

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสกัดพืชสมุนไพร

ในการสกัดสารสำคัญจากพืชมุนไพรเชิงแข็งไม้ ได้แบ่งวิธีการสกัดออกเป็น 2 กลุ่ม คือ การสกัดตามความมีขี้ของตัวทำละลาย โดยใช้เอธิลอะซิเตท, เอทานอล และน้ำ เรียงตามลำดับ และการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว คือ สารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำ

ตาราง 4 ระยะเวลาในการสกัดและปริมาณสารสกัดที่ได้

สารสกัด	ระยะเวลาสกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณของสารสกัดที่ได้ (% w/w)
<u>สารสกัดซึ่งสกัดตามความมีขี้ของตัวทำละลายตามลำดับ</u>		
1. สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (S1)	16	3.37
2. สารสกัดส่วนเอทานอล (S2)	32	10.77
3. สารสกัดส่วนน้ำ (S3)	8	0.98
<u>สารสกัดซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว</u>		
1. สารสกัดเอทานอล (CT1)	25	12.77
2. สารสกัดน้ำ (CT2)	8	1.72

2. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดในหนูขาว

ตาราง 5 ผลของสารสกัดเชิงแข็งม้าต่อความสามารถในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูขาวเทียบกับยามาตรฐานแอสไพริน

หนู	Dose (mg/kg)	ระยะเวลาหลังฉีด carrageenin					
		1 ชั่วโมง		3 ชั่วโมง		5 ชั่วโมง	
		EV (ml)	% EI	EV (ml)	% EI	EV (ml)	% EI
กลุ่มที่ 1	-	0.27±0.01	-	0.76±0.02	-	0.78±0.02	-
กลุ่มที่ 2	300	0.14±0.01***	47.09	0.37±0.04***	50.88	0.51±0.02***	34.49
กลุ่มที่ 3	100	0.25±0.04	8.40	0.52±0.02***	31.93	0.65±0.01***	17.26
กลุ่มที่ 4	400	0.18±0.01**	32.10	0.51±0.01***	33.55	0.61±0.01***	22.22
กลุ่มที่ 5	400	0.22±0.02	19.05	0.52±0.02***	31.27	0.57±0.03***	26.56
กลุ่มที่ 6	400	0.26±0.02	4.32	0.58±0.04***	23.83	0.64±0.03***	18.16
กลุ่มที่ 7	400	0.25±0.02	7.20	0.63±0.04***	17.69	0.69±0.06*	11.04

- จำนวนในค่าของ mean ± S.E.M. (n = 6)

- กลุ่มที่ 3 หนูตาย 1 ตัว หลังจากได้รับสารสกัด 1 ชั่วโมง, n = 5

- *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1)

เมื่อ

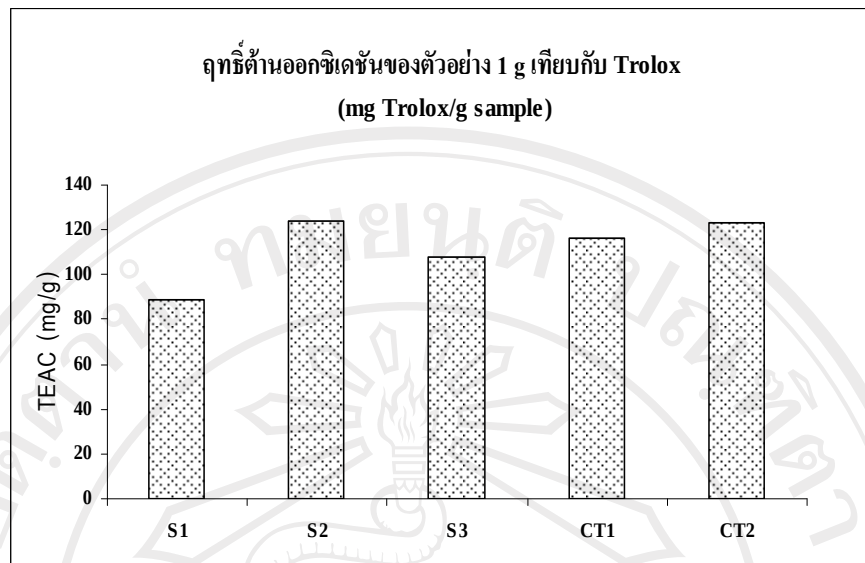
กลุ่มที่ 1	กลุ่มควบคุม ได้รับ 5 % polysorbate 80 (Tween 80®)
กลุ่มที่ 2	กลุ่มยามาตรฐาน ได้รับแอสไพริน 300 mg/kg โดยการป้อน
กลุ่มที่ 3-5	กลุ่มตัวอย่าง ได้รับสารสกัดที่สกัดตามความเข้มข้นของตัวทำละลาย โดยเรียงลำดับดังนี้ คือ สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (S1) 100 mg/kg, สารสกัดส่วนเอทานอล (S2) 400 mg/kg และสารสกัดส่วนน้ำ (S3) 400 mg/kg โดยการป้อน
กลุ่มที่ 6	กลุ่มตัวอย่าง ได้รับสารสกัดเอทานอล (CT1) 400 mg/kg โดยการป้อน
กลุ่มที่ 7	กลุ่มตัวอย่าง ได้รับสารสกัดน้ำ (CT2) 400 mg/kg โดยการป้อน

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด

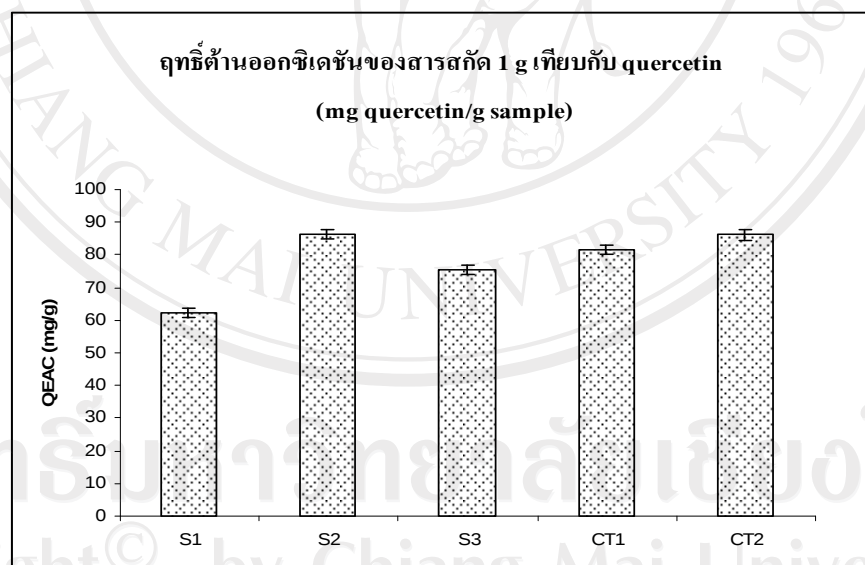
3.1 ABTS Method

ตาราง 6 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดโดยวิธี ABTS

สารสกัด	% Inhibition	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตัวอย่าง 1 g เทียบกับ Trolox (mg Trolox/g sample)	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตัวอย่าง 1 g เทียบกับ Quercetin (mg Quercetin/g sample)
<u>สารสกัดซึ่งสกัดตามความเข้มข้นของตัวทำละลายตามลำดับ</u>			
1. สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (S1)	25.33 ± 0.17	88.41 ± 0.60	62.24 ± 1.01
2. สารสกัดส่วนเอธานอล (S2)	34.30 ± 0.40	123.64 ± 1.45	86.34 ± 0.99
3. สารสกัดส่วนน้ำ (S3)	27.66 ± 0.26	107.56 ± 1.01	75.52 ± 0.69
<u>สารสกัดซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว</u>			
1. สารสกัดเอธานอล (CT1)	30.00 ± 0.38	116.66 ± 1.47	81.74 ± 1.01
2. สารสกัดน้ำ (CT2)	32.77 ± 0.13	123.20 ± 0.49	86.12 ± 0.33



ภาพ 8 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด 1 กรัม เทียบกับ Trolox



ภาพ 9 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด 1 กรัม เทียบกับ Quercetin

สารสกัดซึ่งสกัดตามความมีขี้ของตัวทำละลาย

1. สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (S1)
2. สารสกัดส่วนเอทานอล (S2)
3. สารสกัดส่วนน้ำ (S3)

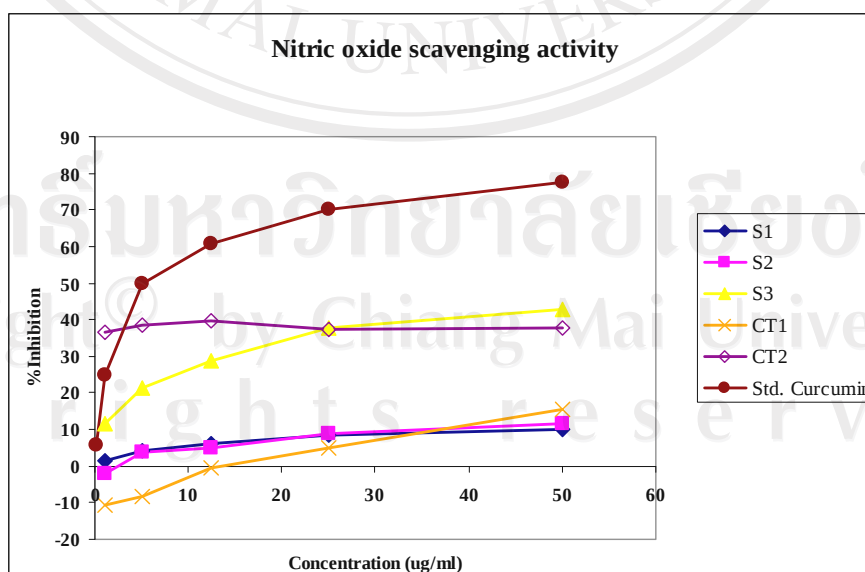
สารสกัดซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว

1. สารสกัดเอทานอล (CT1)
2. สารสกัดน้ำ (CT2)

3.2 Scavenging effect on nitric oxide assay

ตาราง 7 Nitric oxide scavenging activity ของสารสกัด

Fraction	% Inhibition					
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)					
	0.1	1.0	5.0	12.5	25.0	50.0
<u>สารสกัดซึ่งสกัดตามความมีขี้ของ</u> <u>ตัวทำละลายตามลำดับ</u>						
1. สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (S1)	-	1.27	4.24	6.21	8.40	9.99
2. สารสกัดส่วนเอธานอล (S2)	-	-2.14	3.84	4.96	8.94	11.68
3. สารสกัดส่วนน้ำ (S3)	-	11.62	21.53	28.67	37.87	42.81
<u>สารสกัดซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลาย</u> <u>ชนิดเดียว</u>						
1. สารสกัดเอธานอล (CT1)	-	-10.53	-8.27	-0.60	5.09	15.43
2. สารสกัดน้ำ (CT2)	-	36.45	38.65	39.78	37.27	37.90
Standard						
1. Curcumin	5.80	24.71	49.75	60.77	70.21	77.40

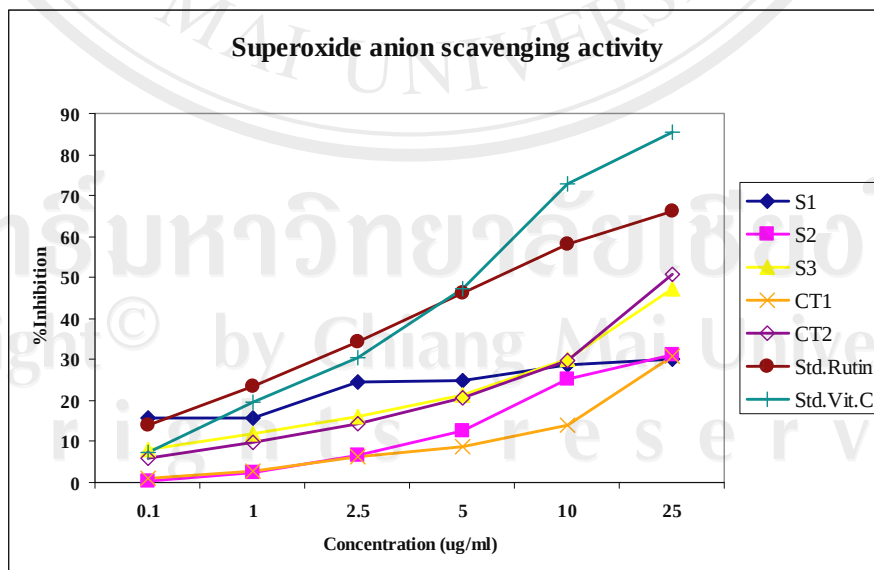


ภาพ 10 Nitric oxide scavenging activity ของสารสกัด

3.3 Scavenging effect on superoxide anion assay

ตาราง 8 Superoxide anion scavenging activity ของสารสกัด

Fraction	% Inhibition					
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)					
	0.1	1.0	2.5	5.0	10.0	25.0
<u>สารสกัดซึ่งสกัดตามความมีขี้ของ</u> <u>ตัวทำละลายตามลำดับ</u>						
1. สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (S1)	15.63	15.68	24.39	25.02	28.89	30.01
2. สารสกัดส่วนเอทานอล (S2)	0.38	2.44	6.66	12.71	25.33	31.20
3. สารสกัดส่วนน้ำ (S3)	8.03	11.99	16.28	21.52	30.06	47.27
<u>สารสกัดซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลาย</u> <u>ชนิดเดียว</u>						
1. สารสกัดเอทานอล (CT1)	1.12	2.84	6.26	8.70	13.91	30.65
2. สารสกัดน้ำ (CT2)	5.89	9.94	14.31	20.51	29.67	50.73
Standard						
1. Rutin	14.07	23.41	34.28	46.12	58.20	66.06
2. Vitamin C	7.30	19.54	30.31	47.44	72.70	85.44

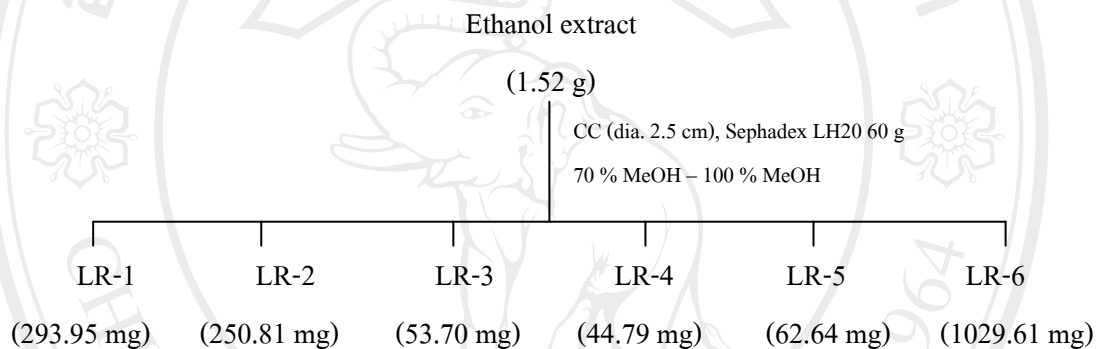


ภาพ 11 Superoxide anion scavenging activity ของสารสกัด

4. การแยกและทำให้บริสุทธิ์ควบคู่กับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.1 ผลการแยกสารสกัดส่วนเอทานอล

ทำการแยกสารสกัดส่วนเอทานอล (ครั้งละ 500 mg) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm) ด้วย sephadex LH20 (60 g) เริ่มต้นจากระบบตัวทำละลายของ methanol : H₂O 70 : 30, 80 : 20, 90 : 10 และ 100 % methanol ตามลำดับ และทำการเก็บ fraction ละ 50 ml จำนวน 31 fraction และทำการรวม fraction โดยการตรวจสอบด้วย TLC ได้ทั้งหมด 6 fraction และนำไปวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดย ABTS Method

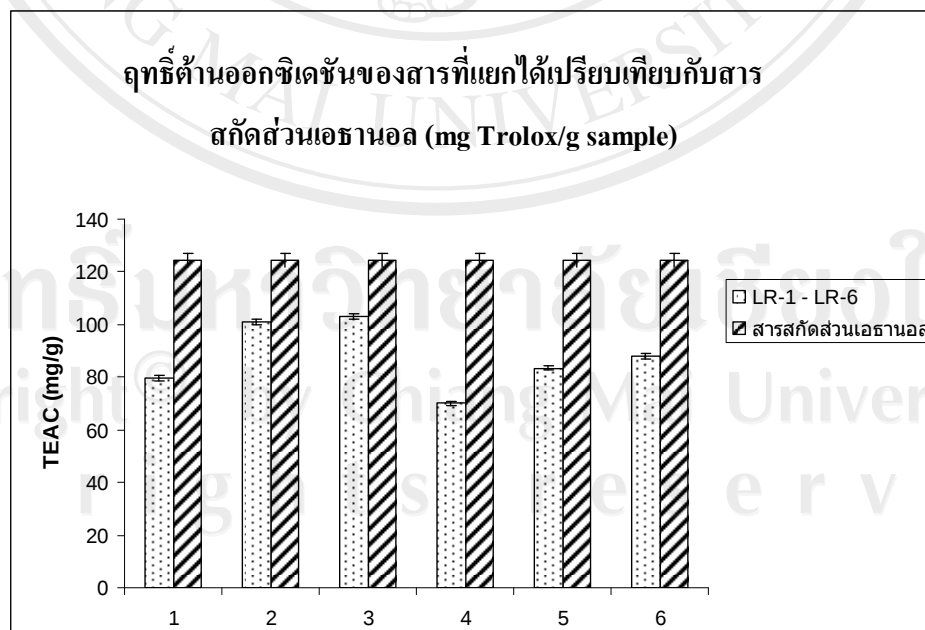


ภาพ 12 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารสกัดส่วนเอทานอล

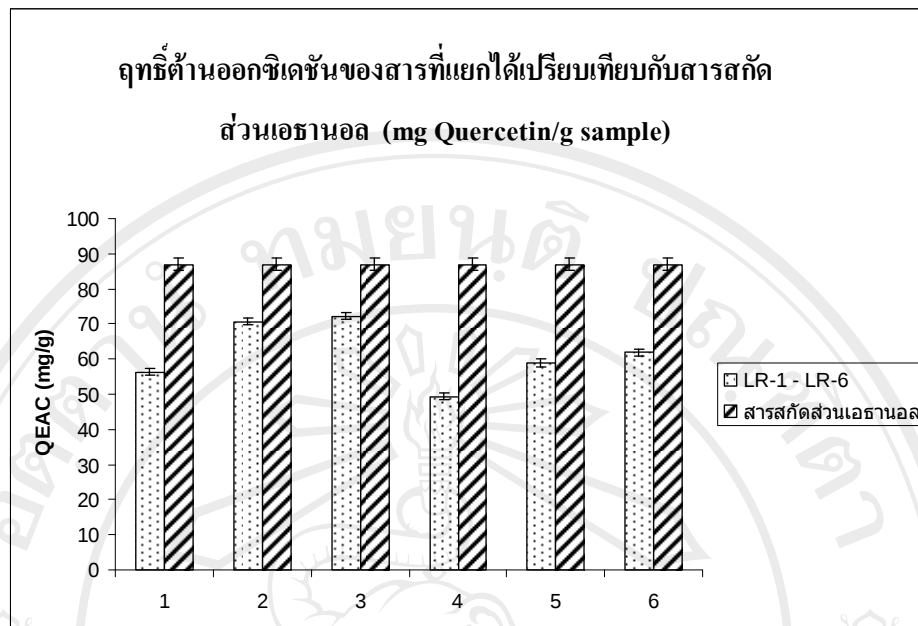
ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการแยกสารสกัดส่วนเอทานอลโดยวิธี ABTS

ตาราง 9 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการแยกสารสกัดส่วนเอทานอล

Fraction	% Inhibition	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบกับ Trolox (mg Trolox/g sample)	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบ กับ Quercetin (mg Quercetin/g sample)
1. สารสกัดส่วนเอทานอล	34.52 ± 0.70	124.45 ± 2.54	86.89 ± 1.73
2.LR-1	22.42 ± 0.23	79.67 ± 0.83	56.31 ± 0.57
3.LR-2	29.88 ± 0.28	100.76 ± 0.96	70.60 ± 0.65
4.LR-3	27.63 ± 0.28	102.88 ± 1.06	72.24 ± 0.72
5.LR-4	23.81 ± 0.17	70.03 ± 0.51	49.40 ± 0.35
6.LR-5	23.40 ± 0.74	83.52 ± 2.64	58.94 ± 1.80
7.LR-6	23.70 ± 0.36	87.78 ± 1.34	61.93 ± 0.92



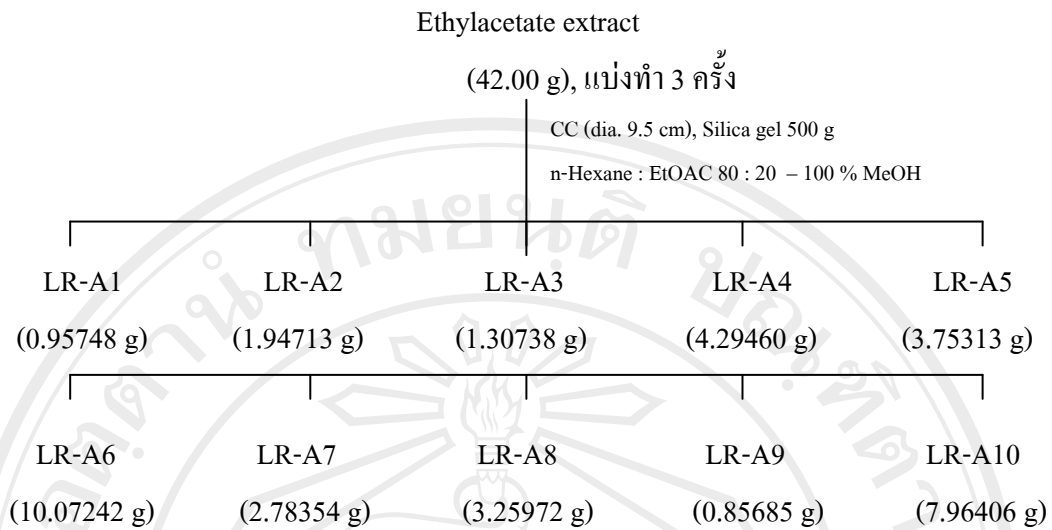
ภาพ 13 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่แยกได้เปรียบเทียบกับสารสกัดส่วนเอทานอล (mg Trolox / g sample)



ภาพ 14 แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่แยกได้เปรียบเทียบกับสารสกัดส่วนเอธานอล (mg quercetin / g sample)

4.2 การแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท

ทำการแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (แบ่งทำ 3 ครั้ง ครั้งละ 14 g) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 cm) ด้วย Silica gel (500 g, 70-230 mesh, cat. no. 7734, Merck) เริ่มต้นจากระบบตัวทำละลายของ n-Hexane : Ethylacetate 80 : 20 แล้วเพิ่มอัตราส่วนของ Ethylacetate ที่ละ 10 % จนกระทั่ง Ethylacetate เท่ากับ 100 % และเพิ่มอัตราส่วนของ methanol ที่ละ 10 % จนเป็น 100 % methanol ตามลำดับ และทำการเก็บ fraction ละ 500 ml จำนวน 47 fraction และทำการรวม fraction โดยตรวจสอบด้วย TLC ได้ทั้งหมด 10 fraction และนำไปวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน



ภาพ 15 แผนภูมิแสดงผลการแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท

4.2.1ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท

4.2.1.1 ABTS Method

ตาราง 10 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท

Fraction	% Inhibition	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบกับ Trolox (mg Trolox/g sample)	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบ กับ Quercetin (mg Quercetin/g sample)
1. สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท	31.90 ± 0.34	94.70 ± 0.95	75.89 ± 0.79
2. LR-A1	0.53 ± 0.29	8.31 ± 0.90	3.37 ± 0.75
3. LR-A2	1.78 ± 0.43	8.22 ± 0.91	4.47 ± 0.76
4. LR-A3	4.05 ± 0.07	20.20 ± 0.22	13.15 ± 0.18
5. LR-A4	3.60 ± 0.13	15.28 ± 0.35	9.72 ± 0.29
6. LR-A5	5.41 ± 0.17	24.93 ± 0.58	17.06 ± 0.48
7. LR-A6	36.70 ± 0.36	122.39 ± 1.15	98.58 ± 0.96
8. LR-A7	34.36 ± 0.17	100.25 ± 0.48	80.56 ± 0.40
9. LR-A8	25.31 ± 0.11	86.47 ± 0.36	68.60 ± 0.30
10. LR-A9	24.37 ± 0.46	81.10 ± 1.41	64.23 ± 1.17
11. LR-A10	22.21 ± 0.17	71.11 ± 0.51	56.04 ± 0.42

4.2.1.2 Scavenging effect on nitric oxide assay

ตาราง 11 Nitric oxide scavenging activity ของสารที่ได้จากการแยกสารสกัดส่วน
เอธิลอะซิเตท

Fraction	% Inhibition				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	1.0	5.0	12.5	25.0	50.0
1. สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท	1.27	4.24	6.21	8.40	9.99
2. LR-A1	0.12	-1.74	1.08	2.31	3.18
3. LR-A2	-7.85	-2.88	-3.65	0.08	1.11
4. LR-A3	-10.25	-8.94	-10.18	-8.86	-8.81
5. LR-A4	-63.86	-50.56	-43.94	-12.61	8.34
6. LR-A5	-23.58	0.56	1.50	2.75	2.83
7. LR-A6	33.12	32.08	32.49	42.04	37.25
8. LR-A7	-10.83	-12.77	-7.25	-4.48	7.49
9. LR-A8	0.57	4.06	5.28	6.42	10.56
10. LR-A9	-5.93	-2.32	9.67	16.95	11.43
11. LR-A10	-4.55	-0.42	2.34	9.84	14.88

4.2.1.3 Scavenging effect on superoxide anion assay

ตาราง 12 Superoxide anion scavenging activity ของสารที่ได้จากการแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท

Fraction	% Inhibition				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	0.1	1.0	2.5	5.0	10.0
1. สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท	15.63	15.68	24.39	25.02	28.89
2. LR-A1	3.50	6.47	6.40	7.89	9.02
3. LR-A2	-3.27	6.80	-6.06	-4.91	-1.60
4. LR-A3	-5.34	-13.06	-9.57	10.60	-7.60
5. LR-A4	7.39	16.42	19.34	20.61	29.70
6. LR-A5	8.41	12.26	17.55	20.22	26.23
7. LR-A6	14.98	17.12	19.40	38.01	52.24
8. LR-A7	9.35	14.15	20.68	26.74	39.93
9. LR-A8	3.38	6.96	13.05	21.84	34.28
10. LR-A9	0.37	1.98	4.92	12.84	27.79
11. LR-A10	1.15	3.02	6.68	10.11	24.47

จากผลการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่า fraction LR-A6 ให้ฤทธิ์ที่สูงที่สุด จึงนำมาแยกต่อเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ขึ้น

4.3 การแยก fraction LR-A6

ทำการแยกสาร LR-A6 (แบ่งทำ 3 ครั้ง ครั้งละ 3.00 g) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 cm) ด้วย Silica gel (280 g, 70-230 mesh, cat. no. 7734, Merck) เริ่มต้นจากระบบตัวทำละลายของ n-Hexane : Ethylacetate 80 : 20 แล้วเพิ่มอัตราส่วนของ Ethylacetate ทีละ 10 % จนกระทั่ง Ethylacetate เท่ากับ 100 % และเพิ่มอัตราส่วนของ methanol ทีละ 10 % จนเป็น 100 % methanol ตามลำดับ และทำการเก็บ fraction ละ 100 ml จำนวน 101 fraction และทำการรวม fraction โดยตรวจสอบด้วย TLC ได้ทั้งหมด 11 fraction และนำไปวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

LR-A6

(9.00 g) แบ่งทำ 3 ครั้ง

CC (dia. 4.5 cm), Silica gel 280 g

n-Hexane : EtOAc 80 : 20 – 100 % MeOH

LRA6-1 (0.05883 g)	LRA6-2 (0.54306 g)	LRA6-3 (0.70259 g)	LRA6-4 (2.20209 g)	LRA6-5 (0.71796 g)	LRA6-6 (0.45456 g)
LRA6-7 (2.70525 g)	LRA6-8 (0.23556 g)	LRA6-9 (0.65262 g)	LRA6-10 (0.15816 g)	LRA6-11 (0.29642 g)	

ภาพ 16 แผนภูมิแสดงผลการแยก fraction LR-A6

4.3.1ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการการแยก fraction LR-A6

4.3.1.1 ABTS Method

ตาราง 13 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการการแยก fraction LR-A6

Fraction	% Inhibition	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบกับ Trolox (mg Trolox/g sample)	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบ กับ Quercetin (mg Quercetin/g sample)
1. LR-A6	36.64 ± 1.21	154.99 ± 4.65	106.85 ± 3.20
2. LRA6-1	4.40 ± 0.12	18.98 ± 0.45	13.51 ± 0.31
3. LRA6-2	8.85 ± 0.07	32.46 ± 0.24	22.71 ± 0.16
4. LRA6-3	65.60 ± 0.72	256.30 ± 2.81	176.37 ± 1.92
5. LRA6-4	25.56 ± 0.88	101.70 ± 3.42	70.28 ± 2.34
6. LRA6-5	38.17 ± 0.77	139.70 ± 2.76	96.32 ± 1.89
7. LRA6-6	20.75 ± 0.39	83.00 ± 1.51	57.45 ± 1.04
8. LRA6-7	12.37 ± 0.57	50.35 ± 2.23	35.05 ± 1.53
9. LRA6-8	11.56 ± 0.25	43.34 ± 0.91	30.19 ± 0.62
10. LRA6-9	51.84 ± 0.92	194.37 ± 3.40	133.85 ± 2.33
11. LRA6-10	31.00 ± 0.46	112.81 ± 1.64	77.86 ± 1.12
12. LRA6-11	15.04 ± 0.15	50.45 ± 0.47	35.03 ± 0.33

4.3.1.2 Scavenging effect on nitric oxide assay

ตาราง 14 Nitric oxide scavenging activity ของสารที่ได้จากการแยก fraction LR-A6

Fraction	% Inhibition				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	1.0	5.0	12.5	25.0	50.0
1. LR-A6	33.12	32.08	32.49	42.04	37.25
2. LRA6-1	-6.63	-5.71	-3.12	-1.55	-0.41
3. LRA6-2	-17.63	-20.51	-19.43	-24.50	-51.27
4. LRA6-3	-5.97	-4.18	6.50	6.40	14.42
5. LRA6-4	-7.42	-3.65	1.02	2.87	5.74
6. LRA6-5	2.58	4.49	6.65	8.71	12.06
7. LRA6-6	-14.13	-12.20	-0.69	-0.80	6.83
8. LRA6-7	-26.21	-18.23	8.97	28.93	29.98
9. LRA6-8	3.29	6.40	12.24	15.54	16.34
10. LRA6-9	2.32	4.90	5.52	6.54	8.52
11. LRA6-10	-7.52	-4.72	0.12	1.85	2.27
12. LRA6-11	-12.32	-8.75	-5.23	-2.12	-0.12

4.3.1.3 Scavenging effect on superoxide anion assay

ตาราง 15 Superoxide anion scavenging activity ของสารที่ได้จากการแยก fraction LR-A6

Fraction	% Inhibition				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	1	2.5	5	10	100
1. LR-A6	14.98	17.12	19.40	38.01	52.24
2. LRA6-1	-0.62	7.57	20.72	13.29	-9.84
3. LRA6-2	1.46	12.26	14.89	16.04	24.18
4. LRA6-3	6.31	9.34	5.02	11.60	44.95
5. LRA6-4	1.62	3.64	8.32	12.86	19.05
6. LRA6-5	31.44	33.12	35.37	37.93	55.01
7. LRA6-6	-2.40	4.06	-11.50	-10.72	-25.24
8. LRA6-7	-3.00	-8.64	1.55	2.50	30.24
9. LRA6-8	12.54	10.43	12.91	25.65	20.96
10. LRA6-9	5.85	2.42	11.36	18.73	34.75
11. LRA6-10	-1.17	4.07	5.29	7.18	-14.00
12. LRA6-11	7.96	1.35	3.47	-5.83	-42.22

จากผลการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่า fraction LRA6-3 ให้ฤทธิ์ที่สูงที่สุด จึงนำมาแยกต่อเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ขึ้น

4.4 การแยก fraction LRA6-3

ทำการแยกสาร LRA6-3 (ครั้งละ 200 mg) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 cm) ด้วย Silica gel (60 g, 70-230 mesh, cat. no. 7734, Merck) เริ่มต้นจาก 100 % n-Hexane, n-Hexane : Ethylacetate 90 : 10 แล้วเพิ่มอัตราส่วนของ Ethylacetate ที่ละ 10 % จนกระทั่ง Ethylacetate เท่ากับ 100 % และเพิ่มอัตราส่วนของ methanol ที่ละ 10 % จนถึง 100 % methanol ตามลำดับ และทำการเก็บ fraction ละ 50 ml จำนวน 66 fraction และทำการรวม fraction โดยตรวจสอบด้วย TLC ได้ทั้งหมด 12 fraction และนำไปวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

LRA6-3

(200.00 mg), แบ่งทำ 3 ครั้ง

CC (dia. 2.0 cm), Silica gel 60 g

100 % n-Hexane, n-Hexane : EtOAc 90 : 10 – 100 % MeOH

LRA6-3-01	LRA6-3-02	LRA6-3-03	LRA6-3-04	LRA6-3-05	LRA6-3-06
(4.05 mg)	(20.21 mg)	(46.27 mg)	(184.14 mg)	(40.27 mg)	(37.86 mg)
LRA6-3-07	LRA6-3-08	LRA6-3-09	LRA6-3-10	LRA6-3-11	LRA6-3-12
(3.83 mg)	(7.59 mg)	(34.70 mg)	(71.34 mg)	(29.23 mg)	(42.53 mg)

ภาพ 17 แผนภูมิแสดงผลการแยก fraction LRA6-3

4.4.1ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการแยก fraction LRA6-3

4.4.1.1 ABTS Method

ตาราง 16 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการแยก fraction LRA6-3

Fraction	% Inhibition	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบกับ Trolox (mg Trolox/g sample)	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบ กับ Quercetin (mg Quercetin/g sample)
1. LRA6-3	50.02 ± 0.34	203.39 ± 1.46	134.96 ± 0.91
2. LRA6-3-01	4.63 ± 0.36	9.64 ± 1.53	14.23 ± 0.95
3. LRA6-3-02	8.85 ± 0.11	27.96 ± 0.48	25.77 ± 0.30
4. LRA6-3-03	14.90 ± 0.22	52.20 ± 0.93	40.58 ± 0.58
5. LRA6-3-04	44.53 ± 0.62	180.87 ± 2.65	120.98 ± 1.65
6. LRA6-3-05	53.71 ± 0.71	219.16 ± 0.73	144.79 ± 0.45
7. LRA6-3-06	70.47 ± 0.47	282.30 ± 1.88	183.88 ± 1.17
8. LRA6-3-07	55.24 ± 0.23	237.45 ± 2.48	156.61 ± 1.54
9. LRA6-3-08	55.02 ± 0.23	210.17 ± 0.93	138.65 ± 0.58
10. LRA6-3-09	82.00 ± 0.06	336.58 ± 0.27	217.84 ± 0.17
11. LRA6-3-10	85.03 ± 0.26	336.18 ± 1.05	217.28 ± 0.66
12. LRA6-3-11	24.60 ± 0.39	95.86 ± 1.70	68.06 ± 1.06
13. LRA6-3-12	19.67 ± 0.13	67.84 ± 0.51	49.85 ± 0.32

4.4.1.2 Scavenging effect on nitric oxide assay

ตาราง 17 Nitric oxide scavenging activity ของสารที่ได้จากการแยก fraction LRA6-3

Fraction	% Inhibition				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	1.0	5.0	12.5	25.0	50.0
1. LRA6-3	-6.21	-4.23	5.42	6.01	13.42
2. LRA6-3-01	-	-	-	-	-
3. LRA6-3-02	-	-	-	-	-
4. LRA6-3-03	-	-	-	-	-
5. LRA6-3-04	-	-	-	-	-
6. LRA6-3-05	-	-	-	-	-
7. LRA6-3-06	-	-	-	-	-
8. LRA6-3-07	-	-	-	-	-
9. LRA6-3-08	-	-	-	-	-
10. LRA6-3-09	1.18	1.48	5.06	6.84	12.09
11. LRA6-3-10	-0.56	-0.02	1.15	2.56	3.07
12. LRA6-3-11	-	-	-	-	-
13. LRA6-3-12	-	-	-	-	-

4.4.1.3 Scavenging effect on superoxide anion assay

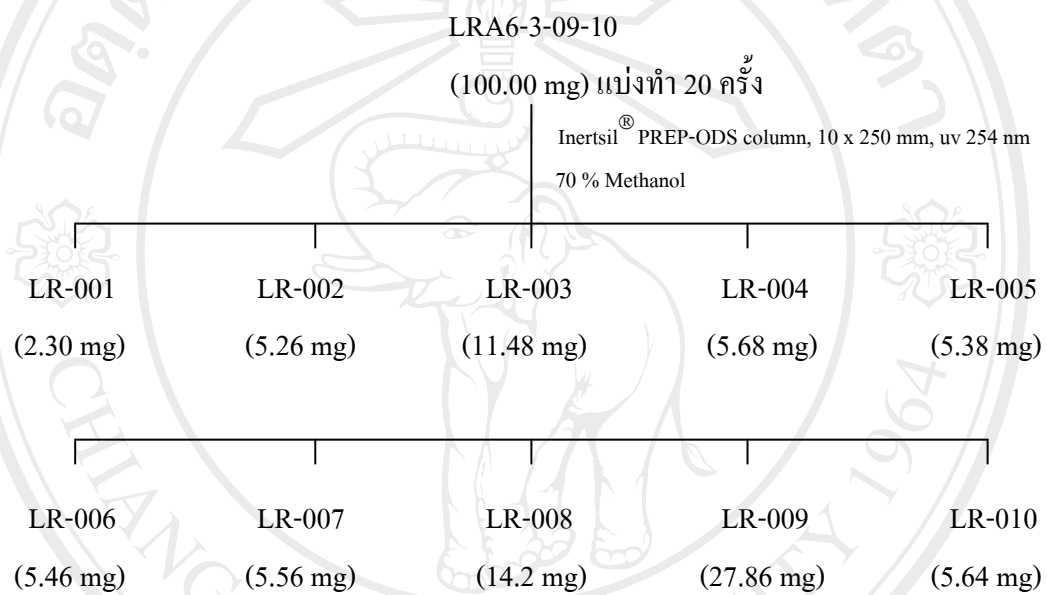
ตาราง 18 Superoxide anion scavenging activity ของสารที่ได้จากการแยก fraction LRA6-3

Fraction	% Inhibition				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	1.0	2.5	5.0	10.0	100.0
1. LRA6-3	6.31	9.34	5.02	11.60	44.95
2. LRA6-3-01	-1.53	-0.67	-1.99	2.06	24.52
3. LRA6-3-02	-3.29	-11.82	-7.28	-28.86	-69.95
4. LRA6-3-03	8.07	-3.27	-5.53	-6.75	6.29
5. LRA6-3-04	3.15	-8.08	4.07	-24.19	-1.48
6. LRA6-3-05	-10.98	-3.98	-20.84	-19.99	-35.72
7. LRA6-3-06	-11.63	-17.74	-6.69	-5.27	24.40
8. LRA6-3-07	-5.82	-0.65	12.02	13.84	20.58
9. LRA6-3-08	-15.65	-3.62	-9.17	10.16	31.39
10. LRA6-3-09	0.04	-2.27	1.58	15.39	13.63
11. LRA6-3-10	-7.52	-1.02	-4.42	-28.23	2.75
12. LRA6-3-11	-15.58	-4.81	5.21	28.96	29.88
13. LRA6-3-12	-3.26	-0.36	2.27	8.35	9.47

จากผลการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่า fraction LRA6-3-09 และ 10 ให้ฤทธิ์ที่สูงที่สุด และมี TLC pattern ที่ใกล้เคียงกัน จึงรวมและนำมาแยกในขั้นต่อไป

4.5 การแยก fraction LRA6-3-09-10

ทำการแยกสาร LRA6-3-09-10 (แบ่งทำ 20 ครั้ง ครั้งละ 5 mg) ด้วย Preparative HPLC (Inertsil® PREP-ODS column, 10 x 250 mm, UV 254 nm) flow rate 1.0 ml/min ระบบตัวทำละลาย 70 % Methanol และทำการเก็บ fraction ได้จำนวน 10 fraction และนำไปวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน



ภาพ 18 แผนภูมิแสดงผลการแยก fraction LRA6-3-09-10

4.5.1ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการแยก fraction LRA6-3-09-10

4.5.1.1 ABTS Method

ตาราง 19 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่ได้จากการแยก fraction LRA6-3-09-10

Fraction	% Inhibition	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบกับ Trolox (mg Trolox/g sample)	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบ กับ Quercetin (mg Quercetin/g sample)
1. LRA6-3-09-10	50.13 ± 1.13	317.07 ± 6.88	257.76 ± 5.74
2. LR-001	8.56 ± 0.13	29.82 ± 0.37	21.73 ± 0.31
3. LR-002	8.16 ± 0.40	32.63 ± 1.28	23.64 ± 1.06
4. LR-003	36.70 ± 0.33	121.79 ± 1.05	98.09 ± 0.88
5. LR-004	54.61 ± 0.74	179.89 ± 2.33	146.55 ± 1.95
6. LR-005	44.52 ± 1.34	289.95 ± 8.31	234.96 ± 6.94
7. LR-006	39.88 ± 0.20	128.65 ± 0.63	103.91 ± 0.52
8. LR-007	49.82 ± 1.82	336.51 ± 11.76	273.52 ± 9.82
9. LR-008	55.66 ± 1.69	368.38 ± 10.80	300.23 ± 9.01
10. LR-009	49.11 ± 1.27	340.88 ± 8.46	276.97 ± 7.06
11. LR-010	50.98 ± 1.47	169.57 ± 4.70	137.91 ± 3.93

4.5.1.2 Scavenging effect on nitric oxide

ตาราง 20 Nitric oxide scavenging activity ของสารที่ได้จากการแยก
fraction LRA6-3-09-10

Fraction	% Inhibition				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	0.1	1.0	2.5	5.0	10.0
1. LRA6-3-09-10	0.13	1.05	1.97	5.31	9.62
2. LR-001	-	-	-	-	-
3. LR-002	-	-	-	-	-
4. LR-003	-	-	-	-	-
5. LR-004	-	-	-	-	-
6. LR-005	-	-	-	-	-
7. LR-006	-	-	-	-	-
8. LR-007	-8.92	-8.59	-4.64	-2.69	8.16
9. LR-008	-3.24	-2.92	0.82	2.67	8.16
10. LR-009	-5.04	-4.72	-0.92	0.97	6.56
11. LR-010	-	-	-	-	-

4.5.1.3 Scavenging effect on superoxide anion

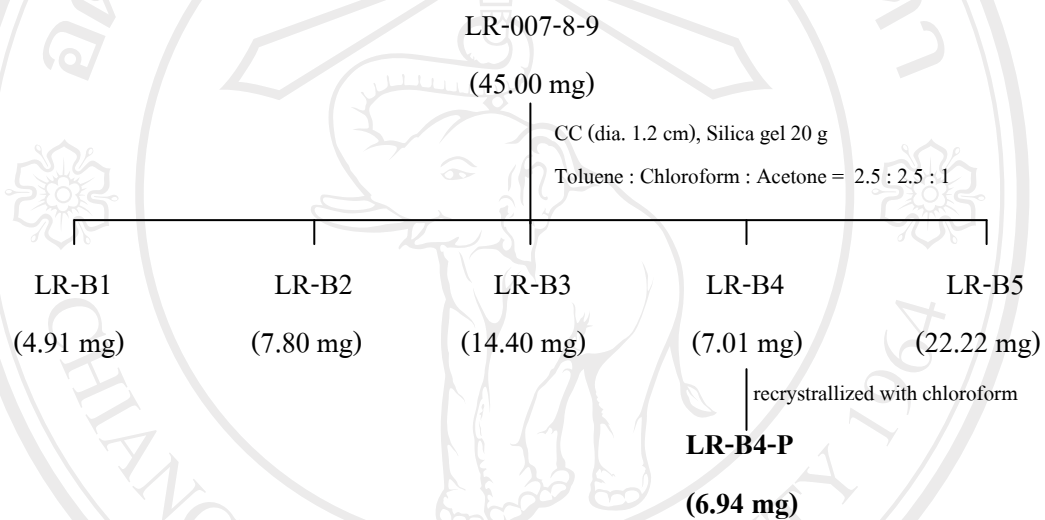
ตาราง 21 Superoxide anion scavenging activity ของสารที่ได้จากการแยก
fraction LRA6-3-09-10

Fraction	% Inhibition				
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	0.1	1.0	2.5	5.0	10.0
1. LRA6-3-09-10	1.35	-0.93	2.87	16.49	14.76
2. LR-001	-3.74	-8.54	-3.22	-11.63	-21.56
3. LR-002	-9.65	-4.52	-3.22	-1.87	-0.52
4. LR-003	1.23	-5.64	-7.85	-12.19	-4.49
5. LR-004	3.26	-7.54	-7.93	-2.14	-1.85
6. LR-005	0.52	2.25	3.01	2.28	6.35
7. LR-006	1.02	0.28	3.58	4.84	6.39
8. LR-007	2.09	2.17	3.88	4.57	12.59
9. LR-008	3.01	3.82	1.33	6.45	14.63
10. LR-009	1.88	2.61	1.25	6.36	17.68
11. LR-010	-3.85	-1.58	0.68	1.24	3.85

จากผลการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่า fraction LR-007, 008, 009 ให้ฤทธิ์ที่สูงที่สุด และมี TLC pattern ที่ใกล้เคียงกัน จึงรวมและนำมาแยกในขั้นต่อไป

4.6 การแยก fraction LR-007-8-9

ทำการแยกสาร LR-007-8-9 (45 mg) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 cm) ด้วย Silica gel (20 g, 230-400 mesh, cat. no. 9385, Merck) ในระบบตัวทำละลายของ Toluene : Chloroform : Acetone = 2.5 : 2.5 : 1 ทำการเก็บ fraction ละ 2 ml จำนวน 70 fraction และทำการรวม fraction โดยตรวจสอบด้วย TLC ได้ทั้งหมด 5 fraction

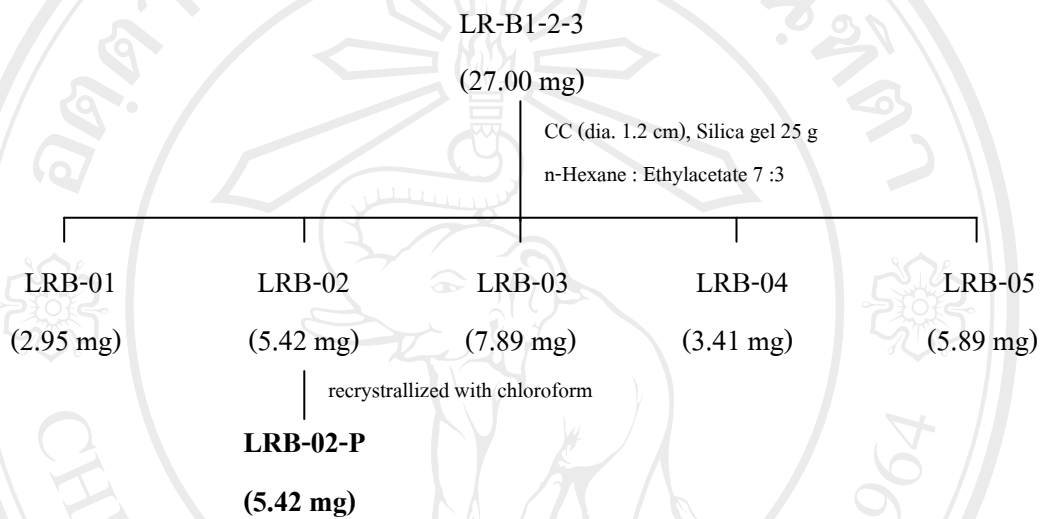


ภาพ 19 แผนภูมิแสดงผลการแยก fraction LR-007-8-9

จากผลการตรวจสอบด้วย TLC พบว่า fraction LR-B4-P ค่อนข้างบริสุทธิ์ และทำการรวม fraction LR-B1, B2, B3 เนื่องจากให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย DPPH spraying reagent เป็น LR-B1-2-3 และนำมาแยกต่อเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ต่อไป

4.7 การแยก fraction LR-B1-2-3

ทำการแยกสาร LR-B1-2-3 (27.00 mg) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 cm) ด้วย Silica gel (25 g, 230-400 mesh, cat. no. 9385, MercK) ในระบบตัวทำละลายของ n-Hexane : Ethylacetate 7 :3 ทำการเก็บ fraction ละ 2 ml จำนวน 45 fraction และทำการรวม fraction โดยตรวจสอบด้วย TLC ได้ทั้งหมด 5 fraction

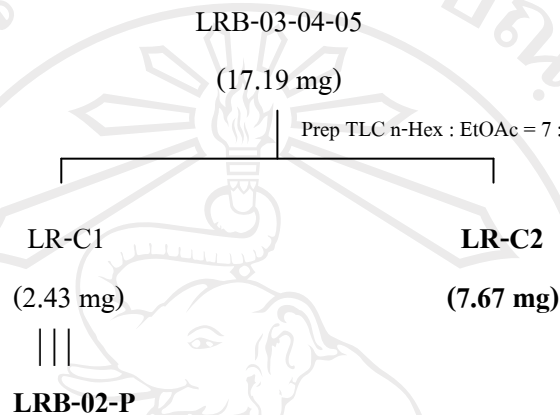


ภาพ 20 แผนภูมิแสดงผลการแยก fraction LR-B1-2-3

จากผลการตรวจสอบด้วย TLC พบว่า fraction LRB-02-P ค่อนข้างบริสุทธิ์ และทำการรวม fraction LRB-03, 04, 05 เนื่องจากให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย DPPH spraying reagent เป็น LRB-03-04-05 และนำมาแยกในขั้นต่อไป

4.8 การแยก fraction LRB-03-04-05

ทำการแยกสาร LRB-03-04-05 (17.19 mg) ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ Silica gel GF 254 ชนิด Aluminium sheet ขนาดความหนา 0.25 mm (20 x 20 cm, Merck) ในระบบตัวทำละลายของ n-Hexane : Ethylacetate 7 : 3 band ที่ต้องการชะด้วย Ethylacetate



ภาพ 21 แผนภูมิแสดงผลการแยก fraction LRB-03-04-05

จากผลการตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ชนิด พบว่า fraction LR-C2 ให้ spot เดียวบน TLC

5. การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์ที่ได้

ตาราง 22 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารบริสุทธิ์ที่ได้

Fraction	% Inhibition	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบกับ Trolox (mg Trolox/g sample)	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของตัวอย่าง 1 g เทียบ กับ Quercetin (mg Quercetin/g sample)
1. LR-B4-P	2.56 ± 0.38	30.01 ± 2.46	17.78 ± 2.05
2. LRB-02-P	61.98 ± 0.91	412.32 ± 5.83	336.85 ± 4.86
3. LR-C2-P	76.60 ± 0.79	506.40 ± 5.11	415.36 ± 4.27

6. การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปี

6.1 LR-B4-P

- มีลักษณะเป็นผงสีขาว
- ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย TLC Chromatography ใน DVS ของ Chloroform : Methanol = 95 : 5 และ n-Hexane : Ethylacetate = 7:3 พบว่าไม่ปรากฏ spot ใด ๆ เมื่อส่องภายใต้แสง UV ทั้ง 254 และ 365 nm เมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde in H_2SO_4 แล้วนำไปอบที่ 105°C 5 นาที ให้ spot สีม่วง
- IR Spectrum พบว่ามี $\text{C}=\text{O}$ (1643.90 cm^{-1})

6.2 LRB-02-P

- มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง
- ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย TLC Chromatography ใน DVS ของ Chloroform : Methanol = 95 : 5 และ n-Hexane : Ethylacetate = 7:3 เมื่อส่องภายใต้แสง UV 254 ให้ spot ทึบ เมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde in H_2SO_4 แล้วนำไปอบที่ 105°C 5 นาที ให้ spot สีนํ้าเงิน และเมื่อสเปรย์ด้วย 1 % FeCl_3 ให้สีนํ้าเงิน
- λ_{max} 292 (in Methanol)
- IR Spectrum พบว่ามี $\text{O}-\text{H}$ (3331.77 cm^{-1}) $\text{C}-\text{H}$ (2923.78 cm^{-1}) และ $\text{C}=\text{O}$ (1644.07 cm^{-1})

6.3 LR-C2

- มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง
- ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย TLC Chromatography ใน DVS ของ Chloroform : Methanol = 95 : 5 และ n-Hexane : Ethylacetate = 7:3 เมื่อส่องภายใต้แสง UV 254 ให้สีนํ้าตาลทึบ เมื่อสเปรย์ด้วย anisaldehyde in H_2SO_4 แล้วนำไปอบที่ 105°C 5 นาที ให้ spot สีเหลือง และเมื่อสเปรย์ด้วย 1 % FeCl_3 ให้สีนํ้าเงิน
- λ_{max} 291 (in Methanol)
- IR Spectrum พบว่ามี $\text{O}-\text{H}$ (3285.85 cm^{-1}) $\text{C}-\text{H}$ (2923.34 cm^{-1}) และ $\text{C}=\text{O}$ (1643.80 cm^{-1})