพืชสมุนไพรมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก แต่กลับต้องนำเข้ายา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอางจากต่างประเทศเกือบทั้งหมด นับเป็นมูลค่ามหาศาล และเป็นสาเหตุหนึ่งของการเสียดุลทางการค้า เพราะยารักษาโรคเป็นปัจจัยสำคัญในการดำรงชีวิตที่จะขาดไม่ได้ เพื่อความมั่นคงของประเทศและการพัฒนาความเป็นอยู่ของประชาชน ให้สามารถเข้าถึงยารักษาโรคที่ราคาเหมาะสมและสามารถผลิตเองได้ภายในประเทศ จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ทำการวิจัยศึกษาสารประกอบในพืชสมุนไพรที่มีประวัติในการใช้รักษาโรค ได้แก่ ว่านสาวหลง เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันถึงประสิทธิภาพในการรักษา ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรว่านสาวหลง ก่อให้เกิดการพึ่งพาตนเอง และเป็นช่องทางเพิ่มรายได้กับชุมชนอีกทางหนึ่ง

วิถีชีวิตในปัจจุบันพบว่าคนต้องเผชิญกับมลภาวะต่างๆ รวมทั้งรังสีและความร้อนจากแสงแดดมากขึ้น ซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดการเสียสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายอนุมูลอิสระ (free radical) หรือเกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) อนุมูลอิสระนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรคต่างๆ รวมทั้งกระบวนการแก่ การเกิดริ้วรอยก่อนวัย และการอักเสบ (Halliwell และ Gutteridge, 2007) ความร้อนจากแสงแดดยังเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดรอยหมองคล้ำ และฝ้าบนผิวหนัง ดังนั้นใน

อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง จึงมักมีการใส่สารทำให้ผิวขาว (whitening agent) เพื่อยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (melanin biosynthesis) เอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์เมลานิน คือ เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เมลานินเป็นสารสีน้ำตาลที่มีมวลโมเลกุลสูง เป็นเม็ดสีบนผิวหนังของมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ (Kim และ Uyama, 2005) ในการป้องกันการสะสมของเม็ดสีเมลานินสามารถกระทำโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ปัจจุบันนิยมนำสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาผสมในผลิตภัณฑ์ขจัดฝ้าและทำให้ผิวขาว (พัชรี ขุนหลัดและคณะ, 2551) แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดคือ สารที่ใช้มีประสิทธิภาพที่ต่ำ มีความเป็นพิษสูง และการซึมผ่านผิวที่ไม่ดีพอ ตัวอย่างเช่น hydroquinone ซึ่งปัจจุบันสารนี้ถูกห้ามใช้ผสมในเครื่องสำอาง เนื่องจากพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง melanocyte และก่อให้เกิดมะเร็ง (Solano และคณะ, 2006) ทำให้มีแนวคิดในการใช้สารสกัดของสมุนไพรในธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นสารทำให้ผิวขาว และมีสารต้านอนุมูลอิสระผสมอยู่ด้วยกัน เพื่อเป็นสารทำให้ผิวขาวและป้องกันริ้วรอยเหี่ยวย่นอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ และจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีความปลอดภัย เช่น สารสกัดจากหม่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Yu และคณะ, 2006) และต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ และคณะ, 2005) สารประกอบเคอร์คิวมินนอยด์จากผงขมิ้นชันก็มีฤทธิ์ทั้งต้านอนุมูลอิสระ (Portes, 2007) และต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (พัชรี ขุนหลัดและคณะ, 2551)

ว่านสาวหลง (*Amomum biflorum* Jack.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae เป็นสมุนไพรที่ลำต้นใต้ดินมีสรรพคุณบำรุงผิวพรรณ และมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางบางชนิด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550) ส่วนสกัดจากลำต้นใต้ดินของว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553) ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่านอกจากลำต้นใต้ดินของพืชวงศ์ Zingiberaceae จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วใบของพืชวงศ์นี้ยังเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ โดยในปี ค.ศ. 2006 Elzaawely และคณะพบว่าส่วนสกัดจากใบข่าคม (*Alpinia zerumbet* Pers.) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าส่วนลำต้นใต้ดิน และในปี ค.ศ. 2008 Chan และคณะแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดเมทานอลจากใบพืชหลายชนิดในวงศ์ Zingiberacaae มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าส่วนลำต้นใต้ดินเช่นกัน อีกทั้งส่วนสกัดเมทานอลจากใบยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรสซิเนสได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต้านอักเสบ และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของใบว่านสาวหลง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจนำส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลงมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางที่ปลอดภัยต่อไป และลดการนำเข้าสารเคมีและเครื่องสำอางจากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารสกัดจากใบว่านสาวหลง ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

2. เพื่อแยกสกัดสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ หรือมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง
3. เพื่อพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ หรือมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เก็บใบว่านสาวหลง จากงานสวนพฤกษศาสตร์ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา นำตัวอย่างมาอบแห้งมาสกัดด้วย เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล ตามลำดับ จากนั้นนำสารที่สกัดได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง และทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ซึ่งเป็นการจำลองเหตุการณ์การอักเสบในหลอดทดลอง และนำส่วนสกัดแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส หรือต้านการอักเสบในลักษณะ activity-guided isolation

ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) จะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ มีการผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณมาก ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมคโครฟาจ ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin ของแบคทีเรีย หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางของการอักเสบที่สำคัญที่ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS พบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดอาการของโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้อเสื่อม โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease)โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ เป็นต้น สารจากพืชสมุนไพรเป็น

ทางเลือกที่สำคัญ ในการได้มาของสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง และป้องกันการหลั่งสารที่ทำให้เกิดการอักเสบเหล่านี้ ทั้งในแง่ของการรักษาชีวิตผู้ป่วย และการป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากการอักเสบแบบเรื้อรัง โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบว่านสาวหลงที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อให้ได้สารต้านการอักเสบทั้งในรูปสารสกัดและสารบริสุทธิ์ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆเหล่านี้ต่อไป รวมทั้งข้อมูลที่ได้จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้ใบว่านสาวหลง เพื่อลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศและทำให้สังคมไทยสามารถดำเนินตามพระราชดำรัสในการใช้ชีวิตแบบเศรษฐกิจพอเพียง

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเกี่ยวกับผิวหนังส่วนมาก มีการใส่สารทำให้ผิวขาว (whitening agent) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) หรือ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า polyphenol oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยา สองปฏิกิริยาในวิถีการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (melanin biosynthesis) คือ ปฏิกิริยา hydroxylation ของ monophenol ให้ได้เป็น o-phenol และ ปฏิกิริยา oxidation ของ o-phenol ให้เป็น o-quinone ซึ่ง quinone ที่เกิดขึ้นนี้จะมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง และเกิดการ polymerization ให้ได้เป็นสารสีน้ำตาลที่มีมวลโมเลกุลสูง หรือ เมลานิน (melanin) ที่เป็นเม็ดสีบนผิวหนังของมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ มีโรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง เช่นไฝ ฝ้ามีสาเหตุมาจากการสะสมของเม็ดสีที่มากเกินไป ในการป้องกันการสะสมของเม็ดสีสามารถกระทำโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดคือ มีประสิทธิภาพที่ต่ำ มีความเป็นพิษสูง และการซึมผ่านผิวที่ไม่ดีพอ ตัวอย่างเช่น hydroquinone ใช้โดยทั่วไปเป็นสารทำให้ผิวขาวกระจ่างใส แต่ก็เป็นสารที่ทดสอบพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง melanocyte และก่อให้เกิดมะเร็ง เพื่อแก้ไขปัญหาในข้อจำกัดเหล่านี้ ทำให้มีแนวคิดในการใช้สารสกัดของสมุนไพรในธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นสารทำให้ผิวขาว (whitening agent) และมีสารต้านอนุมูลอิสระ ผสมอยู่ด้วยกัน เพื่อเป็นสารทำให้ผิวขาวและป้องกันริ้วรอยเหี่ยวย่นอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ และจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีความปลอดภัย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำใบว่านสาวหลงสมุนไพรไทยที่มีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมเป็นเครื่องสำอางบางชนิด มาสกัดและทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อนำไปสู่การพัฒนาให้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางที่ปลอดภัยต่อไป และลดการนำเข้าสารเคมีและเครื่องสำอางจากต่างประเทศ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ต้านการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านการอักเสบของใบว่านสาวหลงจะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาของใบว่านสาวหลง หรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ได้จากใบว่านสาวหลง และนำข้อมูลที่ได้

ไปตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวารสารวิชาการเป็นการสร้างชื่อเสียงให้แก่ประเทศไทย เป็นพื้นฐานและองค์ความรู้ที่สามารถนำไปต่อยอด และผลิตเป็นยาชนิดใหม่ได้

องค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการสกัดสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ต้านการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านการอักเสบของใบว่านสาวหลงจะสามารถนำไปเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนคุณค่าทางยาสมุนไพรเหล่านี้ เพื่อส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกและอนุรักษ์สมุนไพรเหล่านี้มากขึ้นมากขึ้น โดยทำการเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่นรายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ รวมทั้งข้อมูลที่ได้จะถูกนำเผยแพร่

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

1.การเตรียมส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง

นำใบว่านสาวหลง ที่ได้จากสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก งานสวนพฤกษศาสตร์ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา มาล้างน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นนำมาหั่นบางๆ และนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียด นำใบว่านสาวหลงบดละเอียด 1000 กรัมมาสกัดด้วยเฮกเซน 10 ลิตร เป็นเวลา 5 วัน จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำผงว่านสาวหลงมาสกัดต่อด้วยเอทิลอะซีเตท และเมทานอล ตามลำดับ ก่อนนำส่วนสกัดที่ได้มาทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) และปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสงเพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป

2. การแยกสารจากส่วนสกัดเมทานอลจากใบว่านสาวหลงโดยคอลัมน์โครมาโท กราฟี

แยกส่วนสกัดเมทานอลจากใบว่านสาวหลงโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel 60 เป็นเฟสคงที่ silica gel ถูกแช่ด้วยตัวทำละลาย 50%ไดคลอโรมีเทน/เฮกเซน จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในคอลัมน์ นำส่วนสกัดเมทานอลจากใบว่านสาวหลงมา 25 กรัม ละลายในตัวทำละลายเมทานอลจนส่วนสกัดละลายหมดแล้วผสมกับ silica gel ผสมให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำสารไประเหยตัวทำละลายเมทานอลที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนและเครื่องปั๊มสุญญากาศ แล้วนำ silica gel ไปบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบน และปรับผิวให้เรียบแยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ ไดคลอโรมีเทน : เฮกเซน ที่ 50 : 50 (1 ลิตร) ตามด้วย เริ่มชะสารที่ 100 : 0 (2 ลิตร), 99 : 1 (3 ลิตร), 98 : 2 (3 ลิตร), 95 : 5 (3 ลิตร), 90 : 10 (3 ลิตร), 80 : 20 (3 ลิตร), 50 : 50 (3 ลิตร), 30 : 70 (2 ลิตร) และ 0 : 100 (1.5 ลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 8 ส่วนสกัดย่อย (MFr1-MFr8) จากส่วนสกัดเมทานอลจากใบว่านสาวหลง แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป

นำส่วนสกัดย่อย MFr1 และ MFr2 มารวมกัน และแยกสารโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel 60 เป็นเฟสคงที่ สารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ 100% ไดคลอโรมีเทน ได้สาร MFr1+2

นำส่วนสกัดย่อย MFr4 แยกสารโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel 60 เป็นเฟสคงที่ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ เอทิลอะซีเตท : เฮกเซน ในระบบ gradient elution คือ เริ่มชะสารที่15 : 85 (2 ลิตร), 20 : 80 (2 ลิตร), 25 : 75 (1 ลิตร), 30 : 70 (1 ลิตร), 35 : 65 (1 ลิตร), 40 : 60 (1 ลิตร), 50 : 50 (1 ลิตร), 70 : 30 (1 ลิตร), 100 : 0 (1 ลิตร) และตามด้วย เมทานอล : เอทิลอะซีเตท 5 : 95 (2 ลิตร), 10 : 90 (1 ลิตร), 20 : 80 (1 ลิตร) และ 50 : 50 (2 ลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 11 ส่วนสกัดย่อย (MFr4.1-MFr4.11)

นำส่วนสกัดย่อย MFr4.7 และแยกสารโดย HPLC ใช้คอลัมน์ C18 (4.6mm × 250mm i.d., 5 μm; nacalai tesque, U.S.A.) และ UV detector (ที่ A 220 nm) แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ isocratic elution คือ 30% อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ และแยกสารได้สาร MFr4.7.1

นำส่วนสกัดย่อย MFr7 แยกสารโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel 60 เป็นเฟสคงที่ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในระบบ gradient elution คือ เริ่มชะสารที่ 50 : 50 (1 ลิตร), 80 : 20 (2 ลิตร), 100 : 0 (2 ลิตร), 99.5 : 0.5 (2 ลิตร), 99 : 1 (2 ลิตร), 98 : 2 (3 ลิตร), 95 : 5 (3 ลิตร), 90 : 10 (3 ลิตร), 80 : 20 (3 ลิตร), 50 : 50 (3 ลิตร) และ 70 : 30 (3 ลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 7 ส่วนสกัดย่อย (MFr7.1-MFr7.7)

นำส่วนสกัดย่อย MFr7.5 และ MFr7.6 มารวมกัน และแยกสารโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel 60 เป็นเฟสคงที่ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในระบบ gradient elution คือ เริ่มชะสารที่ 50 : 50 (1 ลิตร), 80 : 20 (2 ลิตร), 100 : 0 (3 ลิตร), 99.5 : 0.5 (2 ลิตร), 99 : 1 (3 ลิตร), 98 : 2 (3 ลิตร), 95 : 5 (3 ลิตร), 90 : 10 (3 ลิตร), 80 : 20 (3 ลิตร), 70 : 30 (3 ลิตร), 60 : 40 (3 ลิตร), 50 : 50 (3 ลิตร) และ 30 : 70 (3 ลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 7 ส่วนสกัดย่อย (MFr7.5+7.6-1- MFr7.5+7.6-7)

นำส่วนสกัดย่อย MFr7.5+7.6-6 และแยกสารโดย HPLC ใช้คอลัมน์ Lichrocart 250-4 C18 (4.6mm × 250mm i.d., 5 μm; Merck, Germany) และ UV detector (ที่ A 220 nm) แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ isocratic elution คือ 30% อะซีโตไนไตรล์ในน้ำ และแยกสารได้สาร MFr7.5+7.6-6-1

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบของส่วนสกัด

3.1 การเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธ์ RAW 264.7

เลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจสายพันธ์ RAW 264.7 ใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ซึ่งมี 100 U/ml penicillin,100 μg/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine, 25 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate และ 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 %

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์นั้นทดสอบโดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเอนไซม์ succinate dehydrogenase ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสาร tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้เป็นสาร formazan ซึ่งปริมาณสาร formazan ที่เกิดขึ้นนี้มีสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตโดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำสารที่สกัดและสารบริสุทธิ์ที่ได้มาละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS ใน DMEM) ให้มีความเข้มข้นต่างๆ พร้อมทั้งใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดใส่สารละลาย MTT แล้วนำกลับไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นละลายสาร formazan ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Srisook และ Cha, 2004) แสดงผลในรูปร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งคำนวณจาก (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารทดสอบ/ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ) X 100

3.3 การวิเคราะห์แอคทีวิตีของเอนไซม์ iNOS

ไนไตรท์ (nitrite) เกิดจากการออกซิเดชั่นไนตริกออกไซด์ ที่ผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (10 % FBS ใน DMEM) เป็นดัชนีที่บ่งชี้แอคทีวิตีของเอนไซม์ iNOS ปริมาณไนไตรท์ทดสอบได้โดยปฏิกิริยา Griess โดยมีวิธีการโดยย่อดังนี้ นำสารที่สกัดและสารบริสุทธิ์ที่ได้มาละลายใน DMSO แล้วผสมสารลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ พร้อมทั้งใส่ LPS และเลี้ยงเซลล์ ในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และนำอาหารเลี้ยงเซลล์นี้จำนวน 100 μl ผสมกับสารละลาย Griess [0.1% *N*-(1-naphtyl)-ethylenediamine and 1% sulfanilamide in 5 % phosphoric acid] จำนวน 100 μl จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตราฐานที่สร้างจาก sodium nitrite (Srisook และ Cha, 2005) ในการทดสอบผลของสารทดสอบต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ จะใช้ยาแก้อักเสบที่ไม่ใช่สารสเตียรอยด์และมีเป้าหมายที่เอนไซม์ iNOS ที่ขายในท้องตลาดเป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารบริสุทธิ์ที่ได้

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัด

4.1 การทดสอบการกำจัดอนุมูล DPPH

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Nagai และคณะ (2005) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้เตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.2 mM ปิเปตส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 50 µL และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µL ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลทนาน 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (microplate reader, VERSAMAX, USA) โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และบีเอทที (BHT) เป็นสารควบคุมแบบบวก ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากสมการ

$$\% \text{ การกำจัดอนุมูล DPPH} = A_a - (A_b - A_c)/A_a \times 100$$

โดยที่ A_a คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ประกอบด้วยเมทานอล และสารละลาย DPPH

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบที่ประกอบด้วยส่วนสกัดและสารละลาย DPPH

A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบที่ประกอบด้วยส่วนสกัดและเมทานอล

4.2 การทดสอบ reducing power

การทดสอบ reducing power หรือ ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay ทำโดยวิธีที่รายงานโดย Chan และคณะ (2007) นำส่วนสกัดปริมาตร 1 mL ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2 M, pH 6.6) ปริมาตร 2.5 mL และสารละลาย 1% $K_3Fe(CN)_6$ ปริมาตร 2.5 mL ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 10% TCA ปริมาตร 2.5 mL เขย่าผสมกันก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 rpm นาน 10 นาที เก็บสารละลายส่วนบนปริมาตร 2.5 mL ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 2.5 mL และสารละลาย 0.1% $FeCl_3$ ปริมาตร 0.5 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท แสดงปริมาณ reducing power ในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิกสมมูล (GAE) ต่อส่วนสกัด 1 กรัม โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.3 การทดสอบฤทธิ์การคีเลท Fe^{2+}

การขจัดโลหะทรานซิชันโดยการใช้คีเลทโลหะ เช่น Fe^{2+} เป็นอีกกลไกที่ใช้ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระทั้งนี้เพราะโลหะทรานซิชันมีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูล โดยปฏิกิริยา Fenton และ Harber Weiss การทดสอบฤทธิ์การคีเลท Fe^{2+} ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Kosem และคณะ (2007) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้ นำส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 200 µL ผสมกับสารละลาย $FeCl_2$ ที่ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 10 µL ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลท จากนั้นเติมสารละลาย ferrozine ที่ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 20 µL จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ช่วงความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้ EDTA เป็นสารควบคุมแบบบวก คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferrozine-Fe^{2+} จากสมการ

$$\% \text{ การคีเลท} = A_a - (A_b - A_c)/A_a \times 100$$

โดยที่ A_a คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วย $FeCl_2$ และ ferrozine

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วย $FeCl_2$, ferrozine และส่วนสกัด

A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ประกอบด้วย $FeCl_2$ และส่วนสกัด

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีของผิวหนัง การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำโดยวิธีที่รายงานโดย กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ (2553) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้ ละลายส่วนสกัดพืชตัวอย่างใน 50 % DMSO นำส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 40 µL ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M, pH 6.8) ปริมาตร 80 µL เอนไซม์ไทโรซิเนส (46 Units/mL) ปริมาตร40 µL ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และจากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA (2.5 mM) ปริมาตร 40 µL ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลท จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้กรดโคจิก (kojic acid) เป็นสารควบคุมแบบบวก ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส} = A_a - (A_b - A_c)/A_a \times 100$$

โดยที่ A_a คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุมที่ใส่ 20 % DMSO แทนส่วนสกัด

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบที่มีส่วนสกัดและเอนไซม์ไทโรซิเนส

A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีส่วนสกัดแต่ไม่มีเอนไซม์ไทโรซิเนส

6. วิธีการทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ และคำนวณค่า IC_{50} โดยการวิเคราะห์แบบถดถอย

บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 การแยกสารจากใบว่านสาวหลง

แยกสารจากใบว่านสาวหลง ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 3 ส่วนสกัด คือ ส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และเมทานอลพบว่า ส่วนสกัดเมทานอล มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด (ดังแสดงในตารางที่ 3-1)

ตารางที่ 3-1 แสดงน้ำหนักและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง

ส่วนสกัด	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
เฮกเซน	26.47	2.65%
เอทิลอะซีเตท	23.52	2.65%
เมทานอล	59.5	5.95%

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง

จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง พบว่าส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทและส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้เคียงกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 3-2 การทดลองถัดไปคือการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองพบว่าส่วนสกัดทุกส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด การทดลองนี้ใช้กรดโคจิกเป็นสารควบคุมแบบบวก

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ตารางที่ 3-2 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง

ส่วนสกัด	IC_{50} inhibition of DPPH (mg/ml)	IC_{50} inhibition of $OH^{\cdot}$(mg/ml)	IC_{50} inhibition of $O_2^{\cdot}$ (mg/ml)	IC_{50} inhibition of Chelate ion (mg/ml)	reducing power (mg of gallic/ g of extract)	IC_{50} inhibition of tyrosinase (mg/ml)
เฮกเซน	1.14 ± 0.03	3.39 ± 0.04	5.18 ± 0.03	5.54 ± 0.02	21.52 ± 0.35	1.78 ± 0.04
เอทิลอะซีเตท	0.37 ± 0.01	1.12 ± 0.02	3.91 ± 0.19	4.71 ± 0.07	35.52 ± 1.15	1.92 ± 0.04
เมทานอล	0.38 ± 0.01	2.81 ± 0.04	2.03 ± 0.13	1.24 ± 0.03	35.80 ± 0.52	1.31 ± 0.01
BHT	0.026 ± 0.66	-	-	-	-	-
Ascorbic acid	0.012 ± 0.19	-	-	-	-	-
Gallic acid	-	0.145 ± 0.00	0.105 ± 0.00	-		-
EDTA	-	-	-	0.021 ± 0.00	-	-
Kojic acid	-	-	-	-	-	0.03 ± 0.31

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย±3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

นอกจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองแล้ว ยังได้นำส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ใกล้เคียงกันในขณะที่ส่วนสกัดเฮกเซน มีฤทธิ์ที่ต่ำกว่าทั้งที่ความเข้มข้น 10 µg/ml และ 50 µg/ml (ตารางที่ 3-3) และส่วนสกัดทั้งหมดไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างจากเซลล์ควบคุม (CON) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% (v/v) DMSO ซึ่งเป็นสารตัวทำละลายส่วนสกัดสำหรับทดสอบพบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างจากเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (ตารางที่ 3-3)

615.19
ว713ก
ส.4

369340

ตารางที่ 3-3 การยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ LPS โดยส่วนสกัดจากใบว่านสาวหลง

	ความเข้มข้น (µg/ml)		ความเข้มข้นไนไตรท์ (µM)	การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (%)	การมีชีวิตรอด (%)
ส่วนสกัด	เฮกเซน	10	12.28 ± 1.59	54.91 ± 1.59*	98.67 ± 1.62
		50	8.21 ± 1.77	69.85 ± 1.77*	96.65 ± 2.71
	เอทิลอะซีเตท	10	10.08 ± 1.70	62.98 ± 1.70*	98.58 ± 2.45
		50	0.81 ± 2.29	97.01 ± 2.29*	100.31 ± 0.54
	เมทานอล	10	7.91 ± 1.20	70.94 ± 1.20*	99.04 ± 1.03
		50	1.36 ± 3.35	94.99 ± 3.35*	100.69 ± 1.73
control			7.74 ± 0.84		100 ± 0.00
LPS			27.23 ± 1.56	0	98.74 ± 0.48
DMSO			9.28 ± 1.15		99.98 ± 2.68

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย±3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ, LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว, DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, *p<0.05 vs CON

3.3 การแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากส่วนสกัดเมทานอลของใบว่านสาวหลง

จากผลการทดสอบในตารางที่ 3-2 และ 3-3 พบว่าส่วนสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพ จึงทำการแยกสารจากส่วนสกัดเมทานอลด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีระบบ gradient elution และวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค TLC ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 8 ส่วนสกัด (MFr1-MFr8) ในตารางที่ 3-4 แสดงแสดงน้ำหนัก และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลจากใบว่าสาวหลง เมื่อนำส่วนสกัดย่อยที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าส่วนสกัดย่อย MFr1 และ MFr2 มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (ตารางที่ 3-5) และมีรูปแบบโครมาโตแกรมที่คล้ายกันจึงนำมารวมกันและทำการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งหนึ่ง แสดงแผนภาพการทำบริสุทธิ์สารในรูปที่ 3-1 เมื่อวิเคราะห์แยกสารพบสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ 1 ชนิด เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วย ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, NMR distortionless enhancement โดย polarization transfer (dept) 90, dept 135 และเปรียบเทียบกับสเปกตรัม NMR ในฐานข้อมูล (ภาคผนวก ก) พบว่าสาร MFr1+2 คือ (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene (รูปที่ 3-2) สารนี้มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง สูตรโครงสร้างคือ $C_{11}H_{14}O$

น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 162.23 g/mol. ^{1}H NMR 1.141 (1, 3H, t, J=7.433), 1.920 (2, 2H, qd, J=7.433, J=6.933), 6.280 (3, 1H, dt, J=17.105, J=6.933), 6.329 (4, 1H, d, J=17.105), 7.279 (6, 1H, ddd, J=8.800, J=2.418, J=0.000), 6.863 (7, 1H, ddd, J=8.800, J=2.406, J=0.000), 3.799 (10, 3H), 6.863 (11, 1H, ddd, J=8.800, J=2.418, J=0.000), 7.279 (12, 1H, ddd, J=8.800, J=2.406, J=0.000)

ตารางที่ 3-4 แสดงน้ำหนัก และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลจากใบว่าสาวหลง

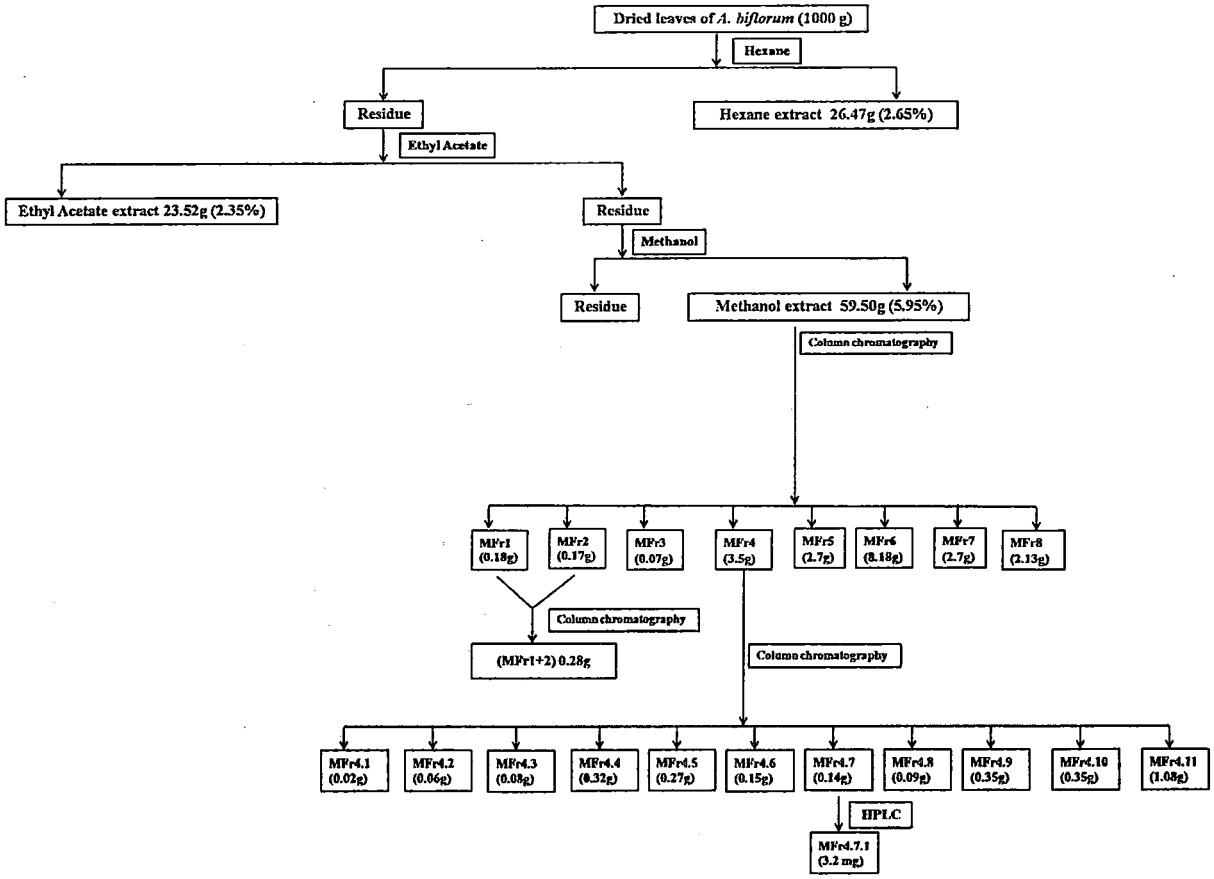
ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
MFr1	0.18	0.72
MFr1	0.18	0.72
MFr3	0.07	0.28
MFr4	3.50	14.00
MFr4	2.70	10.80
MFr3	8.18	32.72
MFr7	2.70	10.80
MFr7	2.70	8.52
รวม	19.63	78.52

ตารางที่ 3-5 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดย่อย MFr1-MFr8

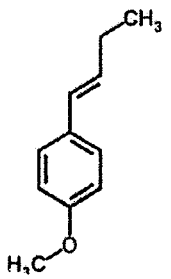
ส่วนสกัดย่อย	ความเข้มข้น (µg/ml)	การกำจัดอนุมูล DPPH (%)	การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%)
MFr1	250	9.18 ± 1.94	
	500	9.52 ± 1.03	28.42 ± 0.44
MFr2	250	12.13 ± 1.83	
	500	18.21 ± 5.99	40.60 ± 1.58
MFr3	250	13.09 ± 0.75	
	500	23.46 ± 5.11	7.79 ± 1.12
MFr4	250	52.50 ± 1.16	
	500	77.51 ± 2.81	10.13 ± 0.89
MFr4	250	60.12 ± 2.50	
	500	79.86 ± 1.00	5.00 ± 0.99
MFr4	250	52.61 ± 0.30	
	500	81.17 ± 2.33	20.08 ± 1.26
MFr2	250	64.20 ± 0.80	
	500	87.05 ± 0.76	13.77 ± 1.07
MFr2	250	48.45 ± 1.14	
	500	79.34 ± 0.57	9.34 ± 0.59

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย±3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

ผลจากตารางที่ 3-5 แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดย่อย MFr7 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่สูง จึงนำส่วนสกัดย่อยนี้ไปทำการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และเทคนิค HPLC พบสารประกอบเคมี 1 ชนิด แต่ยังไม่บริสุทธิ์จึงทำการแยกสารด้วย HPLC ซ้ำเพื่อที่จะสามารถวิเคราะห์โครงสร้างได้ โดย NMR แสดงแผนภาพการทำบริสุทธิ์สารในรูปที่ 3-1



รูปที่ 3-1 แผนภาพการทำบริสุทธิ์สารจากส่วนสกัดเมทานอลของใบว่านสาวหลง



รูปที่ 3-2 โครงสร้างทางเคมีของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene

นอกจากนี้ได้นำส่วนสกัดย่อย MFr1-MFr8 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ LPS พบว่าส่วนสกัดย่อย MFr3 และ MFr4 มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูง (ตารางที่ 3-6) แต่เนื่องจากปริมาณของส่วนสกัดย่อย MFr3 มีปริมาณเพียง 0.07g จึงนำเฉพาะส่วนสกัดย่อย MFr4 มาแยกด้วยสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 11 ส่วนสกัด

(MFr4.1-MFr4.11) และพบว่าส่วนสกัดย่อย MFr4.7 มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงที่สุด (ตารางที่ 3-7) จึงทำการแยกส่วนสกัดย่อย MFr4.7 ด้วยเทคนิค HPLC พบสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ MFr4.7.1

ตารางที่ 3-6 การยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ LPS โดยส่วนสกัดย่อย MFr1-MFr8

ส่วนสกัดย่อย	ความเข้มข้น (µg/ml)	ความเข้มข้นไนไตรท์ (µM)	การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (%)	การมีชีวิตรอด (%)
MFr1	10	8.08 ± 9.79	13.22 ± 5.24*	97.41 ± 0.59
	50	29.97 ± 20.17	36.97 ± 4.87*	97.02 ± 1.74
MFr2	10	36.79 ± 22.64	16.02 ± 9.50*	97.28 ± 0.88
	50	30.93 ± 21.26	29.3 ± 5.46*	96.07 ± 0.72
MFr3	10	36.42 ± 24.30	90.75 ± 11.52*	96.75 ± 1.75
	50	-1.63 ± 0.57	105.22 ± 3.40*	92.67 ± 3.26
MFr4	10	5.09 ± 6.27	49.26 ± 16.39*	98.90 ± 0.39
	50	1.16 ± 3.37	99.84 ± 5.50*	96.49 ± 0.79
MFr3	10	24.32 ± 21.72	24.71 ± 10.51*	97.00 ± 2.24
	50	18.75 ± 20.28	64.34 ± 17.40*	97.30 ± 2.10
MFr3	10	32.95 ± 22.69	21.23 ± 16.03*	94.86 ± 2.55
	50	32.81 ± 19.35	21.76 ± 15.58*	95.27 ± 2.99
MFr1	10	39.21 ± 24.03	7.51 ± 10.24*	96.53 ± 2.15
	50	35.98 ± 21.16	14.26 ± 9.27*	98.56 ± 0.84
MFr8	10	39.91 ± 24.75	6.15 ± 10.00*	96.82 ± 0.48
	50	37.20 ± 23.00	12.43 ± 12.46*	96.42 ± 3.17
control		-1.63 ± 0.49		100 ± 0.00
LPS		43.57 ± 29.67	0 ± 0.00	97.00 ± 2.24
DMSO		-1.20 ± 1.35		98.90 ± 0.39

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ ให้ CON = เซลล์ควบคุม, LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว, DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว

ตารางที่ 3-7 การยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ LPS โดยส่วนสกัดย่อย MFr4.1-MFr4.11

ส่วนสกัดย่อย	ความเข้มข้น (µg/ml)	ความเข้มข้นไนไตรท์ (µM)	การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (%)	การมีชีวิตรอด (%)
MFr4.1	2	50.75 ± 15.33	1.84 ± 18.29	98.64 ± 4.05
	10	68.31 ± 14.48	23.08 ± 8.61*	98.73 ± 3.14
MFr4.2	2	31.67 ± 20.31	44.89 ± 10.58*	99.43 ± 5.09
	10	17.82 ± 2.92	82.36 ± 10.75*	98.61 ± 4.54
MFr4.3	2	20.40 ± 0.54	54.87 ± 16.52*	89.62 ± 6.26
	10	6.47 ± 1.07	94.82 ± 4.48*	85.84 ± 13.23
MFr4.4	2	43.36 ± 15.21	20.04 ± 9.73*	100.69 ± 3.67
	10	25.27 ± 1.77	74.10 ± 12.19*	100.37 ± 4.47
MFr4.5	2	30.96 ± 10.24	42.85 ± 7.21*	98.71 ± 3.41
	10	6.15 ± 2.64	94.24 ± 2.38*	99.06 ± 7.43
MFr4.2	2	27.85 ± 10.39	46.95 ± 8.93*	98.12 ± 1.90
	10	4.58 ± 1.10	95.55 ± 1.70*	100.44 ± 6.26
MFr4.4	2	18.96 ± 2.32	60.30 ± 11.83*	96.97 ± 1.05
	10	0.59 ± 0.70	99.65 ± 0.63*	97.30 ± 1.51
MFr4.8	2	37.55 ± 9.37	33.07 ± 10.02*	100.02 ± 2.65
	10	10.29 ± 6.53	89.45 ± 9.95*	106.30 ± 6.23
MFr4.9	2	30.49 ± 10.72	42.27 ± 9.08*	92.26 ± 9.78
	10	9.59 ± 3.52	89.96 ± 6.79*	97.73 ± 7.97
MFr4.10	2	44.59 ± 11.84	18.12 ± 11.93*	93.70 ± 3.57
	10	39.43 ± 4.65	55.97 ± 8.40*	101.85 ± 7.89
MFr4.10so	2	47.33 ± 22.63	17.52 ± 5.04*	91.58 ± 4.91
	10	5.56 ± 7.33	91.47 ± 7.20*	94.88 ± 4.35
MFr4.11	2	35.05 ± 5.02	23.76 ± 30.96*	96.81 ± 1.37
	10	55.90 ± 18.13	39.35 ± 8.16*	104.72 ± 7.13
control		-1.01 ± 0.52		100 ± 0.00
LPS		58.92 ± 26.49	0 ± 0.00	98.81 ± 2.43
DMSO		-0.42 ± 1.23		98.82 ± 3.12

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ ให้ CON = เซลล์ควบคุม, LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว, DMSO =

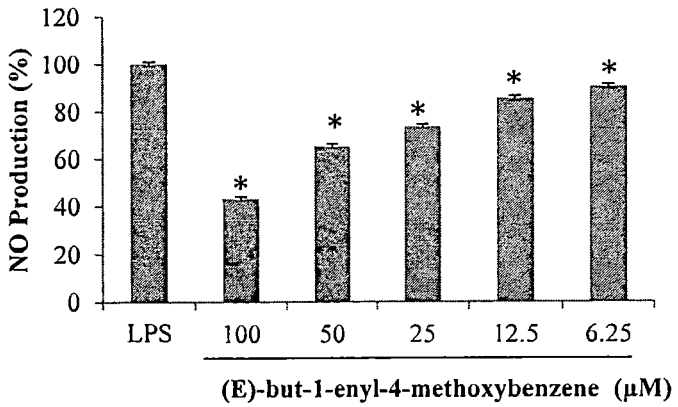
เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลของใบว่านสาวหลง

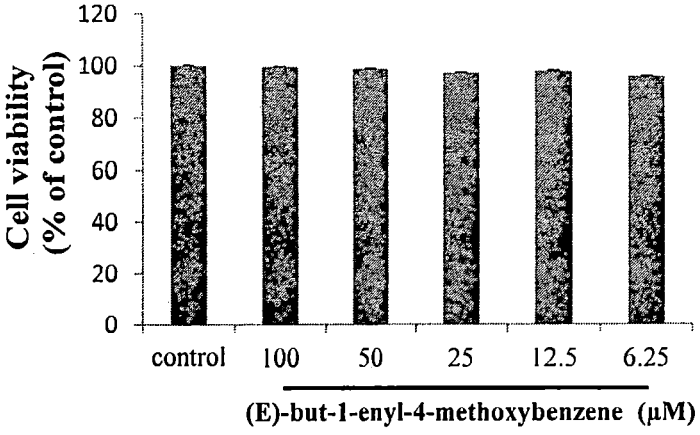
เมื่อนำสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าสารมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่ต่ำ มีค่า IC_{50}มากกว่า 4 mg/ml ในขณะที่ค่า IC_{50} ของการคีเลตโลหะ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 0.996 ± 1.63 และ 0.6 ± 21.46 mg/ml ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 3-8) นอกจากนี้สาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น มีค่า IC_{50} เท่ากับ 90.92±6.72 μM (รูปที่ 3-3) โดยที่สาร(E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene นี้ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 3-4

ตารางที่ 3-8 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene

(E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene		การยับยั้ง (%)	IC_{50}
การทดสอบ	ความเข้มข้น (μg/ml)		
การกำจัดอนุมูล DPPH	500	3.66	> 4 mg/ml
	1000	5.27	
	1000	7.79	
	1000	6.21	
	1000	4.18	
การคีเลตไอออนของโลหะ	1600	67.11 ± 3.45	0.996 ± 1.63 mg/ml
	800	49.34 ± 0.42	
	400	38.71 ± 1.15	
	500	23.94 ± 2.17	
	500	13.58 ± 1.77	
การยับยั้งไทโรซิเนส	50	8.16 ± 1.59	0.6 ± 21.46 mg/ml
	100	15.34 ± 0.98	
	200	28.81 ± 0.34	
	400	38.95 ± 0.94	
	500	61.14 ± 1.61	



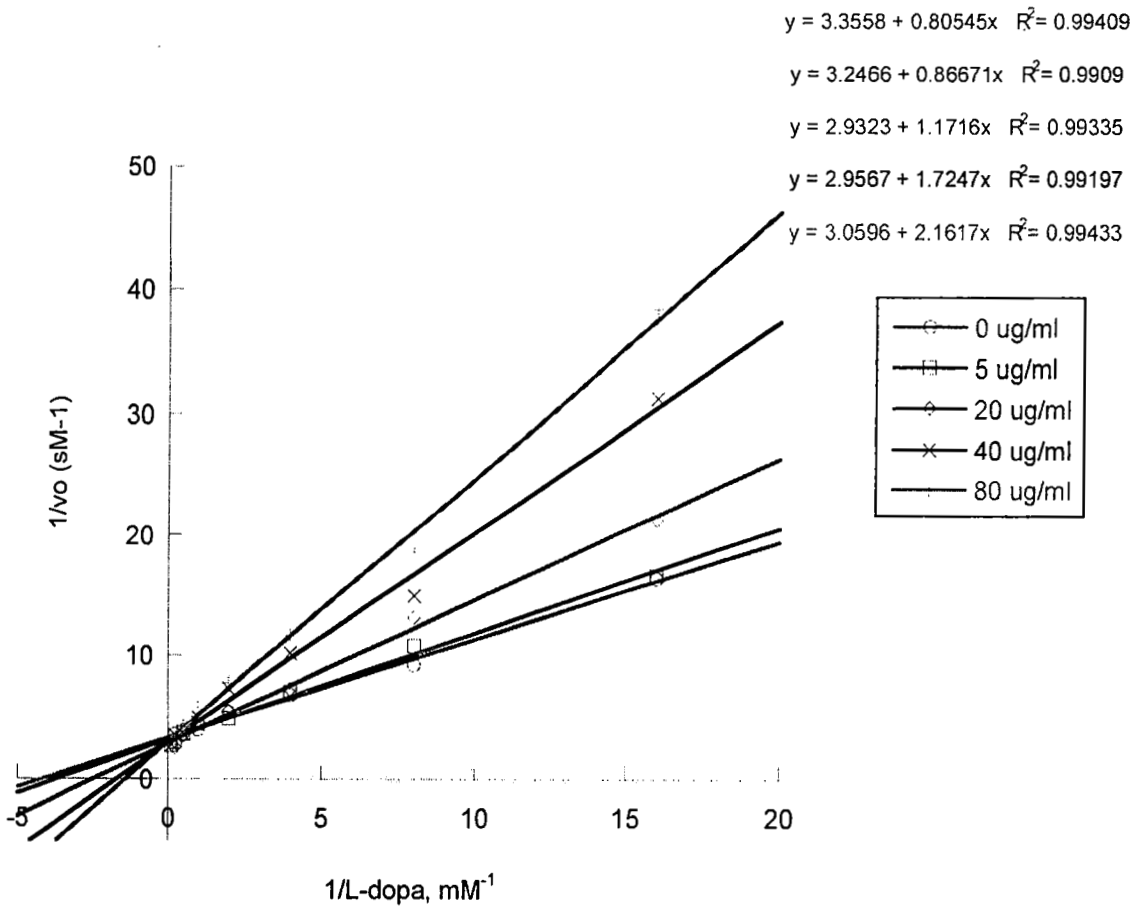
รูปที่ 3-3 เปอร์เซ็นต์การผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS (1 μg/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดย * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS



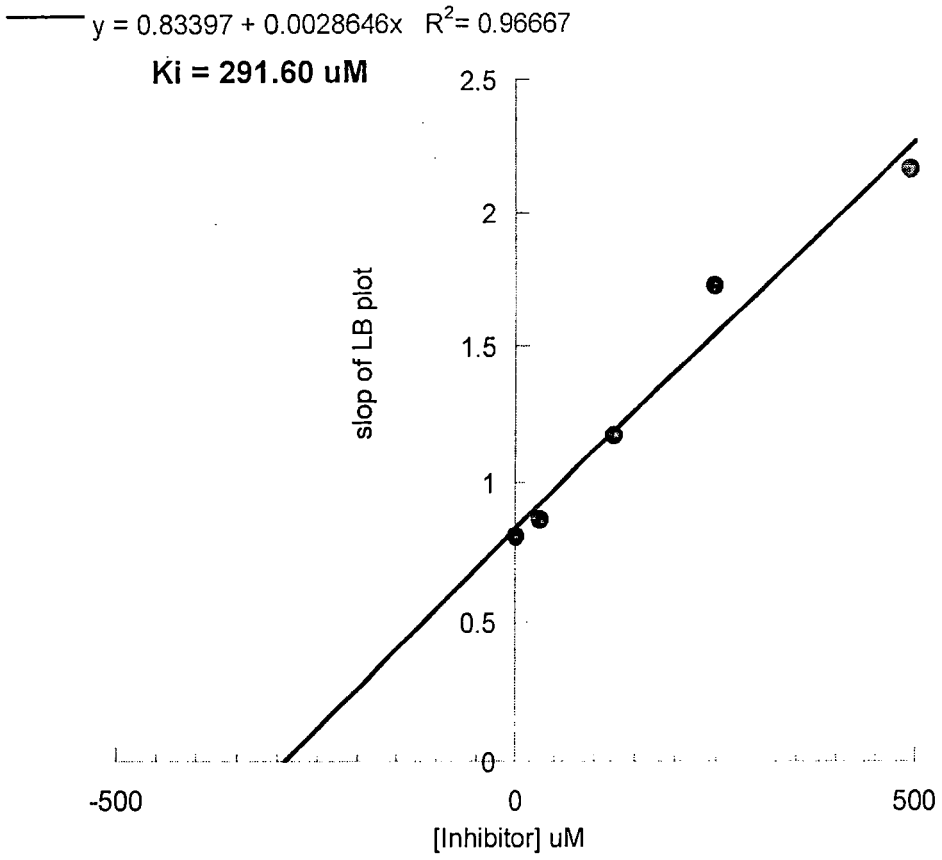
รูปที่ 3-4 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนูที่สัมผัสกับสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3.5 การศึกษาทางจลนศาสตร์ของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีสาร L-DOPA เป็นซับสเตรทพบว่ากราฟที่ได้จากการพลอตระหว่างความเร็วและความเข้มข้นต่าง ๆของสารยับยั้ง ((E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene) ที่ซับสเตรทที่ความเข้มข้นต่างกัน ได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง (รูปที่ 3-5) และเมื่อพลอตระหว่างแอกติวิตีของเอนไซม์และความเข้มข้นต่าง ๆของสารยับยั้ง แสดงให้เห็นว่าสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิ เนสในการออกซิเดชัน L-DOPA ในลักษณะเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน และสามารถผันกลับได้ (reversible competitive inhibitor) ดังแสดงในรูปที่ 3-6 มีค่า Ki เท่ากับ 291.60 μM



รูปที่ 3-5 กราฟ Lineweaver–Burk ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในการออกซิเดชัน L-DOPA ที่ pH 6.8 ของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 1.7 μg/ml พลอตกราฟโดยโปรแกรม KaleidaGraph



รูปที่ 3-6 การวิเคราะห์ค่า K_I ของการยับยั้งแบบแข่งขันจากกราฟที่พลอตระหว่างค่าความชันที่ได้จากกราฟ Lineweaver–Burk กับความเข้มข้นของสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene

บทที่ 4
อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ และต้านไทโรซิเนส จากใบว่านสาวหลงซึ่งเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากการนำส่วนเหง้า หรือลำต้นใต้ดินของว่านสาวหลงไปใช้ประโยชน์ในด้านการสกัดน้ำมันหอมระเหย มาเป็นส่วนผสมของเครื่องการสำอางบางชนิด (พงษ์ศักดิ์ พลเสนา, 2550) นอกจากนี้ได้ทำการแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ และต้านไทโรซิเนสจากใบว่านสาวหลง โดยวิธีฤทธิ์ทางชีวภาพนำการสกัด (bioactivity-guided isolation) จากการศึกษาพบว่า ส่วนสกัดเมทานอลของใบว่านสาวหลงมีเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งสูงที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดเฮกเซน และส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท (ตารางที่ 3-1) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Hossain และคณะ (2011) ที่พบว่ามทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถสกัดสารออกจากใบพืช Tetrastigma ได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซีเตท และบิวทานอล เมื่อนำส่วนสกัดของใบว่านสาวหลงมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าส่วนสกัดทุกส่วนจากใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาในลำต้นใต้ดินว่านสาวหลงที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553) ในการศึกษาได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีต่างๆ คือ การกำจัดอนุมูล DPPH อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ความสามารถในการคีเลตโลหะ และความสามารถในการรีดิวซ์ เพื่อยืนยันผลเนื่องจากแต่ละวิธีมีหลักการทดสอบที่แตกต่างกัน อนุมูล DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH มักใช้เป็นการทดสอบเบื้องต้นในการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสาร โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH เกิดเป็น DPPH-H (diphenyl picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นอนุมูลอีกต่อไป สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลือง (Li และคณะ, 2007) สีของสารละลายขึ้นกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH มาก สารละลายสีม่วงจะกลายเป็นสีเหลืองเร็วขึ้น จากการทดลองพบว่าทุกส่วนสกัดของใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และความสามารถเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของส่วนสกัดเพิ่มขึ้น โดยส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 3-2 แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH มีค่าต่ำกว่าสารควบคุมแบบบวกคือกรดแอสคอบิกและ BHT

อนุมูลไฮดรอกซิลเป็นอนุมูลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเร็วมาก ดังนั้นอนุมูลไฮดรอกซิล จึงสามารถออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุล เช่น คาร์โบไฮเดรต ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ (Halliwell และ Gutteridge, 2007) และเนื่องจากอนุมูลไฮดรอกซิลมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา การวิเคราะห์ปริมาณอนุมูลไฮดรอกซิล

โดยตรงทำได้ยาก จึงต้องหาสารมาให้อนุมูลไฮดรอกซิลเข้าทำปฏิกิริยาแล้ววิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ในการทดลองนี้ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิลโดยปฏิกิริยา Fenton จากนั้นอนุมูลไฮดรอกซิลจะเข้าออกซิไดซ์โซเดียมซาลิไซเลท ได้ผลิตภัณฑ์คือ 2,3 หรือ 2,5 dihydroxylbenzoic acid เป็นสารสีม่วงวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 562 นาโนเมตร (Blackburn และคณะ, 1998) ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดี การเปลี่ยนเป็นสีม่วงของสารละลายจะลดลง จากผลการทดลองพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของใบว่านสาวหลงมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลแรดิคอลได้ดีที่สุดตามด้วยส่วนสกัดเมทานอลและเฮกเซน แต่ยังมีฤทธิ์ต่ำกว่าตัวควบคุมแบบบวกกรดแกลลิกซึ่งมีค่า IC_{50} เพียง 0.145 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กลไกในการต้านอนุมูลอิสระนอกจากเกิดจากความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระแล้ว ยังเกิดจากความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสาร และความสามารถในการคีเลตไอออนของโลหะการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ เป็นการทดสอบความสามารถของส่วนสกัดในการให้อิเล็ก ตรอนแก่ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} และ Fe^{2+} จะจับกับเฟอร์ริกไซยาไนด์ (ferricyanide) ได้เป็นสารประกอบ Fe^{2+}-ferricyanide เกิดเป็นสารสีน้ำเงินที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ดี Fe^{3+} จะถูกเปลี่ยนเป็น Fe^{2+}ได้มากขึ้น แสดงว่าสารต้านอนุมูลอิสระนี้สามารถหยุดลูกโซ่อนุมูลอิสระ (free radical chain) ได้โดยการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ (Kumaran และคณะ, 2005) และจากการทดลองพบว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และอนุมูลไฮดรอกซิลรวมถึงความสามารถในการรีดิวซ์มีความสอดคล้องกันโดยผลที่ได้ไปในทิศทางเดียวกันคือสกัดเอทิลอะซิเตทและส่วนสกัดเมทานอลมีความสามารถในการรีดิวซ์ได้ดี อีกกลไกหนึ่งในการแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ คือการคีเลตไอออนโลหะโดยในปฏิกิริยาจะเกิดการทำปฏิกิริยาระหว่าง Fe^{2+} กับ ferrozine เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} - ferrozine เป็นสารสีม่วงแดง ถ้าสารต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ในการคีเลทไอออนโลหะได้ดี จะสามารถแย่งจับกับ Fe^{2+} ทำให้ Fe^{2+} ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ ferrozine เพราะสารต้านอนุมูลอิสระรบกวนการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-ferrozine สีม่วงแดงจึงลดลง (Kumaran และคณะ, 2005) จากการทดลองพบว่าทุกส่วนสกัดของใบว่านสาวหลงมีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ Fe^{2+} ในลักษณะที่ความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะเพิ่มตามความเข้มข้นของส่วนสกัดที่เพิ่มขึ้น และพบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีความสามารถในการคีเลทโลหะไอออนได้ดีที่สุดคือมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 1.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามด้วยส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทและส่วนสกัดเฮกเซน ในการทดลองนี้มีสารควบ คุมแบบบวกคือ EDTA ซึ่งมีความสามารถในการคีเลทไอออนที่สูงมากมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.021 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ผิวหนัง โดยเอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ของ L-tyrosine ไปเป็น L- DOPA และปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DOPA ไปเป็น Dopaquinone ซึ่งเป็นขบวนการในการสังเคราะห์สารประกอบเมลานิน (Wang และคณะ,2006) ในการทดลองนี้ใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น เอนไซม์ไทโรซิเนสจะเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น dopachrome

intermediate จากการทดลองพบว่าส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสเท่ากับ 34.11 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของส่วนสกัดเมทานอลจากใบของพืชในสกุล *Etlingera* ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในช่วง 55.2 ถึง 22.0 เปอร์เซ็นต์ (Chan และคณะ, 2007)

ในการศึกษานี้ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท และส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงใกล้ เคียงกัน ในขณะที่ส่วนสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงที่สุด (ตารางที่ 3-5 และ 3-6) จึงนำส่วนสกัดเมทานอลมาแยกสารได้ส่วนสกัดย่อย 8 สกัด คือ MFr1-MFr8 และทำการแยกสารบริสุทธิ์ได้จากส่วนสกัด MFr1+MFr2 ซึ่งเป็นส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด (ตารางที่ 3-5) สารที่ได้คือ (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene (รูปที่ 3-2) สารที่ได้นี้เหมือนกับสารที่ศิรินันท์ ทับทิมเทศ (2547) รายงานการค้น พบในน้ำมันหอมระเหยจากว่านสาวหลง แต่ในรายงานนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่าสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxy benzene มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (ตารางที่ 3-11 และรูปที่ 3-4 และ 3-6) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในลักษณะแบบแข่งขัน และสามารถผันกลับได้ (รูปที่ 3-6)

จากการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าใบของว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ และลดการอักเสบโดยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS จากการทดลองที่ได้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการนำใบว่านสาวหลงมาใช้ประโยชน์โดยอาจนำไปเป็นส่วนประกอบของยาหรือเครื่องสำอางต่อไปในอนาคต

บทที่ 5
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าส่วนสกัดของใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ จากการทดลองที่ได้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำใบว่านสาวหลงมาใช้ประโยชน์โดยอาจนำไปเป็นส่วนประกอบของยาหรือเครื่องสำอางต่อไปในอนาคต สาร (E)-but-1-enyl-4-methoxy benzene เป็นสารตัวหนึ่งในส่วนสกัดของใบว่านสาวหลงเป็นสารออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำมาซึ่งข้อมูลที่จะใช้ในการพัฒนาเป็นยาต้านอักเสบตัวใหม่ในอนาคต

บทที่ 6
ผลผลิต

1) Yaowalak Charoensuk, Klaokwan Srisook*, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. Chiangmai, Thailand, 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version)

2) Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and Klaokwan Srisook*. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the 1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

บรรณานุกรม

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข, เอกรัฐ ศรีสุข 2553. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย, 2553, 2 (ฉบับพิเศษ)::143-150.

จักรพันธ์ จุลศรีไกวัล. 2550. องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปราโมทย์ ไตรบุญ ประนอม จันทรโณทัย และไคร์ ลาร์เซน. 2548. ชีวภูมิศาสตร์และความหลากหลายทางชีวภาพของพืชวงศ์ขิงในประเทศไทย.วารสารงานวิจัย มข. (ฉบับบัณฑิตศึกษา). 5: 23-32.

มัลลิกา ปาละโชติ, กล่าวขวัญ ศรีสุข, เอกรัฐ ศรีสุข. 2553. ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากต้นเร่วหอมในเซลล์แมคโครฟาจเกิดจากการกระตุ้นเอนไซม์ HO-1. Proceeding of the 19^{h} National Symposium on Graduate Research, Chacheongsao, Thailand, (Fulltext, CD version).

พงศักดิ์ พลเสนา. 2550. พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัดเจตนารมณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.

พัชรี ขุนหลัด, ยงยุทธ ตัณฑุลเวสส, ธารารัตน์ ศุภศิริ และ วราดุล ฉัตรทอง. 2551. การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้นชัน (*Curcuma longa Linn.*) วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 24 ฉบับที่ 1, 125-139

รัชนก เชื้อเตชะ และคณะ. 2549 สมบัติในการต้านออกซิเดชันของการสกัดจากหน่อกะลา. CD รวบรวมผลงานวิชาการหลังการประชุม (Proceeding) ของการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 32: กรุงเทพฯ

ศิรินันท์ ทับทิมเทศ และคณะ. 2547. Composition and central nervous system depressive effect of the essential oil of *Amomum biflorum*. CD รวบรวมผลงานวิชาการหลังการประชุม (Proceeding) ของการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 30: กรุงเทพฯ

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ และ พรรณวิภา กฤษฎาพงษ์. 2548. การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกิ่งหม่อนในประเทศไทย และครีมลดความคล้ำ. National Research Council of Thailand. ปีที่ 37 เล่มที่ 2 หน้า 83-100.

Blackburn A.C., Doe W.F., Buffinton G.D. (1998) Salicylate hydroxylation as an indicator of hydroxyl radical generation in dextran sulfate-induced colitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 25,305-313.

Chan, EWC., Lim, YY.,Omar, M. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of Etingera species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry*. 104, 1586-1593.

Chan, EWC., Lim, YY., Wong, LF., et.al. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*. 109, 477-483.

Chen, IN., Chang CC., Ng, CC., et. al. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of Zingiberaceae plants in Taiwan. *Plant Foods Hum. Nutr.* 63, 15-20.

Elzaawely A.A., Xuau T.D., Tawata S. (2006). Essential oils, Kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizome of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. And their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 103, 486-494

Imanishi, N., et.al. (2004). Inducible activity of ginger rhizome (*Zingiber offifinale*)on the mRNA expression of macrophage-inducible nitric oxide (NO) *American J.Chinese Medicine* synthase and NO production in a macrophage cell line, RAW 264.7 cells.. 32: 727-735.

Halliwell B. & Gutteridge J. (2007). Free radicals in biology and medicine, 4th ed. Oxford University Press, New York.

Jantaranotai, N., et.al. (2006). Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia. *Life Science*. 78: 571-577.

Kim, Y.J. & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62: 1707-1723.

Kosem, N., Han, Y.H. & Moongkarndi, P. (2007). Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *ScienceAsia* 33: 283-292.

Kumaran A., Joel R. Karunakaran. (2005). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry,* 97,109-114.

Lu YH, Lin-Tao, Wang ZT, Wei DZ, Xiang HB. (2007). Mechanism and inhibitory effect of galangin and its flavonoid mixture from *Alpinia officinarum* on mushroom tyrosinase and B16 murine melanoma cells. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 22:433-438.

Mau, J.L., Lai, E.Y.C., Wang, N.P., Chen, C.C., Chang, C.H., Chyau, C.C. (2002). Composition and antioxidant activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. *Food Chem.* 82: 583-591.

Matsuda, H., et.al. (2006). Inhibitorsfrom the rhizomes of *Alpinia officinarum* on productionof nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diaryheptanoids for the activity. *Biorg. Med. Chem.* 14: 138-142.

Nagai, T., Myoda, T. & Nagashima, T. (2005). Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food Chemistry* 91: 389-394.

Portes E, Gardrat C., Castellan A.(2007). A comparative study on the antioxidant properties of tetrahydrocurcuminoids and curcuminoids. *Tetrahedron.* 63, 9092–9099.

Solano, F., Briganti, S., Picardo, M. & Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Research* 19: 550-571.

Srisook, K., Cha., Y.N. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharides. *Biochemical Pharmacology* 68: 1709-1720.

Srisook, K., Cha., Y.N. (2005). Superinduction of heme oxygenase-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry.* 12: 70-79.

Tewtrakul, S. and Subhadhirasakul, S. (2008). Effects ofcompounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumornecrosis factor-alpha productions in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology.*120: 81-84.

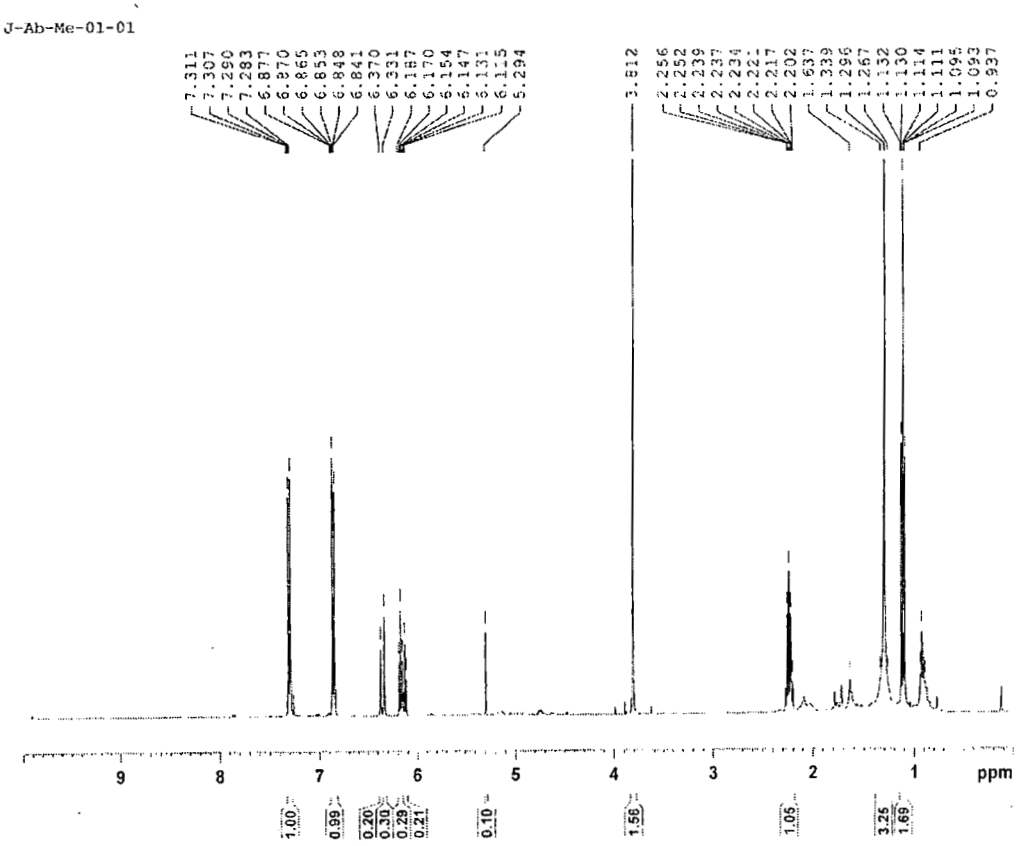
Wang K.H., Lin R.D., Hsu F.L., Huang Y.H., Chang H.C., Huang C.Y., Lee M.H. (2006). Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* 106, 353-359.

Yu Z.R., Hung C.C., Weng Y.M., Su C.L., Wang B.J. (2006). Physiochemical, antioxidant and whitening properties of extract from root cortices of mulberry as affected by membrane process. LWT, 40, 900-907.

ภาคผนวก ก

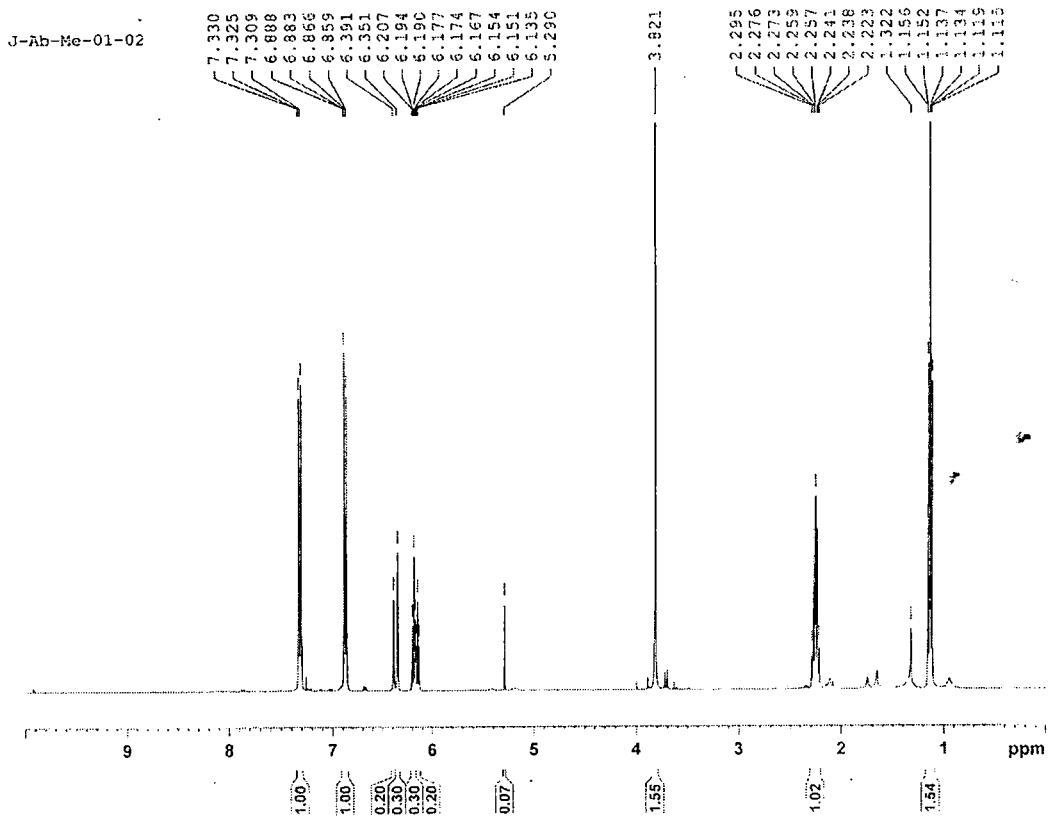
สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย MFr1-MFr8

MFr1

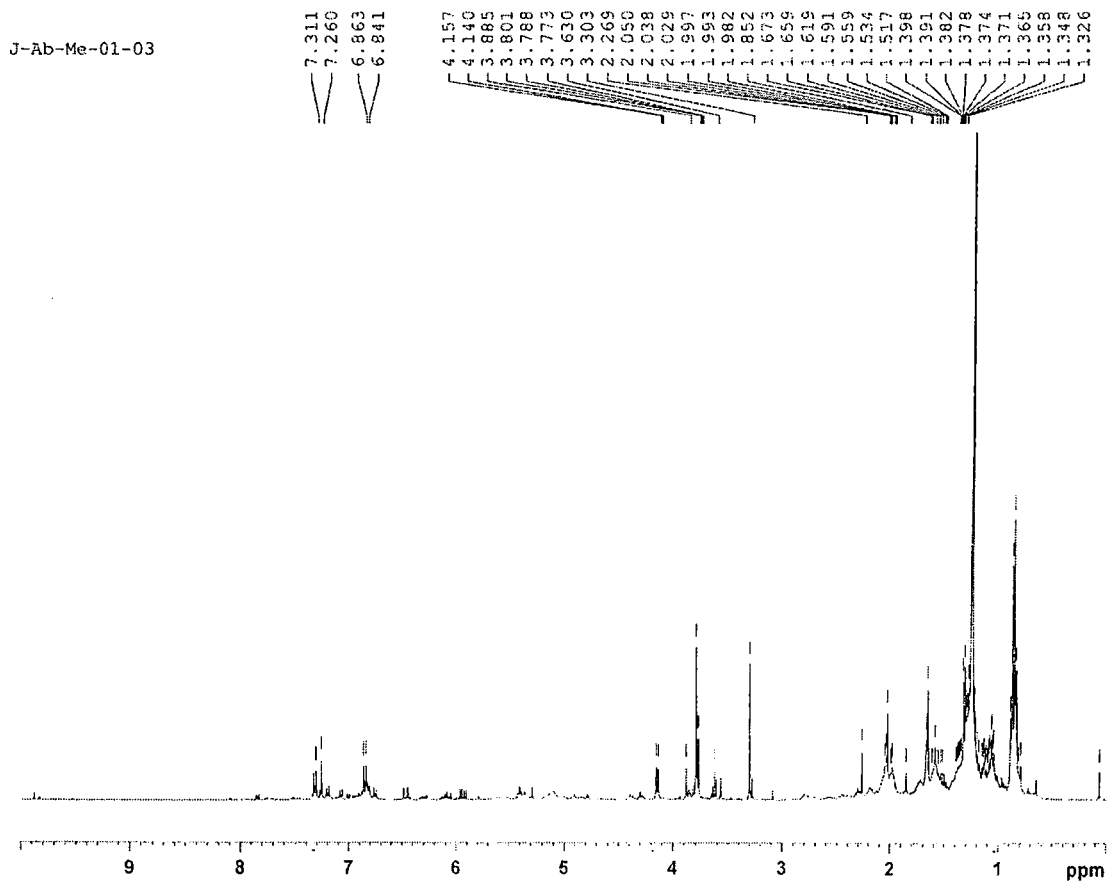


MFr2

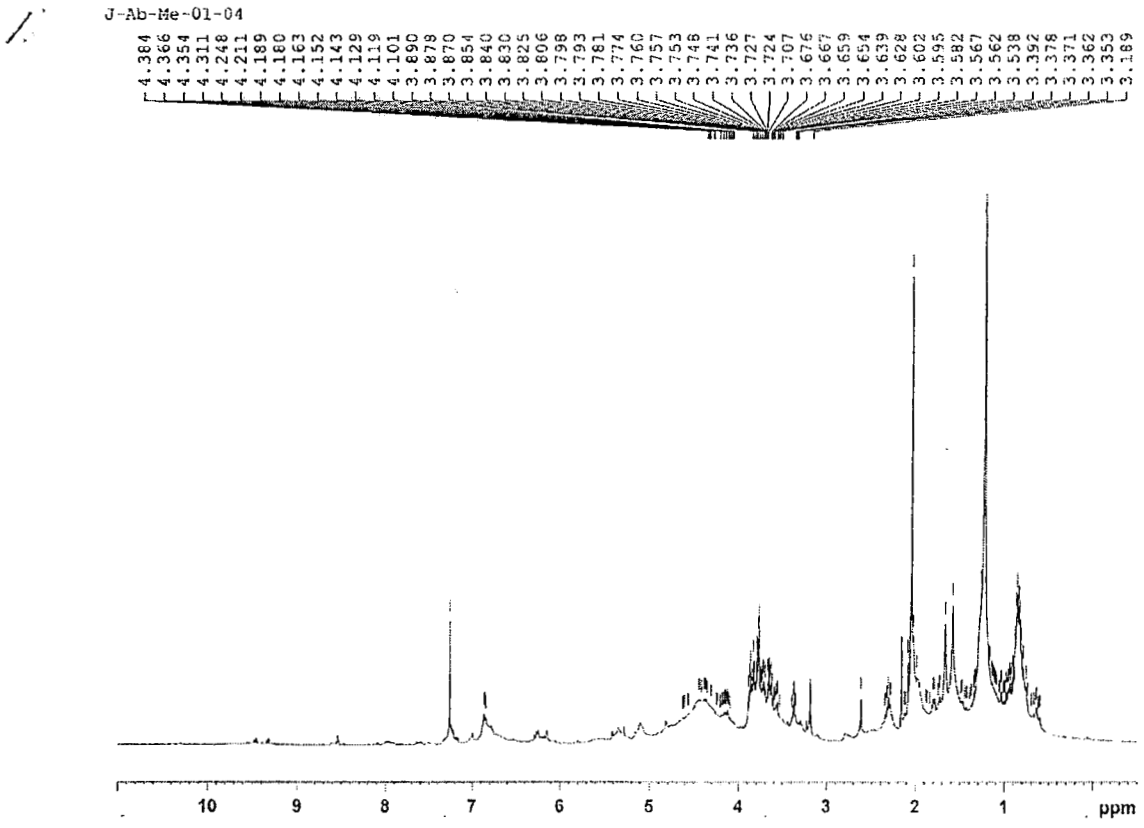
MFr2


J-Ab-Me-01-02
7.330
7.325
7.309
6.888
6.883
6.866
6.859
6.391
6.351
6.207
6.194
6.190
6.177
6.174
6.167
6.154
6.151
6.135
5.290
3.821
2.295
2.276
2.273
2.253
2.257
2.241
2.238
2.223
1.322
1.156
1.152
1.137
1.134
1.119
1.115
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
1.00
1.00
0.20
0.30
0.30
0.20
0.07
1.55
1.02
1.54

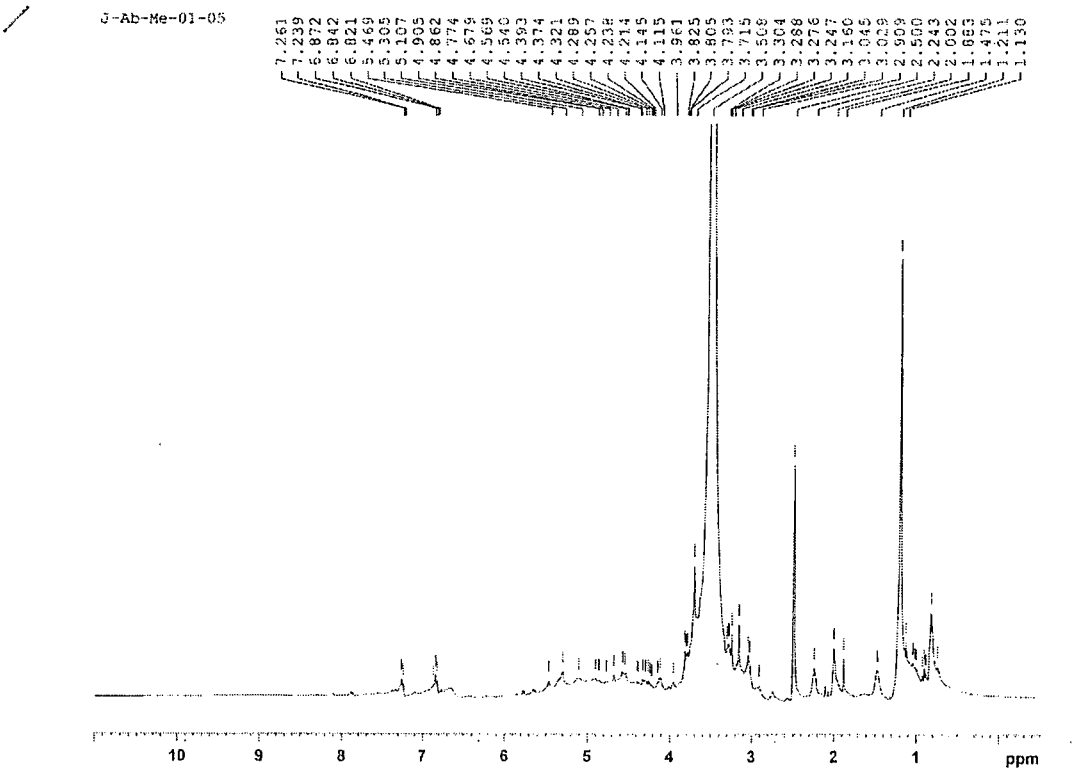
MFr3


J-Ab-Me-01-03
7.311
7.260
6.863
6.841
4.157
4.140
3.885
3.801
3.788
3.773
3.630
3.303
2.269
2.050
2.038
2.029
1.997
1.993
1.982
1.852
1.673
1.659
1.619
1.591
1.559
1.534
1.517
1.398
1.391
1.382
1.378
1.374
1.371
1.365
1.358
1.348
1.326
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

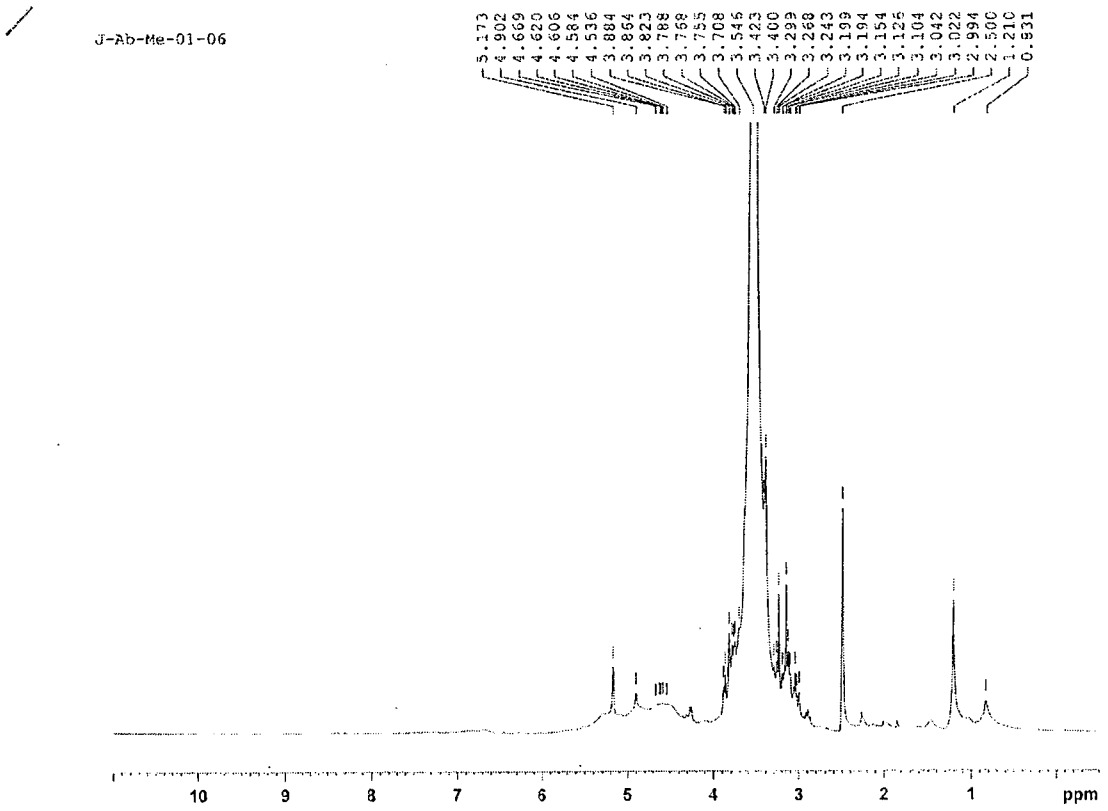
MFr4


J-Ab-Me-01-04
4.384
4.366
4.354
4.311
4.248
4.211
4.189
4.180
4.163
4.152
4.143
4.129
4.119
4.101
3.890
3.879
3.870
3.854
3.840
3.830
3.825
3.806
3.798
3.793
3.781
3.774
3.760
3.757
3.753
3.748
3.741
3.736
3.727
3.724
3.707
3.676
3.667
3.659
3.654
3.639
3.628
3.602
3.595
3.582
3.567
3.562
3.538
3.392
3.378
3.371
3.362
3.353
3.189
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

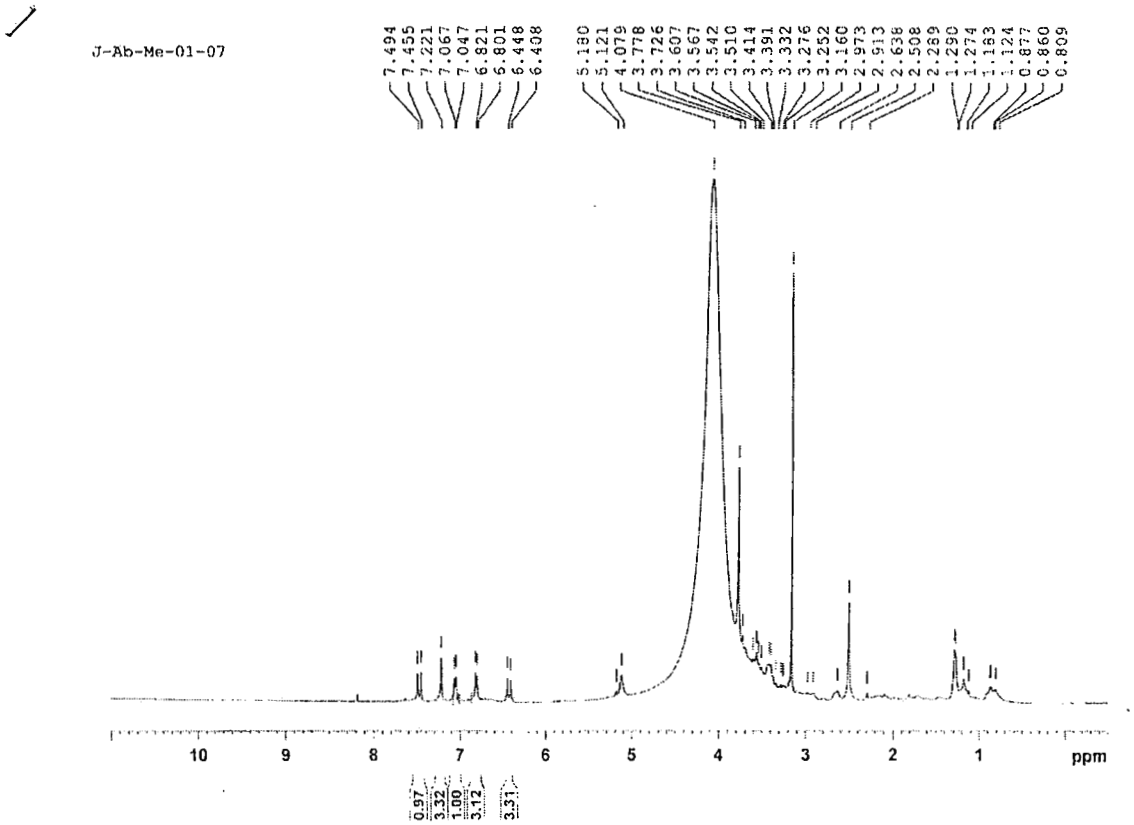
MFr5


J-Ab-Me-01-05
7.261
7.239
6.872
6.842
6.821
5.469
5.305
5.107
4.905
4.862
4.774
4.679
4.565
4.540
4.393
4.374
4.321
4.289
4.257
4.238
4.214
4.145
4.115
3.961
3.825
3.805
3.793
3.715
3.509
3.304
3.288
3.276
3.247
3.160
3.045
3.029
2.909
2.500
2.243
2.002
1.683
1.475
1.211
1.130
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

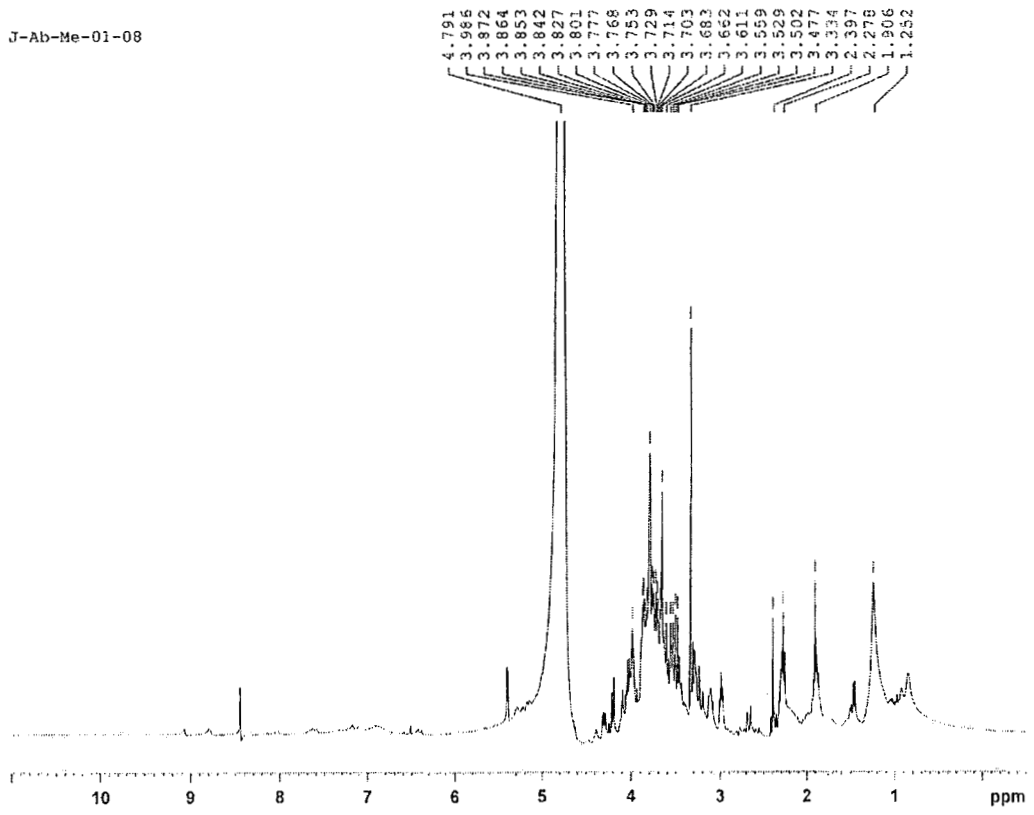
MFr6


J-Ab-Me-01-06
5.173
4.902
4.669
4.620
4.606
4.584
4.536
3.884
3.864
3.823
3.788
3.768
3.755
3.708
3.545
3.423
3.400
3.299
3.268
3.243
3.199
3.194
3.154
3.125
3.104
3.042
3.022
2.994
2.500
1.210
0.831
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

MFr7


J-Ab-Me-01-07
7.494
7.455
7.221
7.067
7.047
6.821
6.801
6.448
6.408
5.180
5.121
4.079
3.778
3.726
3.607
3.567
3.542
3.510
3.414
3.391
3.332
3.276
3.252
3.160
2.973
2.513
2.638
2.508
2.289
1.290
1.274
1.183
1.124
0.877
0.860
0.809
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
0.97
3.32
1.00
3.12
3.31

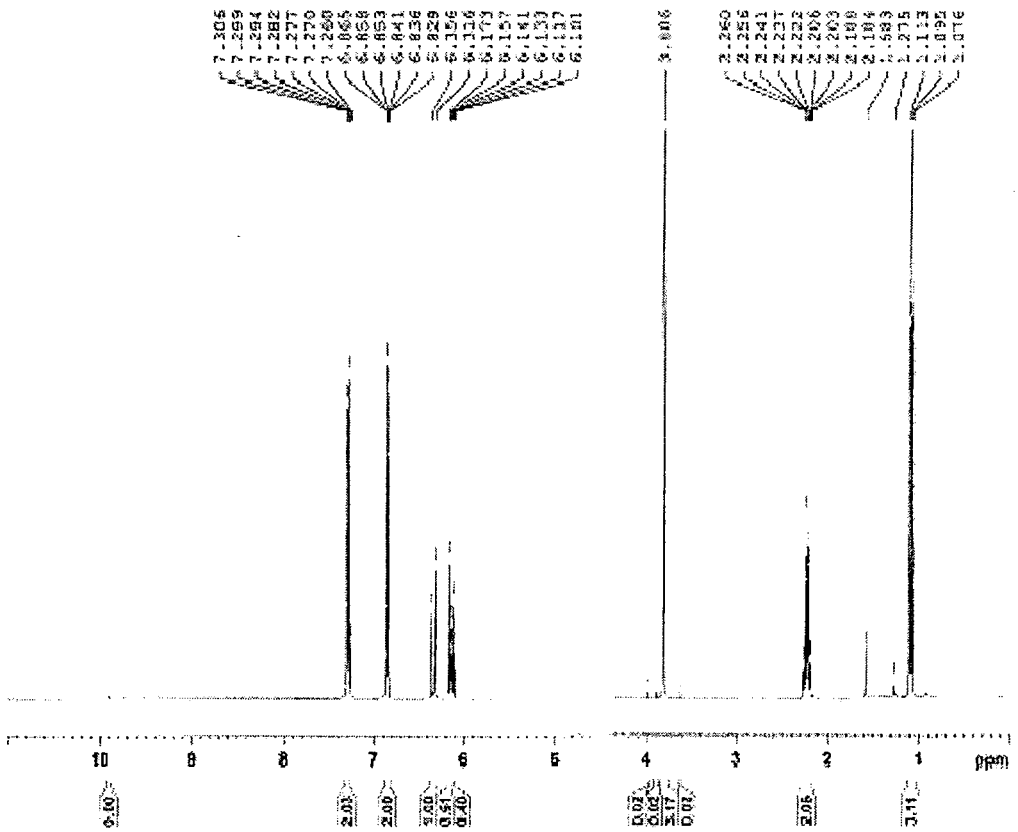
MFr8


J-Ab-Me-01-08
4.791
3.986
3.872
3.864
3.853
3.842
3.827
3.801
3.777
3.768
3.753
3.729
3.714
3.703
3.683
3.662
3.611
3.559
3.529
3.502
3.477
3.334
2.397
2.278
1.906
1.252
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

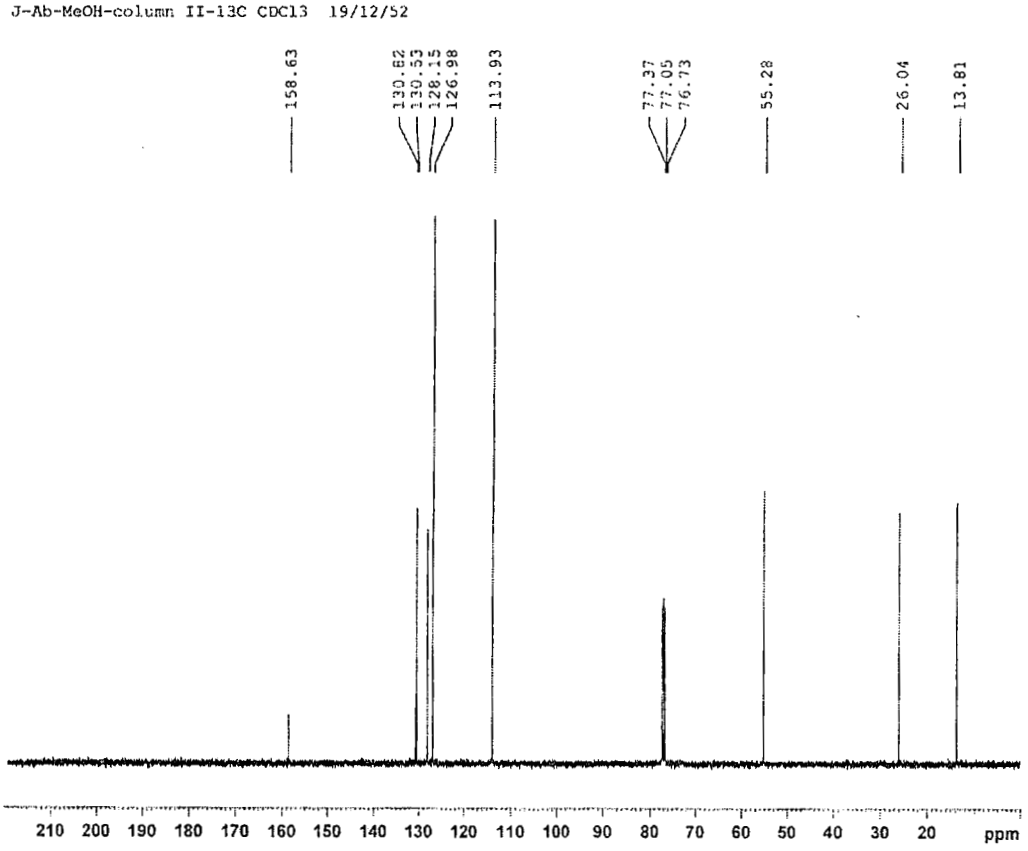
ภาคผนวก ข

สเปกตรัม NMR ของสาร MFr1+2 หรือ (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene

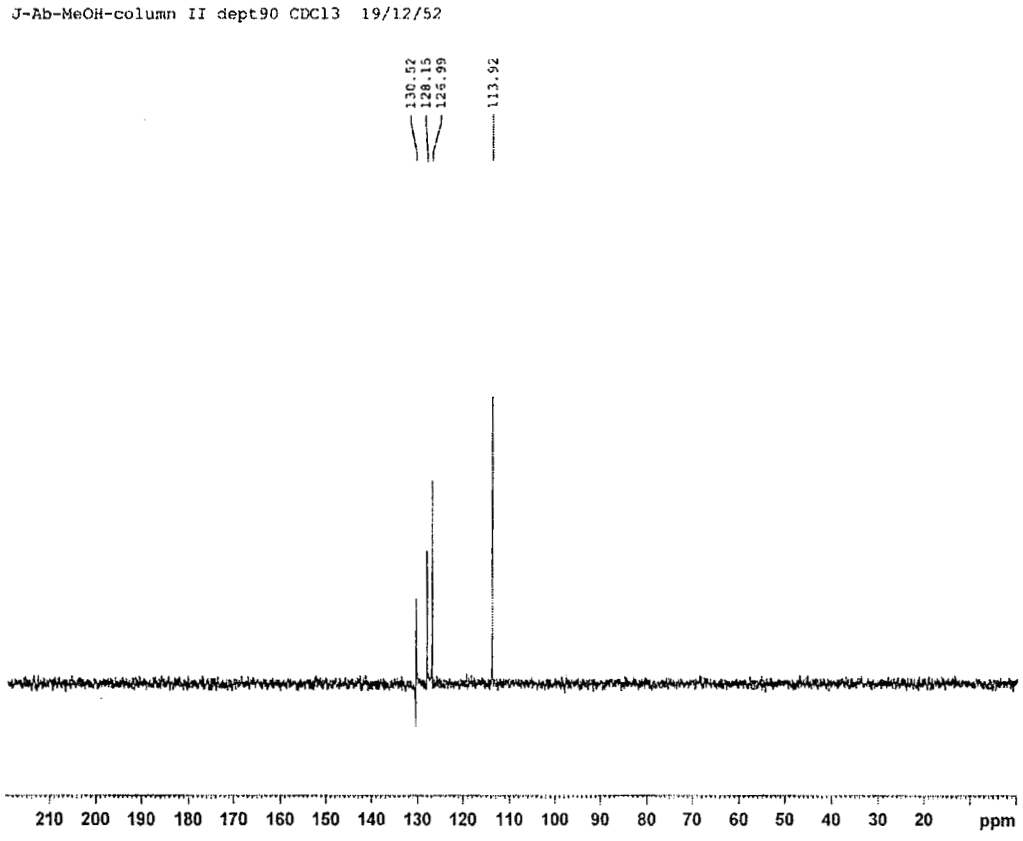
MFr1+2 proton



MFr1+2 carbon



MFr1+2 dept 90



MFr1+2 dept 135