

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

เจื่องแข้งม้า (*Leea rubra* Blume ex Spreng.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Leeaceae ที่นำมาใช้เป็นสมุนไพรหลักชนิดหนึ่งในตำรับยารักษามะเร็งโกลของหมอพื้นบ้านในเขตภาคเหนือตอนบน ซึ่งส่วนที่นำมาใช้เป็นยาคือ รากหรือลำต้น โดยหมอพื้นบ้านให้ข้อมูลว่า หากใช้รากจะให้ฤทธิ์ที่แรงกว่าการใช้ลำต้น แต่ในปัจจุบันไม่สามารถหาส่วนของรากที่อายุเหมาะสมมาใช้เป็นยาในปริมาณมากได้ ในตำรับยาของหมอพื้นบ้าน ได้นำส่วนลำต้น, กิ่งที่มีอายุมาใช้ โดยให้ข้อมูลว่าส่วนลำต้นสามารถใช้ทดแทนส่วนรากได้ โดยอายุของพืชที่จะให้ฤทธิ์ทางยา คือ 2-3 ปีขึ้นไป ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างพืชจาก อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ โดยเป็นพืชที่มีอายุ 2 ปีขึ้นไป พืชสมุนไพรที่เก็บมานำมาลดขนาด และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นอกจากนั้นยังทำการเก็บตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของพืชตัวอย่าง ได้แก่ ใบ, ดอก, ผล เพื่อจัดทำ herbarium specimen และนำตัวอย่างไปตรวจสอบโดยเทียบกับตัวอย่าง herbarium specimen ที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยในการตรวจสอบนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาววรรณรี เจริญทรัพย์ (นักพฤกษศาสตร์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

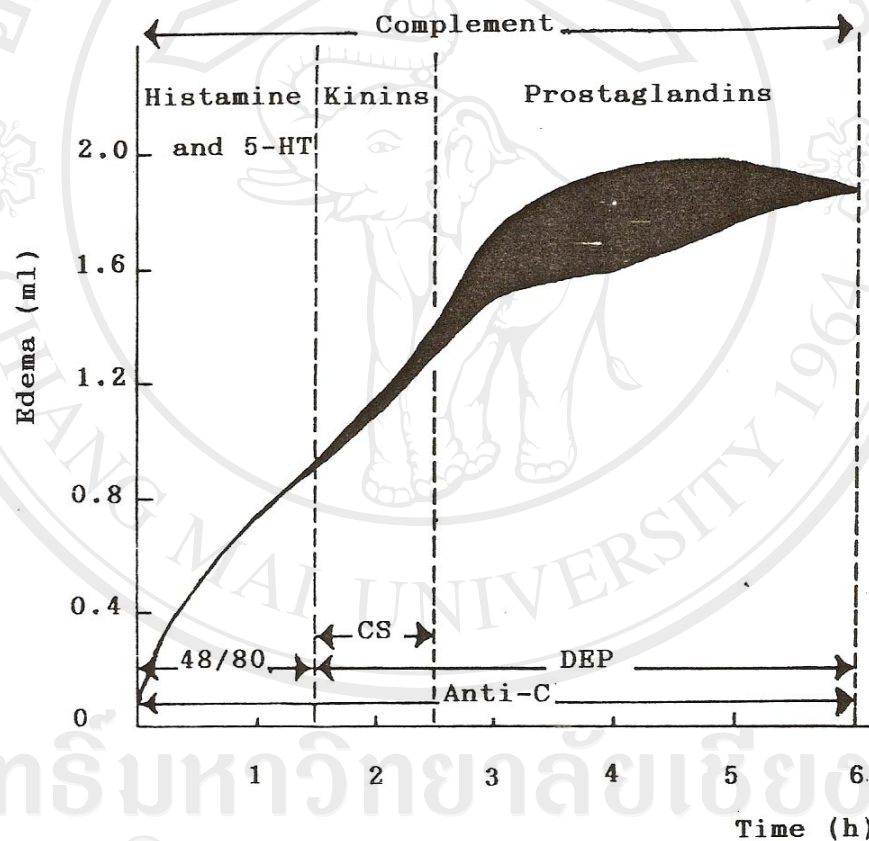
ลำต้นเจื่องแข้งม้าแห้ง เมื่อทำการบดเป็นผงนำไปสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง ด้วย Soxhlet's apparatus สำหรับตัวทำละลายอินทรีย์ และวิธีการ reflux ด้วยน้ำ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มแรกเป็นการสกัดซึ่งสกัดตามความเข้มข้นของตัวทำละลาย 3 ชนิด โดยเริ่มจากเอธิลอะซิเตต, เอทานอล , และน้ำ ตามลำดับ ซึ่งกลุ่มตัวอย่างนี้จะนำไปแยกสารสำคัญ เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป กลุ่มที่ 2 เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว ได้แก่ การสกัดด้วยเอทานอล จะสกัดเอาสารสำคัญที่มีคุณสมบัติขี้และมีขี้ ออกมาก และการสกัดด้วยน้ำ จะเป็นการสกัดที่เลียนแบบการใช้ของหมอพื้นบ้านคือ การต้ม จากนั้นสารสกัดทุกส่วนจะศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและฤทธิ์ด้านการอักเสบ

เนื่องจากเจื่องแข้งม้าเป็นสมุนไพรหลักที่ใช้ในตำรับยารักษามะเร็งโกล ซึ่งหมอพื้นบ้านได้ให้ข้อมูลว่าพืชชนิดนี้ให้สรรพคุณบรรเทาอาการปวด และอักเสบในตำรับนี้ ในการศึกษาครั้งนี้จึง

มุ่งเน้นไปที่การตรวจสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยทดสอบในสัตว์ทดลอง และทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันโดยประเมินถึงความสามารถในการจัดอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดในสัตว์ทดลอง โดยวิธี carrageenin-induced rat paw edema ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่ใช้ศึกษาการอักเสบในระยะเฉียบพลัน โดยการกระตุ้นเท้าหนูขาวให้บวมด้วยการฉีด 1 % carrageenin เข้าที่อุ้งเท้า แล้วทำการเปรียบเทียบขนาดของอุ้งเท้าหนูขาวที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในกลุ่มที่ได้รับการป้อนด้วยสารสกัดเชิงแข็งม้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ซึ่งกลไกการทำให้เกิดการอักเสบของ carrageenin นั้นในช่วงชั่วโมงแรกจะเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการปลดปล่อยของ histamine และ serotonin และต่อมาจะปลดปล่อย bradykinin และชั่วโมงที่ 3 จะเป็นการปลดปล่อย prostaglandins ซึ่งเป็นช่วงที่สำคัญที่ใช้ศึกษาสารที่มีความเกี่ยวข้องกับ prostaglandin-biosynthesis pathway^(20, 42) ดังแสดงในภาพ 22 ในการทดลองนี้พบว่าที่ชั่วโมงที่ 3 การบวมของอุ้งเท้าหนูขาวลดลงทุกกลุ่ม โดยพบว่าหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดซึ่งสกัดตามความมีขั้วของตัวทำละลาย ที่ได้รับสารสกัดส่วนเอธานอล ขนาด 400 mg/kg มีการบวมของอุ้งเท้าลดลงมากที่สุด (ร้อยละ 33.55) รองลงมาคือหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท ขนาด 100 mg/kg (ร้อยละ 31.93) และหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดส่วนน้ำ ขนาด 400 mg/kg (ร้อยละ 31.27) ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ระงับการอักเสบประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับยามาตรฐานแอสไพริน ขนาด 300 mg/kg (ร้อยละ 50.88) ในขณะที่หนูขาวที่ได้รับสารสกัดเอธานอลและน้ำสามารถลดการบวมของอุ้งเท้าหนูขาวร้อยละ 23.83 และ 17.69 ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่าสารสกัดซึ่งสกัดตามความมีขั้วของตัวทำละลาย ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากการสกัดโดยตรงอาจจะมีสารอื่นที่มีผลต่อการดูดซึม หรืออาจจะส่งผลต่อความเข้มข้นของสารที่มีฤทธิ์ในร่างกาย จึงทำให้สารที่มีฤทธิ์นั้นออกฤทธิ์ได้ไม่เต็มที่

ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาในขนาดเดียว โดยทำการศึกษาส่วนใหญ่ที่ขนาด 400 mg/kg ซึ่งเป็นขนาดที่ Reanmongkol⁽³³⁾ ได้ทำการศึกษาไว้ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบ % Inhibition ก็จะบอกได้เพียงว่าสารสกัดส่วนใดมีความแรง (potency) มากกว่ากันเพียงใด ส่วนในแง่ประสิทธิผล (efficacy) นั้นจะสามารถประเมินได้จากผลการยับยั้งการบวมได้สูงสุด ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษาในการศึกษารั้งนี้ เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องปริมาณของสารที่จะใช้ในการทดสอบในสัตว์ทดลอง ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาถึงประสิทธิผลของสารสกัด ซึ่งมีความสำคัญทางคลินิกเพิ่มเติมต่อไป อย่างไรก็ตาม ความแรงของสารสกัดเชิงแข็งม้าในทุกส่วนสกัด มีความแรงน้อยกว่าแอสไพริน เมื่อเปรียบเทียบความแรงของส่วนสกัดต่างๆ ของเชิงแข็งม้า สารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตทมีความแรงสูงสุด แต่ก็มีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดความเป็นพิษสูงเช่นกัน

ในการศึกษานี้พบว่าหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท ขนาด 400 mg/kg ตายทั้งหมด โดยหนูขาวมีอาการซึม ตัวเกร็ง เคลื่อนไหวลดลง มีเลือดออกทางจมูก และหายใจมีเสียง และตายภายใน 1 ชั่วโมงแรก ซึ่งคาดว่าพิษของสารสกัดเป็นผลต่อระบบทางเดินหายใจ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการออกฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง หรือการอุดกั้นทางเดินหายใจ เมื่อลดขนาดสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท เป็นขนาด 200 mg/kg พบว่า หนูขาวตายทั้งหมด 2 ตัวจากที่ได้รับสารสกัดจำนวน 3 ตัว โดยมีอาการเช่นเดียวกัน ในการทดลองนี้จึงได้ทำการลดขนาดของสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตทเป็น 100 mg/kg พบว่าจากหนูขาวทั้งหมด 6 ตัว มีหนูขาวตาย 1 ตัว ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง



ภาพ 22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและสารสื่อกลางที่หลั่งออกมาหลัง

จากการกระตุ้นด้วย carrageenin ⁽⁴²⁾

จากผลที่ได้แสดงว่าสารสกัดเชิงแข็งม้าในทุกส่วนที่ทดสอบมีแนวโน้มให้ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และเมื่อพิจารณาจากรายงานผลการศึกษาของ Reanmongkol พบว่าสารสกัดเมธานอลจากส่วนรากเชิงแข็งม้า มีฤทธิ์ระงับปวดโดยผ่านทางระบบประสาทส่วนปลายและมีฤทธิ์ลดไข้ใน

ระดับปานกลางเมื่อเทียบกับยาแอสไพริน⁽³³⁾ จากผลการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าว สนับสนุนข้อมูลการใช้เชิงแข็งม้ในตำรับยารักษามะโหะของหมอฟันบ้าน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ระงับปวดจากส่วนสกัดจากลำต้น ซึ่งควรศึกษาเพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้วิธีใช้ตำรับยารักษามะโหะของหมอฟันบ้านโดยการดื่มน้ำ นับว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสม เนื่องจากทุกส่วนของสารสกัด มีแนวโน้มให้ฤทธิ์ด้านการอักเสบและน่าจะปลอดภัย เนื่องจากผลของส่วนสกัดเอธิลอะซิเตทมีแนวโน้มของความเป็นพิษแต่ไม่พบความเป็นพิษดังกล่าวในสารสกัดส่วนน้ำ ดังนั้นการดื่มน้ำทำให้สารที่ถูกสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทที่ค่อนข้างมีขี้ดจะละลายออกมาน้อย ซึ่งในการศึกษาในระยะต่อไปควรจะทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารสกัดเชิงแข็งม้อย่างละเอียดเพื่อยืนยันถึงความปลอดภัยในการใช้ส่วนต้นของเชิงแข็งม้เป็นส่วนของตำรับยารักษามะโหะของหมอฟันบ้าน

จากกลไกการทำให้เกิดการอักเสบโดยการกระตุ้นด้วย carrageenin นั้นจะเห็นว่ากลไกสำคัญที่ใช้ในการศึกษาจะเกี่ยวข้องกับ prostaglandin-biosynthesis pathway ดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Sautebin และคณะ⁽⁴³⁾ ได้ทำการศึกษาถึงผลของ endogenous nitric oxide ต่อ prostaglandin -biosynthesis ใน carrageenin-induced rat paw edema พบว่า การให้ L-arginine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ ทำให้อุ้งเท้าหนูขาวมีการบวมเพิ่มมากขึ้นและปริมาณของ PGE₂ เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ในขณะที่เมื่อให้ L-NAME ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น nitric oxide synthase inhibitor และ haemoglobin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น NO scavenger พบว่ามีผลทำให้การบวมของอุ้งเท้าหนูขาวลดลง และปริมาณของ PGE₂ ลดลงเช่นกัน จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า endogenous NO จะถูกสร้างขึ้นบริเวณที่เกิดการอักเสบ และทำให้เกิดการบวมมากขึ้นด้วย โดยไปเพิ่มการสังเคราะห์ prostaglandin ดังนั้นในการทำให้เกิดการอักเสบโดยการกระตุ้นด้วย carrageenin นั้น ไนตริกออกไซด์เป็นสารสื่อกลางที่มีความสัมพันธ์ที่ทำให้เกิดการบวมของอุ้งเท้าหนูขาว การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในสัตว์ทดลองนั้น อาจจะเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมสำหรับการติดตามผลในระหว่างการแยกสารองค์ประกอบสำคัญ เนื่องจากสารสกัดที่ได้ในแต่ส่วนของสารสกัดมีปริมาณน้อย และขั้นตอนการทดสอบในสัตว์ทดลองมีความยุ่งยากดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันโดยการศึกษาถึงความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์สามารถที่จะทำนายแนวโน้มของสารที่ให้ฤทธิ์ด้านการอักเสบที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นจากความสัมพันธ์ของอนุมูลอิสระต่อการอักเสบในการวิจัยนี้ได้จึงทำการศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันโดยอาศัยความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+}, ไนตริกออกไซด์ และซูเปอร์ออกไซด์ ซึ่งอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ และซูเปอร์ออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกาย

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยใช้วิธี ABTS ของสารสกัดที่สกัดตามความมีขี้ของตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดส่วนเอทานอลมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด (TEAC = 123.64 mg/g, QEAC = 86.89 mg/g) รองลงมาคือ สารสกัดส่วนน้ำ (TEAC = 107.85 mg/g, QEAC = 75.72 mg/g) และสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (TEAC = 88.54 mg/g, QEAC = 62.06 mg/g) ในขณะที่สารสกัดซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว พบว่าสารสกัดน้ำ (TEAC = 123.34 mg/g, QEAC = 86.22 mg/g) มีฤทธิ์ที่สูงกว่าสารสกัดเอทานอล (TEAC = 116.66 mg/g, QEAC = 81.74 mg/g)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยอาศัยวิธี scavenging effect on nitric oxide ของสารสกัดที่สกัดตามความมีขี้ของตัวทำละลาย พบว่าที่ความเข้มข้น 50.0 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดส่วนน้ำมี % Inhibition สูงที่สุด คือ 42.81 % รองลงมาคือ สารสกัดส่วนเอทานอล (11.68 %) และสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (9.99 %) ในขณะที่สารสกัดซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว พบว่าสารสกัดน้ำ (37.90 %) มี % Inhibition ที่สูงกว่าสารสกัดเอทานอล (15.43 %)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยอาศัยวิธี scavenging effect on superoxide anion ของสารสกัดที่สกัดตามความมีขี้ของตัวทำละลาย พบว่าที่ความเข้มข้น 50.0 $\mu\text{g/ml}$ สารสกัดส่วนน้ำมี % Inhibition สูงที่สุด คือ 47.27 % รองลงมาคือ สารสกัดส่วนเอทานอล (31.20 %) และสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตท (30.01 %) ในขณะที่สารสกัดซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียว พบว่าสารสกัดน้ำ (50.73 %) มี % Inhibition ที่สูงกว่าสารสกัดเอทานอล (30.65 %)

จะพบว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้ง 3 วิธีนี้ ให้ผลที่ไปในทิศทางเดียวกัน คือส่วนของสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ดีจะเป็นสารที่มีขี้สูง ซึ่งอยู่ในส่วนของสารสกัดเอทานอลและน้ำ ซึ่งให้ผลต่างกับสารสกัดเอธิลอะซิเตทอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกัน คือสารที่ให้ฤทธิ์ดีจะเป็นสารที่มีขี้สูงเช่นเดียวกัน

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดส่วนเอทานอลให้ฤทธิ์ที่ดีที่สุด (ขนาด 400 mg/kg % EI = 33.55) จึงนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยติดตามฤทธิ์ต้านออกซิเดชันควบคู่ไป โดยแยกสารสกัดส่วนเอทานอลด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ Sephadex LH20 ได้สารทั้งหมด 6 ส่วน เมื่อทำการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS พบว่าทุกส่วนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดส่วนเอทานอลก่อนทำการแยก ดังผลในตารางที่ 9 และจากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่ามีสารสกัดติดค้างอยู่ในคอลัมน์ ดังนั้นฤทธิ์ที่ลดลงนี้อาจเนื่องมาจากสารที่ให้ฤทธิ์นั้นติดค้างในคอลัมน์ หรือฤทธิ์ที่ติดนั้นเป็นผลร่วมกันของสารที่ถูกแยกมาแต่ละส่วน ซึ่งหากจะทำการแยกต่อไปควรหา stationary phase ชนิดอื่นที่

เหมาะสม เนื่องจากสารในส่วนนี้ค่อนข้างจะมีขี้สูง ไม่สามารถใช้ silica gel ในการแยกได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตตมาแยกเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี เนื่องจากสารสกัดส่วนนี้ทำให้ฤทธิ์ที่ดีในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง ในการติดตามฤทธิ์ด้านออกซิเดชันใช้วิธี ABTS เนื่องจากวิธีนี้เมื่อแยกสารให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น จะติดตามผลของสารแต่ละชนิดได้ชัดเจนกว่า ขณะที่วิธี scavenging effect on nitric oxide และ scavenging effect on superoxide anion นั้นให้ผลที่ไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากวิธีทั้ง 2 วิธีนี้ เหมาะสมกับการทดสอบสารที่มีขี้ และเมื่อทำการทดสอบกับสารที่มีขี้พบว่าสารละลายที่ทำการวัดมีลักษณะขุ่นจึงทำให้ผลที่ได้อาจจะไม่ใช่ฤทธิ์ที่แท้จริง ซึ่งในการทดลองต่อไปควรจะหาวิธีการทดสอบที่เหมาะสม

จากการแยกโดยอาศัยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี, preparative HPLC และ preparative TLC ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 3 ชนิด คือ LR-B4-P, LRB-02-P และ LR-C2 ซึ่งฤทธิ์ด้านออกซิเดชันเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox มีค่า TEAC เท่ากับ 30.01, 412.32 และ 506.40 mg/g และเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin มีค่า QEAC เท่ากับ 17.78, 336.85 และ 415.36 mg/g เรียงตามลำดับ ซึ่งพบว่า LRB-02 และ LR-C2 ให้ฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตต 7-8 เท่า สารสกัดเอธานอล 5-6 เท่า แต่พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้ให้ฤทธิ์ที่ต่ำในการทดสอบด้วย วิธี scavenging effect on nitric oxide และ superoxide anion ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากค่าการละลายของสารที่ไม่ละลายในวิธีการทดสอบทั้งสองนี้

จากผลการแยกสารสกัดส่วนเอธิลอะซิเตตนั้น เมื่อแยกเป็นสารบริสุทธิ์ แม้ว่าจะให้ฤทธิ์ที่สูงขึ้น แต่จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันนั้น สารสกัดส่วนเอธานอลและน้ำ เป็นสารสกัดส่วนที่ให้ฤทธิ์ที่ดี ซึ่งน่าจะมีการศึกษาถึงสารองค์ประกอบที่ให้ฤทธิ์ต่อไป และนอกจากนี้น่าจะศึกษาถึงความเป็นพิษในสารสกัดเชิงแข็งมาทั้งหมดเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบว่าพิษชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อระบบหรืออวัยวะส่วนใดของร่างกาย เพื่อใช้เป็นข้อมูลยืนยันถึงความปลอดภัยในการใช้ของหมอพื้นบ้านต่อไป

จากการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปีของสารที่แยกได้พบว่า LR-B4-P เป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ เนื่องจากให้สีชมพู กับ anisaldehyde in H_2SO_4 และจาก IR spectrum พบว่ามี $C=O$ (1643.90 cm^{-1})

จากการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และสเปกโทรสโกปี ของ LRB-02-P และ LR-C2 พบว่า LRB-02-P มี λ_{max} เท่ากับ 292 nm (in Methanol) และจาก IR Spectrum พบว่ามี O-H (3331.77 cm^{-1}) C-H (2923.78 cm^{-1}) และ $C=O$ (1644.07 cm^{-1}) และ LR-C2 มี λ_{max} เท่ากับ 291 nm (in Methanol) IR Spectrum พบว่ามี O-H (3285.85 cm^{-1}) C-H (2923.34)

cm^{-1}) และ C=O (1643.80 cm^{-1}) ซึ่งจากข้อมูล UV absorption พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติสอดคล้องกับสารกลุ่มฟลาโวนอน ดังตาราง 23

หลังจากการตรวจสอบฤทธิ์ เนื่องจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้นั้นมีปริมาณน้อย จึงทำให้ไม่เพียงพอที่จะทำการตรวจพิสูจน์ยืนยันโครงสร้างด้วย NMR ต่อไปได้ จึงทำการตรวจพิสูจน์ด้วย UV และ IR เท่านั้น ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงชนิดของกลุ่มสารได้ ดังนั้นในการตรวจพิสูจน์สูตรโครงสร้างจึงจำเป็นที่จะต้องทำการแยกสารให้ได้ปริมาณที่มากขึ้น

ตาราง 23 แสดง UV absorption ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด^(8, 10)

Band II (nm)	Band I (nm)	Flavonoid type
250-280	310-350	Flavone
250-280	330-360	Flavonols (3-OH substituted)
250-280	350-385	Flavonols (3-OH free)
245-275	310-330 shoulder	Isoflavones
	c. 320 peak	Isoflavones (5-deoxy-6,7-dioxygenated)
275-295	300-330 shoulder	Flavanones
230-270	340-390	Chalcones
(low intensity)		
230-270	380-430	Aurones
(low intensity)		