สารต้านอนุมูลอิสระจากเอื้องครั่ง

นายณภัทร เกี่ยวข้อง 5436529533

นายวิรุฬห์ คงคติธรรม 5436577633

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Free radical scavengers from *Dendrobium parishii*

Napat Kyokong 5436529533

Virunh Kongkititham 5436577633

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Doctor of Pharmacy Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2015

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

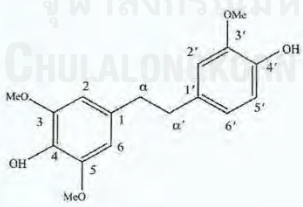
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โครงการลำดับที่ 3.1
ปีการศึกษา 2558

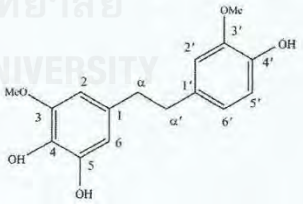
บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ : สารต้านอนุมูลอิสระจากเอื้องครั่ง
หัวหน้าโครงการ : นายวิรุฬห์ คงคติธรรม 5436577633
ผู้ร่วมโครงการ : นายณภัทร เกี่ยวข้อง 5436529533
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ภก. ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์ ศ. ภก. ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ
สาขา/ภาควิชา : การค้นพบยาและพัฒนายา/เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

กล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางยาอย่างแพร่หลายในทวีปเอเชีย อีกทั้งในปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกล้วยไม้สกุลนี้ และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลของเอื้องครั่ง พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึงร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดแยกสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีจาก *Dendrobium parishii* หรือเอื้องครั่ง และพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะใช้วิธี Bioassay guided fractionation ในการคัดกรองฤทธิ์ในแต่ละขั้นของการแยกสกัด ส่วนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จะใช้วิธีทาง column chromatography ผ่าน silica gel column และ Sephadex LH-20 column อีกทั้งยังใช้วิธี thin layer chromatography มาช่วยในการหา solvent system ที่เหมาะสมในการสกัดและช่วยทำนายแนวโน้มการสกัดได้ จากนั้นนำสารที่ได้ไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ NBT superoxide scavenging assay โดยผลการวิจัยพบว่าสามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด และเมื่อนำสารดังกล่าวไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี พบว่าเป็นสาร moscatilin **(1)** และ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl **(2)** ซึ่งจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสาร moscatilin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.3 ไมโครโมลาร์ และสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.7 ไมโครโมลาร์ ส่วนจากการทดสอบด้วยวิธี NBT superoxide scavenging assay พบว่าสาร moscatilin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 88.5 ไมโครโมลาร์ และสาร 4,5,4'-trihydroxy-3,3'-dimethoxybibenzyl มีค่า IC_{50} เท่ากับ 231.0 ไมโครโมลาร์ จากผลงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า moscatilin และ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl เป็นสารสำคัญที่พบในเอื้องครั่งที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



Moscatilin



4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl

คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลายมือชื่อนิสิต วิรุฬห์ คงคติธรรม
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Project No. 3-1

Academic year 2015

Abstract

Senior project title : Free radical scavengers from *Dendrobium parishii*

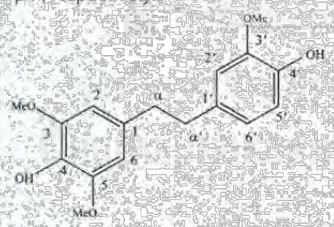
Students' name : Mr. Virunh Kongkatitum 5436577633

: Mr. Napat Kyokong 5436529533

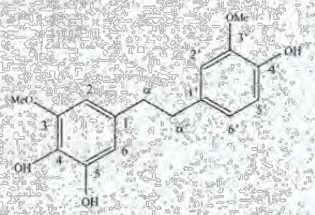
Advisor/Co-advisor : Assoc. Prof. Boonchoo Sritularak Ph.D., Prof. Kittisak Likhitwitayawuid Ph.D.

Field/Department : Drug Discovery and Development/Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

The plants of the genus *Dendrobium* (Orchidaceae) have long been used in folk medicine in several Asian countries, and so far, a number of chemical constituents with antioxidant activity have been reported from several species of this genus. In a preliminary study, the methanol extract of *Dendrobium parishii* showed 80% DPPH reduction at the concentration of 100 µg/mL. The aim of this project was to isolate and identify the constituents responsible for the free radical scavenging activity from *D. parishii*. In a bioassay-guided fractionation, we were able to isolate the active compounds using a combination of chromatographic techniques, including column chromatography (silica gel and Sephadex LH-20) and thin layer chromatography (silica gel). Through NMR spectroscopic studies, the compounds were characterized as two bibenzyls namely moscatilin (**1**) and 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl (**2**). The two isolates were then evaluated for free radical scavenging activity using DPPH and NBT superoxide assays. Moscatilin showed activity against the DPPH and superoxide radicals with IC_{50} values of 6.3 µM and 88.5 µM, respectively, whereas 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl displayed IC_{50} values of 13.7 µM and 231.0 µM, respectively.



Moscatilin



4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl

Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

Student's signature Virunh Kongkatitham

Advisor's signature Boonchoo Sritularak

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำนำ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2558 ซึ่งได้ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเอื้องครั่ง (*Dendrobium parishii*) โดยมุ่งเน้นให้นิสิตเกิดกระบวนการเรียนรู้ การวางแผนการทำงาน ความรับผิดชอบ ตลอดจนสามารถแก้ไขปัญหาต่างๆ ได้ โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ให้คำแนะนำและความช่วยเหลืออยู่ตลอด ซึ่งทางคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะได้ประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจดำเนินงานวิจัย และเป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาวิชาชีพเภสัชกรรมต่อไปในอนาคต

หากโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำโครงการขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำโครงการนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ญ
สารบัญแผนภูมิ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์การวิจัย	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม	3
2.1 อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ	3
2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging assay)	6
2.3 พืชที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	9
3.1 พืชสมุนไพร อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ	9
3.2 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบ	11
3.3 การสกัดสารบริสุทธิ์	11
3.4 การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy	13
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	23
4.1 ผลร้อยละที่ได้จากการแยกสกัด	23
4.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค Mass spectrometry	23
4.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy	24
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	27
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	29
บรรณานุกรม	30
ภาคผนวก	32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1: แสดงการรวม fraction ที่ได้จาก fraction B10 12
ตารางที่ 2: แสดงการรวม fraction ที่ได้จาก fraction B12 13
ตารางที่ 3: การเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ของ compound 1 ใน CDCl3 และ moscatilin ใน CDCl3 25
ตารางที่ 4: การเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ของ compound 2 ใน CD_3OD และ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl ใน CDCl3 26

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1: ปฏิกิริยาทางเคมีในการเกิดอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ 3
รูปที่ 2: ผลกระทบต่อร่างกายที่เกิดจาก oxidative stress 4
รูปที่ 3: ปฏิกิริยาทางเคมีในการกำจัดอนุมูลอิสระของ glutathione 5
รูปที่ 4: ปฏิกิริยาระหว่างสาร DPPH กับสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 6
รูปที่ 5: ปฏิกิริยา reduction จาก NBT เป็น formazan ใน NBT superoxide scavenging assay 7
รูปที่ 6: ต้นเอื้องครั่ง (*Dendrobium parishii*) 8
รูปที่ 7: รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiterplate ที่ 1 สำหรับทดสอบ DPPH radical scavenging assay 17
รูปที่ 8: รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiterplate ที่ 2 สำหรับทดสอบ DPPH radical scavenging assay 17
รูปที่ 9: รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiterplate ที่ 1 และ 2 สำหรับทดสอบ NBT superoxide scavenging assay 20
รูปที่ 10: รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiterplate ที่ 1 และ 2 สำหรับทดสอบ NBT superoxide scavenging assay 20
รูปที่ 11: แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร compound 1 24
รูปที่ 12: แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร compound 2 24
รูปที่ 13: ^{1}H NMR spectroscopy ของ moscatilin 32
รูปที่ 14: ^{13}C NMR spectroscopy ของ moscatilin 32
รูปที่ 15: HSQC NMR spectroscopy ของ moscatilin 33
รูปที่ 16: NOESY NMR spectroscopy ของ moscatilin 33
รูปที่ 17: HMBC NMR spectroscopy ของ moscatilin 34
รูปที่ 18: ^{1}H NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl 34
รูปที่ 19: ^{13}C NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl 35
รูปที่ 20: HSQC NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl 35
รูปที่ 21: NOESY NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl 36
รูปที่ 22: NOESY NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl 36
รูปที่ 23: HMBC NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl 37

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1: การสกัดสารจากต้นเอื้องครั่ง 14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีการศึกษามากมายที่ค้นพบว่าสารอนุมูลอิสระ (free radical) มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ในร่างกาย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของโรคเรื้อรังต่อไปได้ในอนาคตเช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง ดังนั้นการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จึงเป็นทางเลือกที่สำคัญทางเลือกหนึ่งในการป้องกันหรือยับยั้งสารอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระถูกค้นพบได้มากมายในพืชชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่น สาร beta-carotene จากมะเขือเทศ สาร curcumin จากขมิ้นชัน โดยในการศึกษาวิจัยนี้เป็นการสกัดหาสารต้านอนุมูลอิสระจากกล้วยไม้ ซึ่งมีรายงานการวิจัยพบว่ามีกล้วยไม้หลายชนิดที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น การศึกษาของ Aoxue Luo และ Yijun Fan ในปี 2011 พบว่า *Dendrobium fimbriatum* มีสารในกลุ่ม polysaccharides ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้[1] การศึกษาของ Hua Fang และคณะในปี 2015 พบว่าส่วนลำต้นของ *Dendrobium aurantiacum* มีสาร gigantol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม stilbenes ออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้[2] นอกจากการศึกษาวิจัยในต่างประเทศดังที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการศึกษาในประเทศไทยของ Boonchoo Sritularak และคณะในปี 2011 พบว่าส่วนลำต้นของ *Dendrobium draconis* ซึ่งพบสารในกลุ่ม stilbenes และสารอื่นๆ อีกหลายชนิด ที่สามารถออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน[3]

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง พบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชในสกุล *Dendrobium* เช่น ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง[4,5] ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย[6] นอกจากนั้นยังพบงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับเอื้องครั่งหรือ *Dendrobium parishii* พบว่ามีสารสำคัญ คือ dendroparine[7] หรือ anosmine[8] ซึ่งเมื่อตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารทั้ง 2 ชนิด พบว่าเป็นสารชนิดเดียวกันในกลุ่มแอลคาลอยด์ แต่ไม่พบงานวิจัยใดๆ ที่กล่าวถึงการทดสอบฤทธิ์ของสารดังกล่าว อีกทั้งเมื่อนำสารสกัดหยาบจากเมทานอลจากเอื้องครั่งมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH reduction assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเมทานอลสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงถึงร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นผู้ดำเนินโครงการจึงมีความสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่สกัดได้ต่อไป

โดยการศึกษานี้ใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟีในการสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์ และใช้เทคนิค NMR spectroscopy และ mass spectrometry ในการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงที่เคยมีการรายงานมาก่อนแล้ว นอกจากนี้ยังนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ NBT superoxide scavenging assay

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเอื้องครั่งและพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงสารสำคัญที่มีในเอื้องครั่ง เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 2

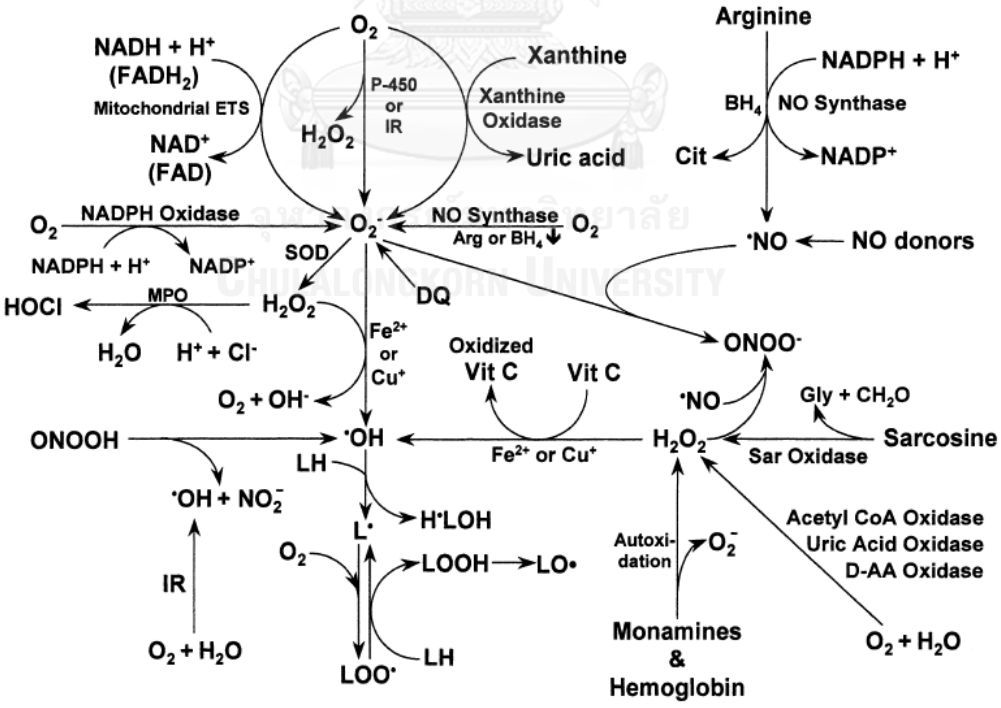
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radicals)

อนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลของสารที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอย่างน้อย 1 คู่ขึ้นไป อิเล็กตรอนเหล่านี้ไม่เสถียรและมีความไวในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ได้ง่าย ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาในออกซิเจนจะเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) เช่น hydroxyl radical, superoxide anion radical, hydrogen peroxide, oxygen singlet, hypochlorite, nitric oxide radical (รูปที่ 1)

อนุมูลอิสระข้างต้นสามารถเกิดขึ้นในร่างกายของมนุษย์ได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ เกิดจากปฏิกิริยาเคมีในร่างกายที่มีความผิดพลาดในบางขั้นตอน หรือเกิดจากการรับสิ่งเร้าจากภายนอกร่างกายส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายมากขึ้น หรือเกิดจากการรับประทานสารที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายมากขึ้น[9] โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายเหล่านี้สามารถทำให้เกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันในร่างกายได้ ส่งผลให้เกิดความเสียหายของเซลล์ต่างๆ และเกิดความผิดปกติของระบบการรักษาสมดุลต่างๆ ของร่างกายได้ แต่อีกนัยหนึ่ง อนุมูลอิสระเป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันความเสียหายในเซลล์ได้เช่นกัน[10]



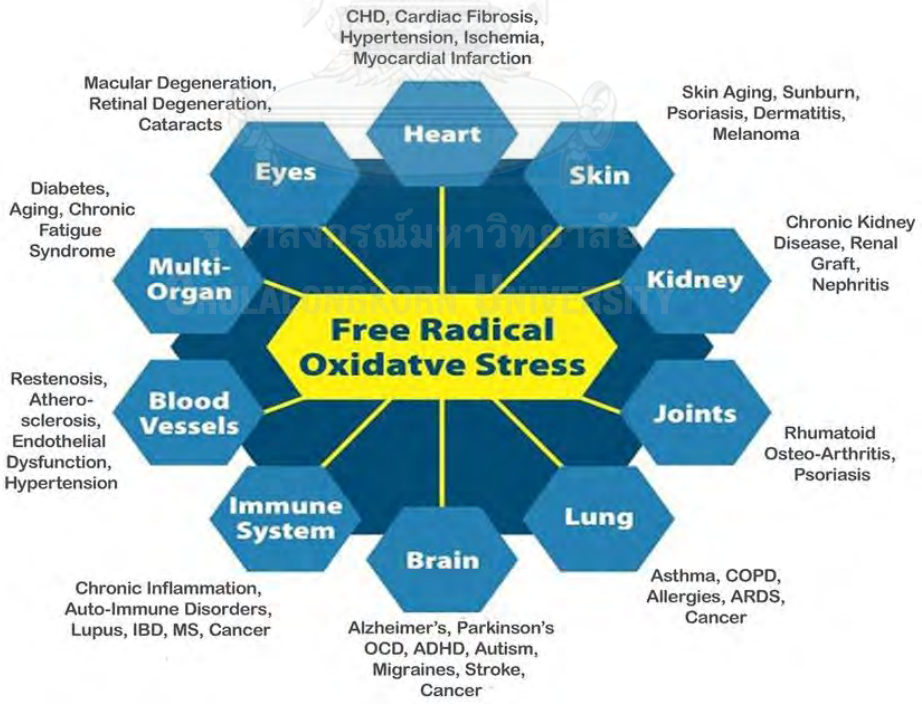
รูปที่ 1: ปฏิกิริยาทางเคมีในการเกิดอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ[11]

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Oxidative stress

Oxidative stress คือ สภาวะการเกิดความไม่สมดุลระหว่างการสร้างและการกำจัดอนุมูลอิสระในร่างกายส่งผลให้มีการสะสมอนุมูลอิสระในร่างกายจำนวนมากจนเกิดผลเสียต่อร่างกายในด้านต่างๆ ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น oxidative stress สามารถเกิดได้จากการที่เนื้อเยื่อได้รับความเสียหายจากการติดเชื้อ จากความร้อน จากสารพิษ หรือจากการออกกำลังกายที่มากจนเกินไป ซึ่งความเสียหายของเนื้อเยื่อส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่มีหน้าที่กระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น xanthine oxidase, lipooxygenase, cyclooxygenase อีกทั้งยังทำให้เกิดการรบกวนกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในปฏิกิริยา oxidative phosphorylation และทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ ROS ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคร้ายแรงหลายโรค (รูปที่ 2) ดังนี้[10]

- โรคมะเร็ง : อนุมูลอิสระเป็นส่วนสำคัญอย่างหนึ่งในการสร้างสารก่อมะเร็งในร่างกาย โดยอนุมูลอิสระส่งผลให้เกิดความเสียหายบนสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และการสังเคราะห์โปรตีนที่ผิดพลาด เป็นสาเหตุให้เกิดสารก่อมะเร็งในร่างกาย
- โรคหัวใจและหลอดเลือด : อนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยากับไขมันไม่อิ่มตัวเกิดเป็น oxidized lipids จนเกิดเป็น foam cells และ plaque ซึ่งก่อให้เกิดโรค atherosclerosis
- ร่างกายที่แก่ก่อนวัยอันควร : อนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์และทำให้เซลล์เสื่อมสภาพก่อนวัยอันควร[10]



รูปที่ 2: ผลกระทบต่อร่างกายที่เกิดจาก oxidative stress[12]

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

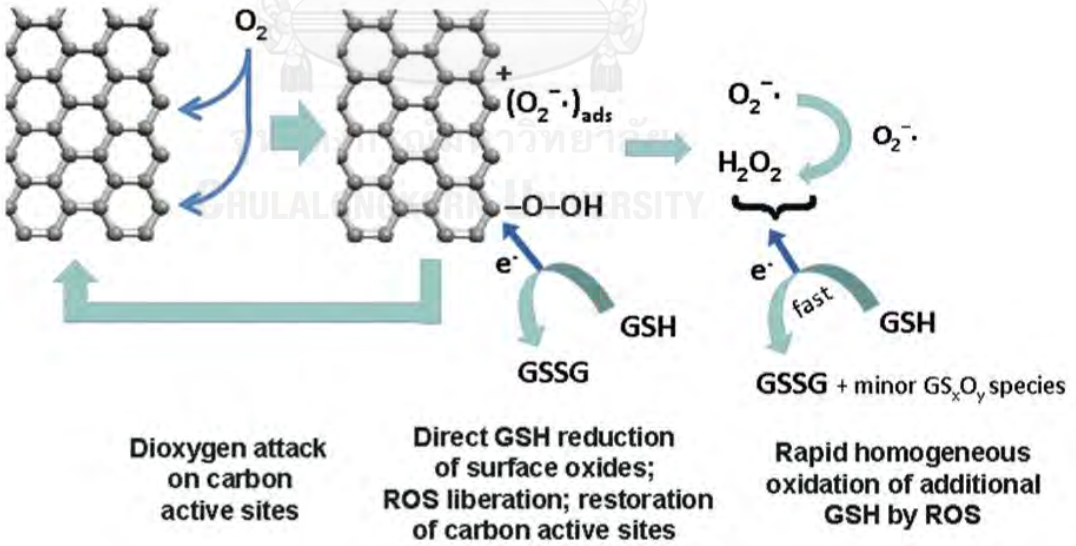
สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลที่มีอนุมูลอิสระ เพื่อทำให้โมเลกุลนั้นกลับสู่สภาวะปกติ อีกทั้งยังช่วยชะลอหรือยับยั้งอัตราการเกิดอนุมูลอิสระในโมเลกุลต่างๆ ได้อีกด้วย ในภาวะปกติร่างกายมีสารที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระเพื่อให้อยู่ในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์อยู่แล้ว เช่น glutathione (รูปที่ 3) หรือ superoxide dismutase และอื่นๆ อีกมากมาย แต่ในบางครั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นมีไม่เพียงพอ จะต้องมีการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกเข้าไปเสริม เพื่อช่วยรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระในร่างกาย[13]

สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก ได้แก่

- Vitamin E : ป้องกันการเกิดปฏิกิริยา oxidation และปฏิกิริยา lipid oxidation
- Vitamin C : ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระและช่วยเพิ่มการนำ vitamin E กลับมาใช้ใหม่ได้
- Beta-carotene : เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง vitamin A
- Selenium : ทำงานร่วมกับเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น glutathione เป็นต้น และยังช่วยในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย
- Flavonoids : เป็นสารที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ใช้เป็น chelating agent และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกระบวนการ oxidation ได้
- Coenzyme Q_{10} (ubiquinone) : เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีประโยชน์มากมายหลายประการต่อร่างกาย แต่ในทางกลับกันสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดสามารถทำให้เกิดอาการแพ้ในผู้ใช้บางราย ดังนั้นก่อนใช้สารต้านอนุมูลอิสระควรปรึกษาแพทย์หรือเภสัชกร และควรใช้ในปริมาณที่เหมาะสม[13]



รูปที่ 3: ปฏิกิริยาทางเคมีในการกำจัดอนุมูลอิสระของ glutathione[1]

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

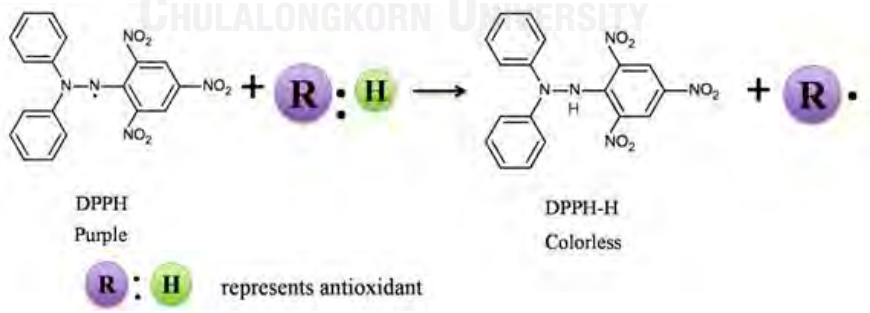
ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium*

มีการศึกษาวิจัยและค้นพบสารต้านอนุมูลอิสระจากกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ตัวอย่างเช่น สาร DFHP และสารในกลุ่ม polysaccharides จาก *Dendrobium fimbriatum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 46.67 ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl ร้อยละ 57.22 และ 74.78 ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ[1] หรือสาร DHP1A จาก *Dendrobium huoshanense* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 31.4 ถึง 38.7 ที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร[15] หรือสาร 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde และ 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid จาก *Dendrobium devonianum* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 1.61 และ 35.72 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ[16] หรือสาร Dendrocandins J–Q จาก *Dendrobium candidum* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่า IC_{50} ตั้งแต่ 30.3 ถึง 87.6 ไมโครโมลาร์[17] หรือสาร aphyllone B จาก *Dendrobium aphyllum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 87.97 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร[18]

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activities assay)

DPPH radical scavenging activity assay

1-diphenyl-2-picrylhydrazyl หรือ DPPH เป็นสารอนุมูลอิสระที่ความคงตัวสูง มีสีม่วง ไม่สามารถจับกันเองเป็นโครงสร้าง dimer ซึ่งจะทำให้เสียความสามารถในการเป็นสารอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นจึงนิยมนำมาทดสอบกับสารตัวอย่างเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะสามารถรับอะตอมของไฮโดรเจนจากสารตัวอย่างดังกล่าว เกิดเป็นอนุพันธ์ DPPH-H ซึ่งมีสีจางลงจนเป็นสีเหลือง และสังเกตผลการทดสอบได้จากการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (รูปที่ 4)

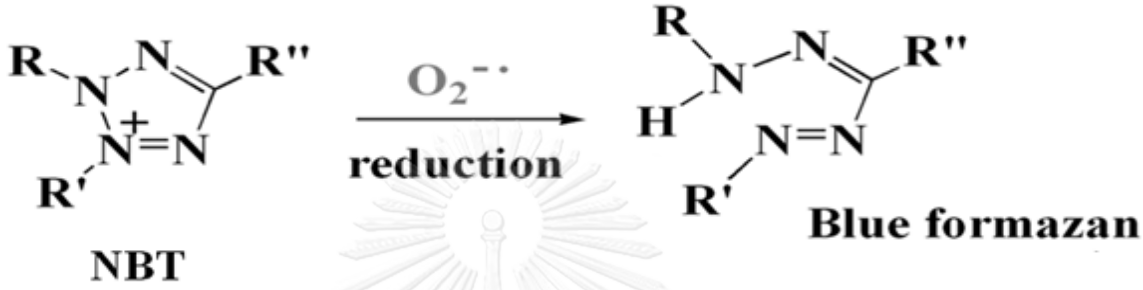


รูปที่ 4: ปฏิกิริยาระหว่างสาร DPPH กับสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[19]

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

NBT superoxide scavenging activity assay

Riboflavin (vitamin B_2) เป็นสารที่ไวต่อแสงและสามารถสร้าง superoxide anion ที่สามารถทำปฏิกิริยา reduction กับ nitroblue tetrazolium หรือ NBT ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง ให้เปลี่ยนเป็น formazan ซึ่งให้สีน้ำเงิน ดังรูปที่ 5 หากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion ได้จะสามารถให้อะตอมของไฮโดรเจนแก่ superoxide anion ทำให้ NBT ไม่เกิดปฏิกิริยา reduction เป็น formazan และสังเกตผลการทดสอบได้จากการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร[20] (รูปที่ 5)



รูปที่ 5: ปฏิกิริยา reduction จาก NBT เป็น formazan ใน NBT superoxide scavenging assay[20]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.3 พืชที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

ชื่อไทย: เอื้องครั่ง
ชื่อทางวิทยาศาสตร์: *Dendrobium parishii*
วงศ์: Orchidaceae
ชื่ออื่น: เอื้องครั่งสายสั้น ครั่ง เอื้องอินทกริต เอื้องอัตตากริต
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย มีลำต้นคล้ายแท่งดินสอกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร มีใบกว้าง 1.5-2 เซนติเมตร ยาว 5-6 เซนติเมตร ใบออกแบบ alternate 2-ranked และจะทิ้งใบเมื่อผลิดอก โดยดอกจะออกเป็นช่อตามข้อ 1-3 ดอกต่อช่อ มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีม่วงแดง กลีบปากมีสีม่วงเข้มแต้มสองข้างที่โคนกลีบ ดอกบานเต็มที่กว้าง 5 เซนติเมตร และมีกลิ่นหอม[21]
ฤดูดอก: เดือนกุมภาพันธ์ – เดือนมีนาคม
แหล่งที่พบในประเทศไทย: พบตามป่าดิบเขา ที่ระดับความสูง 800-1,800 เมตร ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ[21]
การกระจายพันธุ์: อินเดีย ถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้[21]

รูปที่ 6: ต้นเอื้องครั่ง (*Dendrobium parishii*)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชสมุนไพร อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

พืชสมุนไพร

เอื้องครั่ง (*Dendrobium parishii* Rchb.f.) ซื้อมาจากร้านค้าในตลาดนัดสวนจตุจักร (น้ำหนักแห้ง 2.2 กิโลกรัม)

อุปกรณ์

1. Round bottom flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
2. Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร
3. Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร
4. Cylinder ขนาด 10 มิลลิลิตร 100 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร
5. Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร 250 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร
6. Sintered glass funnel เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นิ้ว
7. Glass column เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว และ 2 นิ้ว
8. Stainless steel tank
9. Separatory funnel ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
10. Thin Layer Chromatography tank
11. Silica gel 60 F254 สำหรับ thin layer chromatography; Merck®
12. Capillary tubes
13. Forceps
14. กระดาษกรอง
15. สำลี
16. ขวดรับ fraction ขนาด 100 มิลลิลิตร
17. Aluminium foil
18. Pasteur pipette
19. ช้อนเขา
20. 96-well microtiterplate
21. Micropipette tip ขนาด 100 ไมโครลิตร 200 ไมโครลิตร และ 1,000 ไมโครลิตร
22. Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
23. กล่องทึบแสง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารเคมี

1. Methanol
2. Butanol
3. Ethyl acetate
4. น้ำ
5. Hexane
6. Acetone
7. Silica gel ขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร
8. Silica gel ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร
9. Sephadex LH 20
10. DPPH solution ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์
11. Riboflavin (vitamin B2) solution ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
12. Nitroblue tetrazolium (NBT) solution ความเข้มข้น 0.75 มิลลิโมลาร์
13. Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์
14. Methanol AR grade
15. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์
16. Trolox® (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
17. Quercetin
18. CD_3OD
19. $CDCl_3$

เครื่องมือ

1. Tray and truck dryer, grinder
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า ยี่ห้อ Mettler® รุ่น AG135
3. Rotary evaporator (Buchi rotavapor R-114)
4. Asparator (vacuum pump: Buchi B-169)
5. เครื่องกลั่นสารเคมี
6. เครื่องฉายแสง UV
7. NMR spectrometer
8. Fluorescent lamp
9. Micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร 20-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร
10. Microplate reader ยี่ห้อ Victor3® รุ่น wallac1420
11. เครื่อง Vortex®

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.2 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบ

นำเอื้องครั่งสด 11 กิโลกรัม ที่ผ่านการล้างให้สะอาดแล้วไปอบแห้งด้วยเครื่อง tray and truck dryer ได้น้ำหนักแห้ง 2.2 กิโลกรัม แล้วนำไปบดหยาบ จากนั้นนำไปแช่สกัดใน aluminium tank โดยใช้ methanol จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 สัปดาห์ นำสิ่งสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้เป็นสิ่งสกัดหยาบน้ำหนัก 166.4 กรัม จากนั้นนำสิ่งสกัดหยาบดังกล่าวมาทำการสกัดด้วยวิธี partition ด้วย ethyl acetate น้ำ และ butanol ตามลำดับ ได้สิ่งสกัดหยาบในชั้นของ ethyl acetate 72.51 กรัม

3.3 การสกัดสารบริสุทธิ์

หาระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่เหมาะสมโดยใช้วิธี thin layer chromatography ซึ่งระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมได้แก่ ethyl acetate : hexane ในสัดส่วน 3 : 7

นำสิ่งสกัดหยาบในชั้นของ ethyl acetate 72.51 กรัม ไปสกัดหยาบด้วยวิธี quick column chromatography ที่บรรจุ silica gel ขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร และใช้ระบบตัวทำละลายข้างต้น (ethyl acetate : hexane) โดยเริ่มจากการใช้ hexane 100% แล้วค่อยๆ เพิ่มสัดส่วนของ ethyl acetate ขึ้นทีละน้อยจนเป็น ethyl acetate 100% โดยรับ fraction ละประมาณ 200 มิลลิลิตร ได้เป็น 46 fraction โดยแต่ละ fraction ที่รับมาได้จะนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วนำแต่ละ fraction ที่แห้งแล้วไปทำการทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลาย ethyl acetate : hexane ในสัดส่วน 3 : 7 จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ TLC band ของแต่ละ fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 7 fraction (A1-A7)

นำ fraction A6 น้ำหนัก 3.86 กรัม มาผ่าน column chromatography ที่บรรจุ silica gel ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร และใช้ระบบตัวทำละลาย ethyl acetate : hexane โดยเริ่มจากการใช้ hexane 100% แล้วค่อยๆ เพิ่มสัดส่วนของ ethyl acetate ขึ้นทีละน้อยจนเป็น ethyl acetate 100% โดยรับ fraction ละประมาณ 20 มิลลิลิตรใส่ขวดรับ fraction ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้เป็น 53 fraction โดยแต่ละ fraction ที่รับมาได้จะนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วนำแต่ละ fraction ที่แห้งแล้วไปทำการทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลาย ethyl acetate : hexane ในสัดส่วน 3 : 7 จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ TLC band ของแต่ละ fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 13 fraction (B1-B13)

นำ fraction B10 น้ำหนัก 904 มิลลิกรัม มาผ่าน column chromatography ที่บรรจุ sephadex LH 20 และใช้ระบบตัวทำละลายเป็น methanol 100% ในทุก fraction โดยรับ fraction ละประมาณ 20 มิลลิลิตรใส่ขวดรับ fraction ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้เป็น 25 fraction โดยแต่ละ fraction ที่รับมาได้จะนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วนำแต่ละ fraction ที่แห้งแล้วไปทำการทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลาย ethyl acetate : hexane ในสัดส่วน 3 : 7 จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ TLC band ของแต่ละ fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 11 fraction (E1-E11) แล้วสังเกตลักษณะ TLC band ของแต่ละ fraction เพื่อเลือก fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียว ซึ่งหมายความว่า fraction นั้นอาจเป็นสารที่บริสุทธิ์ โดย fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียวได้แก่ fraction E7-E9 ได้สาร compound 1 (530 มิลลิกรัม) ซึ่งจะนำไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy ต่อไป ดังตารางที่ 1

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 1: แสดงการรวม fraction ที่ได้จาก fraction B10

Fraction	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)
E1 (1-4)	36
E2 (5-6)	52
E3 (7)	37
E4 (8)	25
E5 (9)	16
E6 (10-13)	26
E7 (14)	253
E8 (15)	232
E9 (16)	45
E10 (17-20)	12
E11 (21-25)	2

นำ fraction B12 น้ำหนัก 572 มิลลิกรัม มาผ่าน column chromatography ที่บรรจุ sephadex LH 20 และใช้ระบบตัวทำละลายเป็น methanol 100% ในทุก fraction โดยรับ fraction ละประมาณ 20 มิลลิลิตรใส่ขวดรับ fraction ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้เป็น 16 fraction โดยแต่ละ fraction ที่รับมาได้จะนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วนำแต่ละ fraction ที่แห้งแล้วไปทำการทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลาย ethyl acetate : hexane ในสัดส่วน 3 : 7 จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ TLC band ของแต่ละ fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 10 fraction (G1-G10) แล้วสังเกตลักษณะ TLC band ของแต่ละ fraction เพื่อเลือก fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียว ซึ่งหมายความว่า fraction นั้นอาจเป็นสารที่บริสุทธิ์ โดย fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียวได้แก่ fraction G5-G7 สาร compound 2 (70 มิลลิกรัม) ที่จะนำไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy ต่อไป ดังตารางที่ 2

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 2: แสดงการรวม fraction ที่ได้จาก fraction B12

Fraction	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)
G1 (1-2)	28
G2 (3-6)	124
G3 (7-9)	185
G4 (10)	29
G5 (11)	19
G6 (12)	19
G7 (13)	32
G8 (14)	10
G9 (15)	10
G10 (16)	3

3.4 การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy

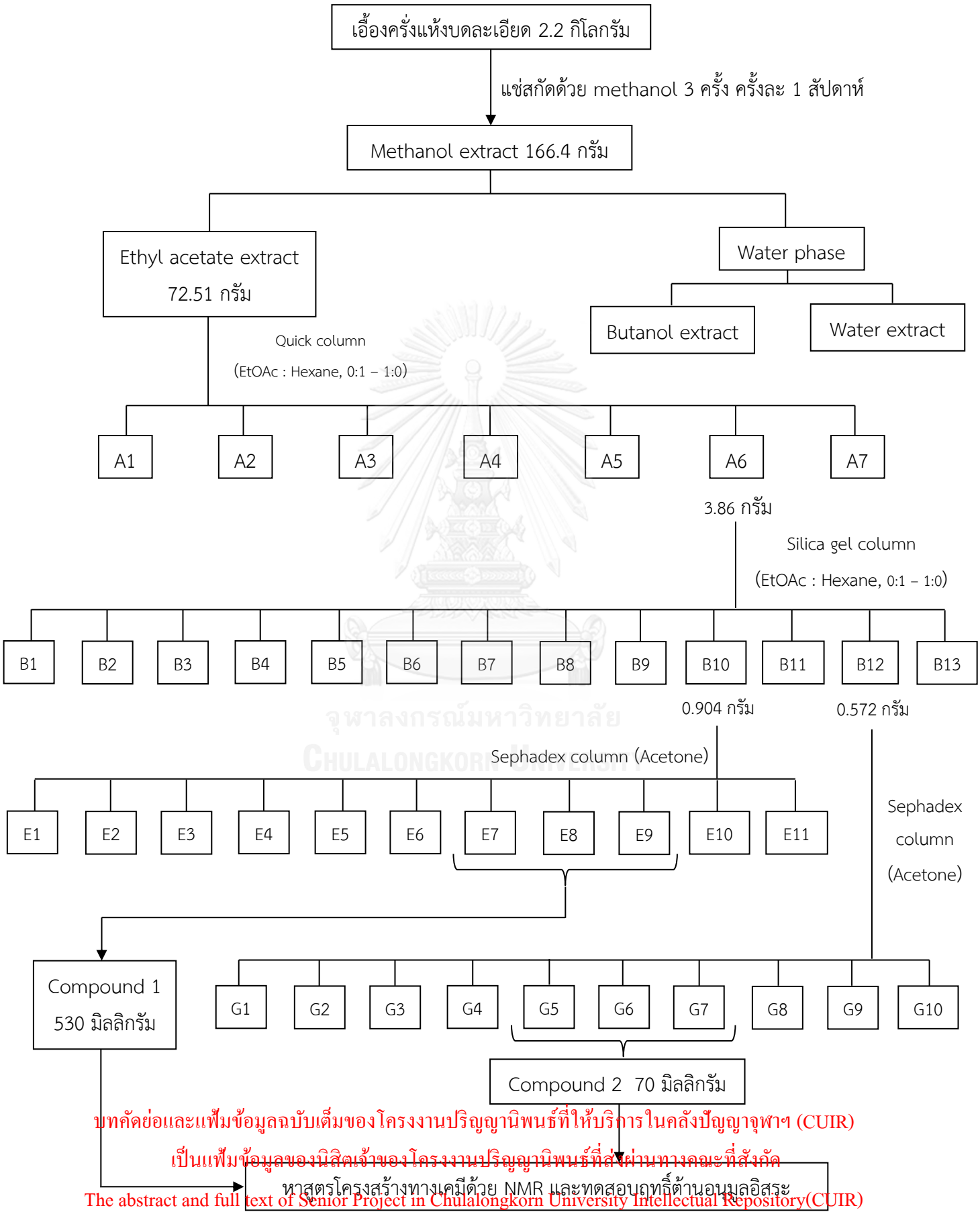
นำสาร compound 1 ละลายใน $CDCl_3$ สำหรับวิเคราะห์ผลด้วยวิธี NMR spectroscopy ในรูปแบบ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HSQC NMR, HMBC NMR และ NOESY แล้วนำ spectrum ที่ได้มาวิเคราะห์หาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าว และนำไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับสารที่เคยมีการรายงานในงานวิจัยจากปริทัศน์วรรณกรรม

นำสาร compound 2 ละลายใน CD_3OD สำหรับไปวิเคราะห์ผลด้วยวิธี NMR spectroscopy ในรูปแบบ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HSQC NMR, HMBC NMR และ NOESY แล้วนำ spectrum ที่ได้มาวิเคราะห์หาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าว และนำไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับสารที่เคยมีการรายงานในงานวิจัยจากปริทัศน์วรรณกรรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

แผนภูมิที่ 1: การสกัดสารจากต้นเอื้องครั่ง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

DPPH radical scavenging activity assay

ทำการชั่งสารบริสุทธิ์ที่สกัดมาได้ ซึ่งได้แก่ compound 1 และ compound 2 และทำการชั่งสารที่จะนำมาใช้เป็น positive control ซึ่งได้แก่ Trolox® และ quercetin ใส่ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย methanol AR grade ให้ได้ความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำ micropipette ดูดสารละลายที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น หยดใส่ลงใน 96-well microtiterplate แต่ละหลุมดังนี้

Microtiterplate ที่ 1 (รูปที่ 7)

- หลุม A3 – A7 หยดสารละลายที่เป็น negative control โดยในแต่ละหลุมประกอบด้วย methanol AR grade 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม A8 หยดสารที่เป็น blank ของ negative control ประกอบด้วย methanol AR grade 200 ไมโครลิตร

- หลุม B3 – B7 หยดสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม B8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม C3 – C7 หยดสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม C8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม D3 – D7 หยดสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม D8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม E3 – E7 หยดสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม E8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม F3 – F7 หยดสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม F8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม G3 – G7 หยดสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม G8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Microtiterplate ที่ 2 (รูปที่ 8)

- หลุม A3 – A7 หยดสารละลายที่เป็น negative control โดยในแต่ละหลุมประกอบด้วย methanol AR grade 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม A8 หยดสารที่เป็น blank ของ negative control ประกอบด้วย methanol AR grade 200 ไมโครลิตร

- หลุม B3 – B7 หยดสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม B8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วย สารละลาย quercetin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม C3 – C7 หยดสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม C8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วย สารละลาย quercetin ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม D3 – D7 หยดสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม D8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วย สารละลาย quercetin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม E3 – E7 หยดสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม E8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วย สารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม F3 – F7 หยดสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม F8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วย สารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

- หลุม G3 – G7 หยดสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ DPPH solution 180 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม G8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วย สารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 180 ไมโครลิตร

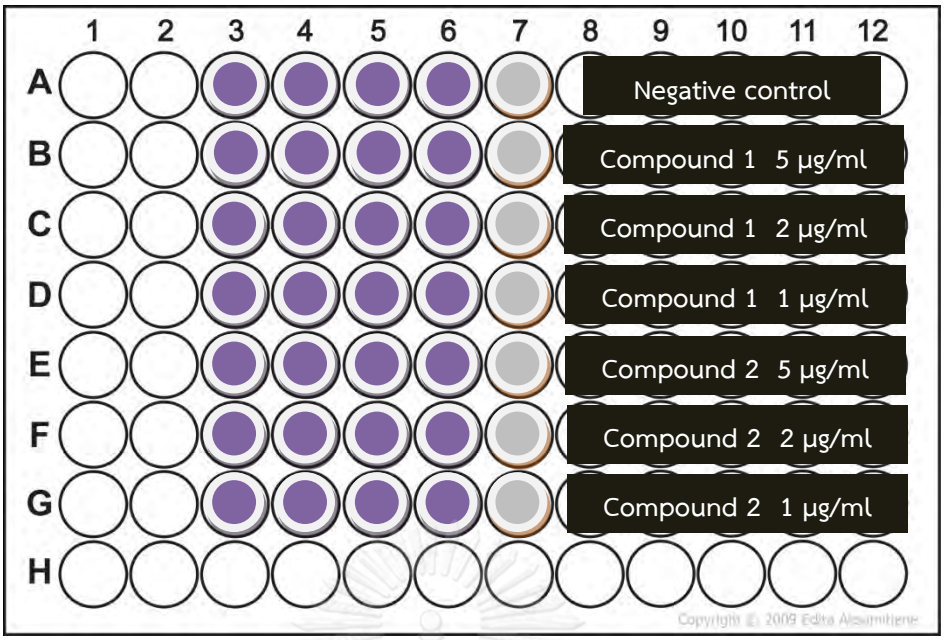
หลังจากหยดสารละลายใน microtiterplate ครบแล้ว ให้ปิดฝา microtiterplate ทั้ง 2 plate แล้วนำไปใส่ในกล่องทึบแสงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ยี่ห้อ Victor3® รุ่น wallac1420 ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เพื่อนำผลที่ได้มาสร้างกราฟ หาค่า IC_{50} ของสารแต่ละตัว

ทำเช่นเดิมตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นอีก 2 รอบ เพื่อนำค่า IC_{50} ที่ได้ทั้งหมดมาใช้ในการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า IC_{50}

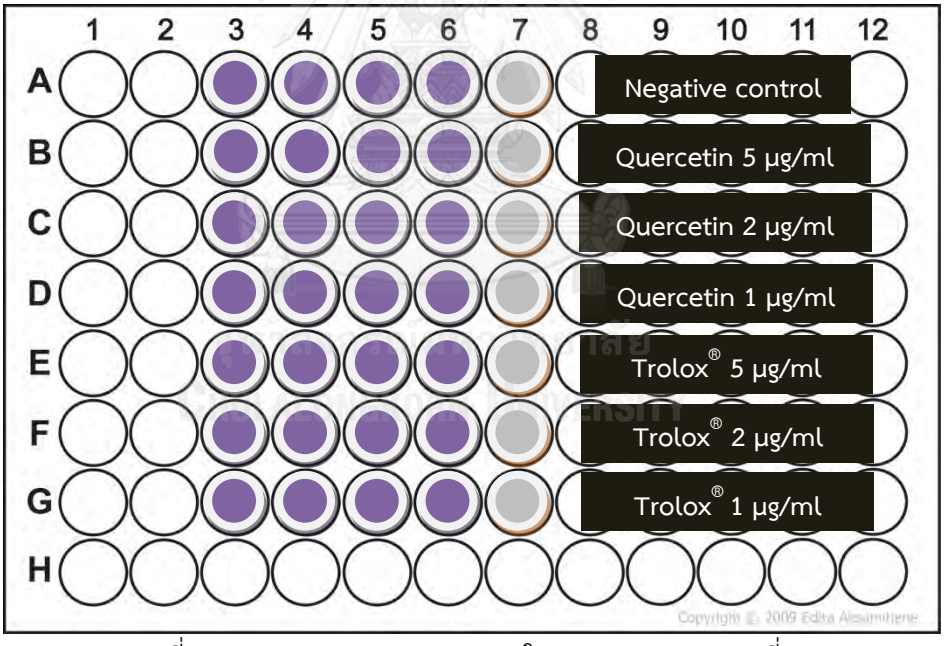
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 7: รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiterplate ที่ 1
สำหรับทดสอบ DPPH radical scavenging assay



รูปที่ 8: รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiterplate ที่ 2
สำหรับทดสอบ DPPH radical scavenging assay

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

NBT superoxide scavenging activity assay

ทำการชั่งสารบริสุทธิ์ที่สกัดมาได้ ซึ่งได้แก่ compound 1 และ compound 2 และทำการชั่งสารที่จะนำมาใช้เป็น positive control ซึ่งได้แก่ Trolox® และ quercetin ใส่ลงใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย methanol AR grade ให้ได้ความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำ micropipette ดูดสารละลายที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น หยดใส่ลงใน 96-well microtiterplate แต่ละหลุมดังนี้

Microtiterplate ที่ 1 และ 2 (รูปที่ 9)

- หลุม A3 – A7 หยดสารละลายที่เป็น negative control โดยในแต่ละหลุมประกอบด้วย methanol AR grade 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม A8 หยดสารที่เป็น blank ของ negative control ประกอบด้วย methanol AR grade 60 ไมโครลิตร
- หลุม B3 – B7 หยดสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม B8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร
- หลุม C3 – C7 หยดสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม B8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร
- หลุม D3 – D7 หยดสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม B8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 1 ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร
- หลุม E3 – E7 หยดสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม E8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร
- หลุม F3 – F7 หยดสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม E8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร
- หลุม G3 – G7 หยดสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม E8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย compound 2 ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Microtiterplate ที่ 3 และ 4 (รูปที่ 10)

- หลุม A3 – A7 หยดสารละลายที่เป็น negative control โดยในแต่ละหลุมประกอบด้วย methanol AR grade 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม A8 หยดสารที่เป็น blank ของ negative control ประกอบด้วย methanol AR grade 60 ไมโครลิตร

- หลุม B3 – B7 หยดสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม B8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร

- หลุม C3 – C7 หยดสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม B8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร

- หลุม D3 – D7 หยดสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม B8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย quercetin ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร

- หลุม E3 – E7 หยดสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม E8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร

- หลุม F3 – F7 หยดสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม E8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร

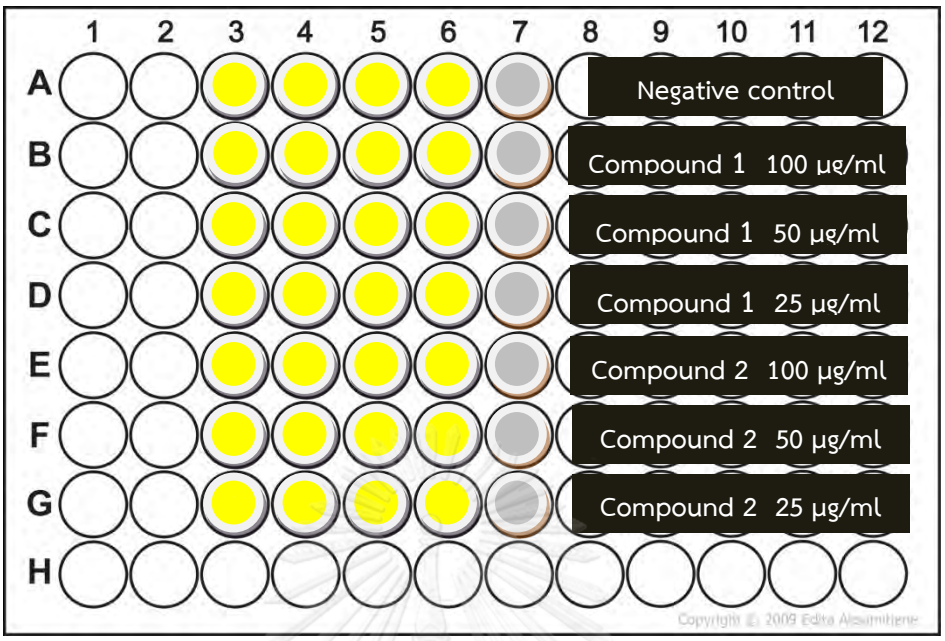
- หลุม G3 – G7 หยดสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ส่วนในหลุม E8 หยดสารที่เป็น blank ประกอบด้วยสารละลาย Trolox® ความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และ methanol AR grade 160 ไมโครลิตร

หลังจากหยดสารละลายตัวอย่างดังที่กล่าวมาข้างต้นครบแล้ว ให้หยดสารดังต่อไปนี้ลงในทุกหลุมตามลำดับ ยกเว้นหลุมที่เป็น blank (แถว A-G, คอลัมน์ 3-7)

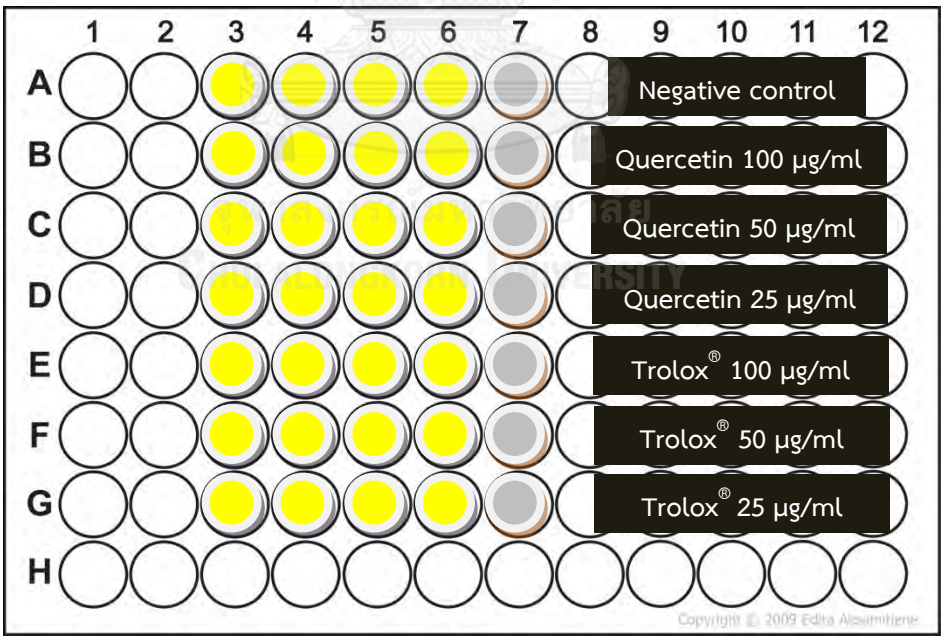
- PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร
- Riboflavin solution ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร
- EDTA solution ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร
- NBT solution ความเข้มข้น 0.75 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

โดยการหยด ให้หยดลงใน microtiterplate ที่ 1 และ 3 ก่อน แล้วนำ microtiterplate ที่หยดสารละลายครบแล้วทั้ง 2 plate ไปวางไว้ในที่ที่มีแสงจากโคมไฟ fluorescent เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ยี่ห้อ Victor3® รุ่น wallac1420ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เพื่อนำผลที่ได้มาสร้างกราฟ หาค่า IC_{50} ของสารแต่ละตัวต่อไป หลังจากนั้นทำการหยดสารละลายลงใน microtiterplate ที่ 2 และ 4 เมื่อหยดสารละลายครบแล้วให้นำ microtiterplate ทั้ง 2 plate ไปวางไว้ในกล่องทึบแสงเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ยี่ห้อ Victor3® รุ่น wallac1420 ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เพื่อนำผลที่ได้มาสร้างกราฟ หาค่า IC_{50} ของสารแต่ละตัวต่อไป

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 9: รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiterplate ที่ 1 และ 2
สำหรับทดสอบ NBT superoxide scavenging assay



รูปที่ 10: รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiterplate ที่ 3 และ 4
สำหรับทดสอบ NBT superoxide scavenging assay

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

<u>วิธีการคำนวณหา % inhibition และค่า IC_{50} ของสารที่ทดสอบด้วย DPPH radical scavenging assay</u>

สามารถคำนวณหา % inhibition ของสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\%\ inhibition\ = \frac{(I_0 - b_0) - (I_1 - b_1)}{(I_0 - b_0)} \times 100$$

กำหนดให้ I_0 คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของ negative control

I_1 คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่ง

b_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารที่เป็น blank ของ negative control

b_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารที่เป็น blank ของ สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่ง

จากการคำนวณด้วยสูตรข้างต้น ในสารตัวอย่าง 1 ชนิดจะได้ผลลัพธ์เป็น % inhibition 3 ค่า จาก 3 ความเข้มข้น จากนั้นนำ % inhibition ดังกล่าวไปสร้างกราฟโดยกำหนดให้ แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง และแกน Y เป็นค่า % inhibition จะได้เป็นสมการเส้นตรง ซึ่งสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างนั้นๆ จากสมการเส้นตรงนี้ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

<u>วิธีการคำนวณหา % inhibition และค่า IC_{50} ของสารที่ทดสอบด้วย NBT superoxide scavenging assay</u>

สามารถคำนวณหา % inhibition ของสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\%\ inhibition\ = \frac{(L_0 - D_0) - (L_1 - D_1)}{(L_0 - D_0)} \times 100$$

กำหนดให้ L_0 คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของ negative control ใน microtiterplate ที่ได้รับแสงจากโคมไฟ fluorescent เป็นเวลา 10 นาที

L_1 คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่ง ใน microtiterplate ที่ได้รับแสงจากโคมไฟ fluorescent เป็นเวลา 10 นาที

D_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารที่เป็น blank ของ negative control ใน microtiterplate ที่ถูกเก็บในกล่องทึบแสงเป็นเวลา 10 นาที

D_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของสารที่เป็น blank ของ สารตัวอย่างที่ความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่ง ใน microtiterplate ที่ถูกเก็บในกล่องทึบแสงเป็นเวลา 10 นาที

จากการคำนวณด้วยสูตรข้างต้น ในสารตัวอย่าง 1 ชนิดจะได้ผลลัพธ์เป็น % inhibition 3 ค่า จาก 3 ความเข้มข้น จากนั้นนำ % inhibition ดังกล่าวไปสร้างกราฟโดยกำหนดให้ แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง และแกน Y เป็นค่า % inhibition จะได้เป็นสมการเส้นตรง ซึ่งสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างนั้นๆ จากสมการเส้นตรงนี้ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลร้อยละที่ได้จากการแยกสกัด

จากกระบวนการแยกสกัดตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด ได้แก่ compound 1 และ compound 2 ซึ่งมี % yield เท่ากับ 0.024% และ 0.003% ตามลำดับ

4.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค Mass spectrometry

จากการวิเคราะห์สาร compound 1 ด้วย HR-ESI-MS พบว่าสูตรโมเลกุลของสารดังกล่าวเป็น $C_{17}H_{20}O_5Na$ และมี $[M+Na]^+$ at *m/z* เท่ากับ 327.1219

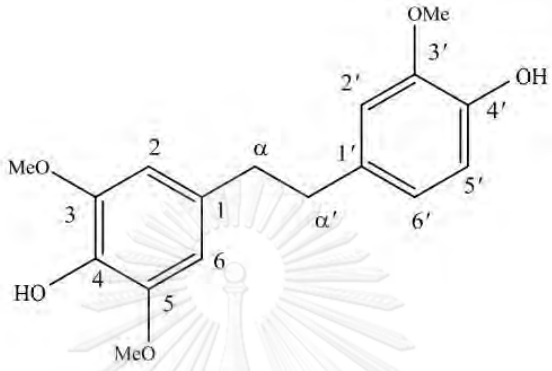
ส่วนการวิเคราะห์สาร compound 2 ด้วย HR-ESI-MS พบว่าสูตรโมเลกุลของสารดังกล่าวเป็น $C_{16}H_{18}O_5Na$ และมี $[M+Na]^+$ at *m/z* เท่ากับ 313.1058

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

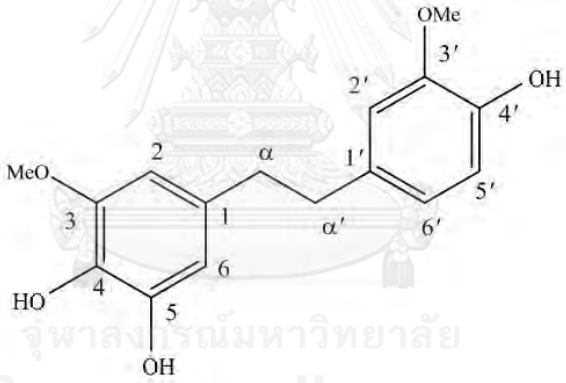
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

จากการนำ fraction ที่มีสาร compound 1 และ compound 2 มาทำ thin layer chromatography พบว่ามี spot ที่มีการเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรเพียง spot เดียว ซึ่งอาจแสดงว่า fraction ดังกล่าวมีสารบริสุทธิ์เพียงสารเดียว จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy รูปแบบ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC และ NOESY แล้วนำข้อมูลที่ได้จากแต่ละรูปแบบมาประกอบกันได้เป็นสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร compound 1 ดังรูปที่ 11 และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร compound 2 ดังรูปที่ 12



รูปที่ 11: แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร compound 1[14]



รูปที่ 12: แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร compound 2[15]

จากนั้นนำสูตรโครงสร้างที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูลว่าสารทั้งสองชนิดเคยถูกค้นพบหรือรายงานมาก่อนหรือไม่ ซึ่งพบว่าทั้งสาร compound 1 และ compound 2 เคยถูกรายงานว่าค้นพบในกล้วยไม้ species อื่นแล้วแต่ไม่เคยถูกค้นพบหรือรายงานใน *Dendrobium parishii* มาก่อน โดยพบว่าสาร compound 1 คือสารที่มีชื่อว่า moscatilin หรือ dendrophenol หรือ 4,4′-dihydroxy-3,3′,5-trimethoxybibenzyl ส่วนสาร compound 2 คือสารที่มีชื่อว่า 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl และมีผู้ทำการศึกษาวิจัยและรายงานค่า chemical shift และ NMR spectrum ของทั้งสาร moscatilin และ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มาก่อนแล้วเช่นกัน จึงนำ NMR spectrumของสาร compound 1 ใน $CDCl_3$ มาเปรียบเทียบกับ NMR spectrum ของสาร moscatilin ใน $CDCl_3$ ซึ่งแสดงในตารางที่ 3 และนำ NMR spectrumของสาร compound 2 ใน CD_3OD

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

มาเปรียบเทียบกับ NMR spectrumของสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl ใน $CDCl_3$ ซึ่งแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3: การเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ของ compound 1 ใน $CDCl_3$ และ moscatilin ใน $CDCl_3$

Position	Compound 1		Moscatilin	
	δ_H	δ_c	δ_H	δ_C
1	-	132.9	-	132.8
2	6.38 (s)	105.2	6.36 (s)	105.2
3	-	146.9	-	146.8
4	-	132.9	-	133.5
5	-	146.9	-	146.8
6	6.38 (s)	105.2	6.36 (s)	105.2
1′	-	133.7	-	132.8
2′	6.64 (d, 2.0)	111.3	6.65 (d, 2.0)	111.2
3′	-	146.3	-	146.1
4′	-	143.8	-	143.7
5′	6.87 (d, 8.0)	114.2	6.94 (d, 8.0)	114.1
6′	6.71 (dd, 8.0, 2.0)	121.1	6.75 (dd, 8.0, 2.0)	121.0
α	2.84 (s)	38.5	2.89 (s)	38.3
α′	2.84 (s)	37.9	2.89 (s)	37.8
3-OMe	3.86 (s)	56.3	3.77 (s)	56.2
3′-OMe	3.85 (s)	55.9	3.77 (s)	55.8
5-OMe	3.86 (s)	56.3	3.77 (s)	56.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 4: การเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ของ compound 2 ใน CD_3OD และ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl ใน $CDCl_3$

Position	Compound 2		4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl	
	δ_H	δ_c	δ_H	δ_C
1	-	131.8	-	130.4
2	6.24 (d, 2.0)	103.7	6.21 (d, 2.0)	103.5
3	-	148.0	-	146.6
4	-	132.8	-	133.7
5	-	144.9	-	143.7
6	6.30 (d, 2.0)	108.7	6.42 (d, 2.0)	108.6
1′	-	133.5	-	133.8
2′	6.60 (d, 2.0)	112.1	6.60 (d, 2.0)	111.2
3′	-	147.2	-	146.2
4′	-	144.1	-	143.7
5′	6.68 (d, 8.0)	114.6	6.80 (d, 8.0)	114.1
6′	6.58 (dd, 8.0, 2.0)	120.6	6.65 (dd, 8.0, 2.0)	121.0
α	2.75 (m)	37.9	2.75 (m)	38.2
α′	2.72 (m)	37.5	2.78 (m)	37.7
3-OMe	3.77 (s)	55.1 (s)	3.80 (s)	56.1
3′-OMe	3.78 (s)	54.9 (s)	3.83 (s)	55.9

จากผลการเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ในส่วนของ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC และ NOESY ระหว่างสาร compound 1 กับสาร moscatilin และสาร compound 2 กับสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl พบว่าค่า chemical shift ของการเปรียบเทียบสารทั้ง 2 คู่ มีความใกล้เคียงกันมากพอที่จะสรุปได้ว่าสาร compound 1 คือ สาร moscatilin และสาร compound 2 คือ สาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

DPPH radical scavenging activity assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร moscatilin ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร moscatilin สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 1.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร moscatilin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 6.3 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.36

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 3.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 13.7 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.53

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร quercetin ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ได้ทำการทดสอบ (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 62.91 ซึ่งมีค่าสูงกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร quercetin มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือต่ำกว่า 3.31 ไมโครโมลาร์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร Trolox® ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร Trolox® สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 2.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร Trolox® มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 11.0 ไมโครโมลาร์ โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.86

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

NBT superoxide scavenging activity assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion ของสาร moscatilin ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร moscatilin สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 26.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร moscatilin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 88.5 ไมโครโมลาร์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion ของสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 66.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มีค่า IC_{50} เท่ากับ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 231.0 ไมโครโมลาร์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion ของสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร quercetin สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 32.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 32.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 106.2 ไมโครโมลาร์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion ของสาร Trolox® ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร Trolox® สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 214.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร Trolox® มีค่า IC_{50} เท่ากับ 214.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 855.0 ไมโครโมลาร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการนำสารสกัดหยาบในชั้น ethyl acetate ของ *Dendrobium parishii* หรือเอื้องครั่ง มาสกัดแยกสารโดยใช้วิธี Bioassay guided fractionation เพื่อคัดกรองฤทธิ์ในแต่ละขั้นของการแยกสกัด ส่วนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จะใช้วิธีทาง column chromatography ผ่าน silica gel column และ sephadex LH-20 column พบว่าสามารถสกัดสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด จากนั้นนำสารที่ได้ไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค ^{1}H, ^{13}C NMR spectroscopy, HSQC, HMBC และ NOESY พบว่าเป็นสาร moscatilin และ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และ NBT superoxide scavenging assay ซึ่งจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่าสาร moscatilin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.3 ไมโครโมลาร์ และสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.7 ไมโครโมลาร์ ส่วน positive control ได้แก่ quercetin มีค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่า 3.31 ไมโครโมลาร์ และ Trolox® มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.0 ไมโครโมลาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า moscatilin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่า Trolox® แต่มีฤทธิ์ต่ำกว่า quercetin ส่วน 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่า quercetin และ Trolox® ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี NBT superoxide scavenging assay พบว่าสาร moscatilin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 88.5 ไมโครโมลาร์ และสาร 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มีค่า IC_{50} เท่ากับ 231.0 ไมโครโมลาร์ ส่วน positive control ได้แก่ quercetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 106.2 ไมโครโมลาร์ และ Trolox® มีค่า IC_{50} เท่ากับ 855.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่า moscatilin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion สูงกว่าทั้ง quercetin และ Trolox® ส่วน 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion ที่ต่ำกว่า quercetin แต่สูงกว่า Trolox® ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าทั้ง moscatilin และ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในระดับสูง แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion ในระดับปานกลาง

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บรรณานุกรม

1. Luo A and Fan Y. In vitro Antioxidant of a Water-Soluble Polysaccharide from *Dendrobium fimbriatum Hook.var.oculatum Hook*. International Journal of Molecular Sciences. 2011; 12:4068-4079
2. Fang H, Hu X, Wang M, et al. Anti-osmotic and antioxidant activities of gigantol from *Dendrobium aurantiacum var.denneanum* against cataractogenesis in galactosemic rats. Journal of Ethnopharmacology. 2015; 172:238–246
3. Sritularak B, Anuwat M and Likhitwitayawuid K. A new phenanthrenequinone from *Dendrobium draconis*. Journal of Asian Natural Products Research. 2011; 13(3):251-255
4. Pengpaeng P, Sritularak B and Chanvorachote P. Dendrofalconerol A suppresses migrating cancer cells via EMT and integrin proteins. Anticancer Research. 2015; 35(1):201-205
5. Tanagornmeatar K, Chaotham C, Sritularak B, Likhitwitayawuid K and Chanvorachote P. Cytotoxic and anti-metastatic activities of phenolic compounds from *Dendrobium ellipsophyllum*. Anticancer Research. 2014; 34(11):6573-6579
6. Sukphan P, Sritularak B, Mekboonsonglarp W, Lipipun V and Likhitwitayawuid K. Chemical constituents of *Dendrobium venustum* and their antimalarial and anti-herpetic properties. Natural Product Community. 2014; 9(6):825-827
7. Ng TB, Liu J, Wong JH, Ye X, Sze SCW, Tong Y and Zhang KY. Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine. Application Microbiological Biotechnology. 2012; 93:1795-1803
8. Hemscheidt T and Spenser ID. Biosynthesis of anosmine: incorporation of the intact six-carbon chain of lysine and of pipecolic acid. Journal of Natural Products. 1993; 56(8):1281-1287
9. Nimse SB and Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances. 2015; 5:27986-28006
10. Lobo V, Patil A, Phatak A, and Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Review. 2010; 4(8):118-126
11. Fang YZ, Yang S and Wu G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. Nutrition. 2002; 18:872– 879
12. CCtreatment [Internet]. Free Radicals in the Body-Oxidative Stress and the Antioxidant Response. [updated 2015 Aug 13; cited 2015 Nov 27]. Available from: http://cancerce lltreatment.com/2015/08/13/free-radicals-in-the-body-oxidative-stress-and-the-antioxidant-response/

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

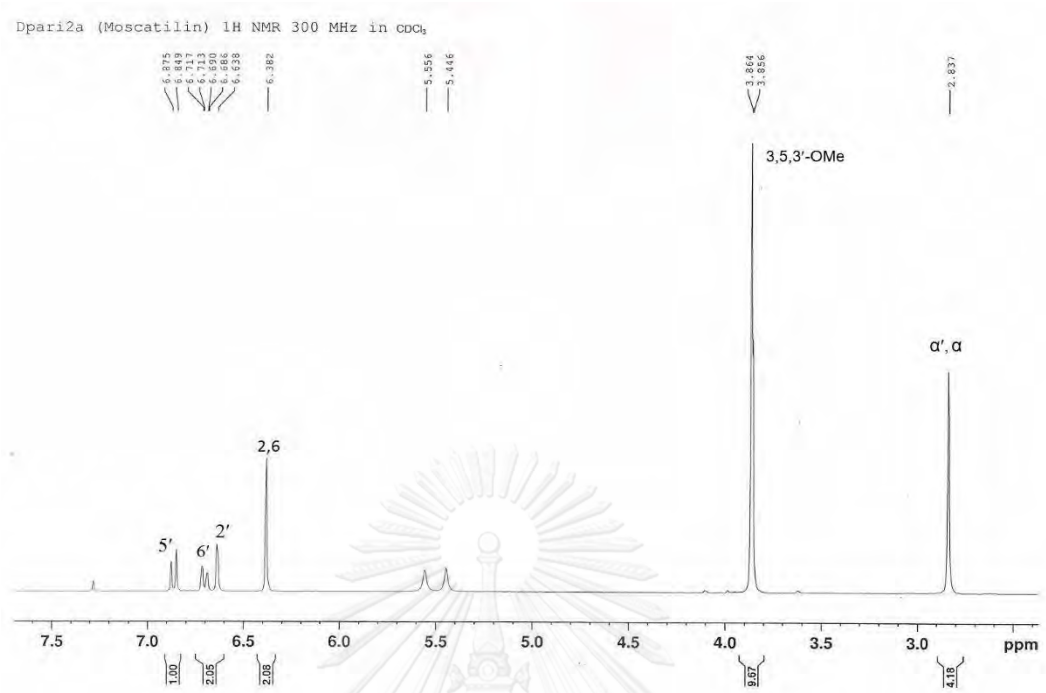
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

13. Lamina S, Ezema CI, Theresa AI and Anthonia EU. Effect of free radicals and antioxidants on exercise performance. Oxid Antioxid Med Sci. 2013; 2(2):83-91
14. Liu X, Sen S, Liu J, et al. Antioxidant Deactivation on Graphenic Nanocarbon Surfaces. Small. 2011; 7(19):2775-2785
15. Tian CC, Zha XQ, Pan LH and Luo JP. Structural characterization and antioxidant activity of a low-molecular polysaccharide from *Dendrobium huoshanense*. Fitoterapia. 2013; 91:247–255
16. Ai-lian Z, Min Y, Hong-hua XU and Jin-ping SI. Constituents of *Dendrobium devonianum* and their antioxidant activity. China Journal of Chinese Meteria Medica. 2013; 38(6):844-846
17. Li Y, Wang CL, Zhao HJ and Guo SX. Eight new bibenzyl derivatives from *Dendrobium candidum*. Journal of Asian Natural Products Research. 2014; 16(11):1035-1043
18. Yang D, Liu LY, Cheng ZQ, et al. Five new phenolic compounds from *Dendrobium aphyllum*. Fitoterapia. 2015; 100:11–18
19. Liang N and Kitts DD. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. Molecules. 2014; 19:19180-19208
20. Lü JM, Lin PH, Yao Q and Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal compilation Foundation for Cellular and Molecular Medicine. 2010; 14(4):840-860
21. ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ [Internet]. เอื้องครั่ง. [cited 2015 Oct 20]. Available from: http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=1308

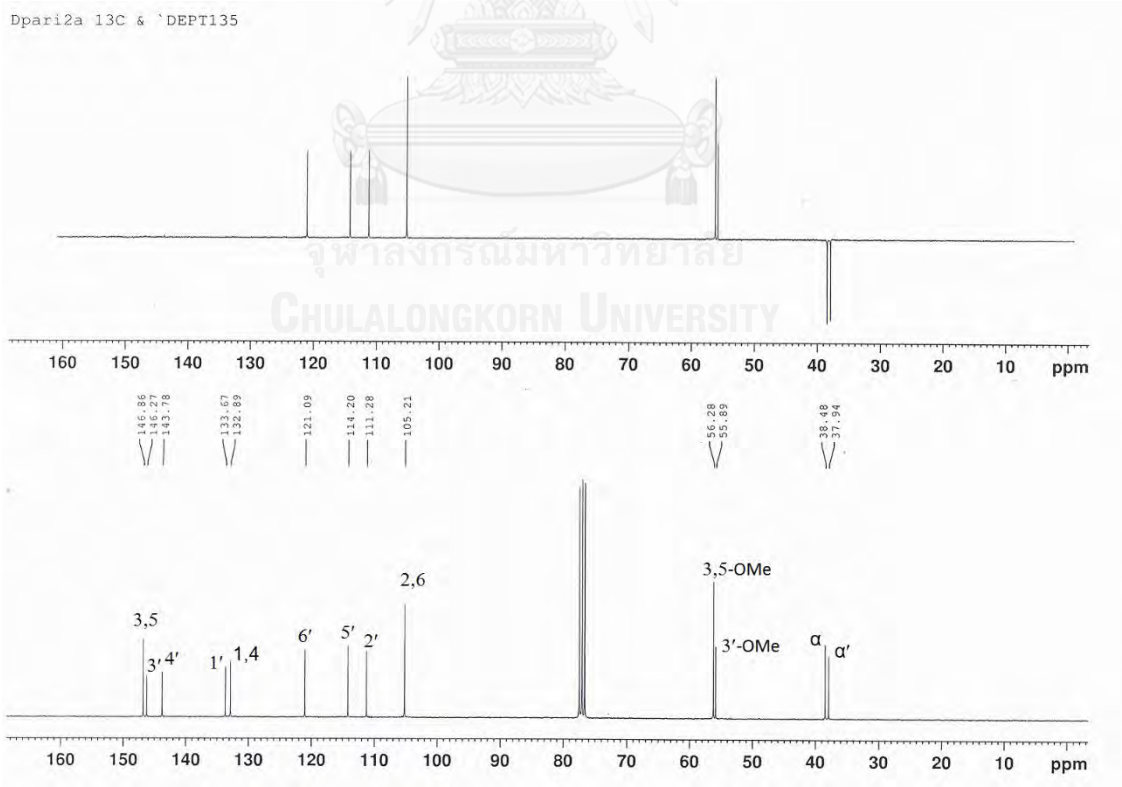
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ภาคผนวก

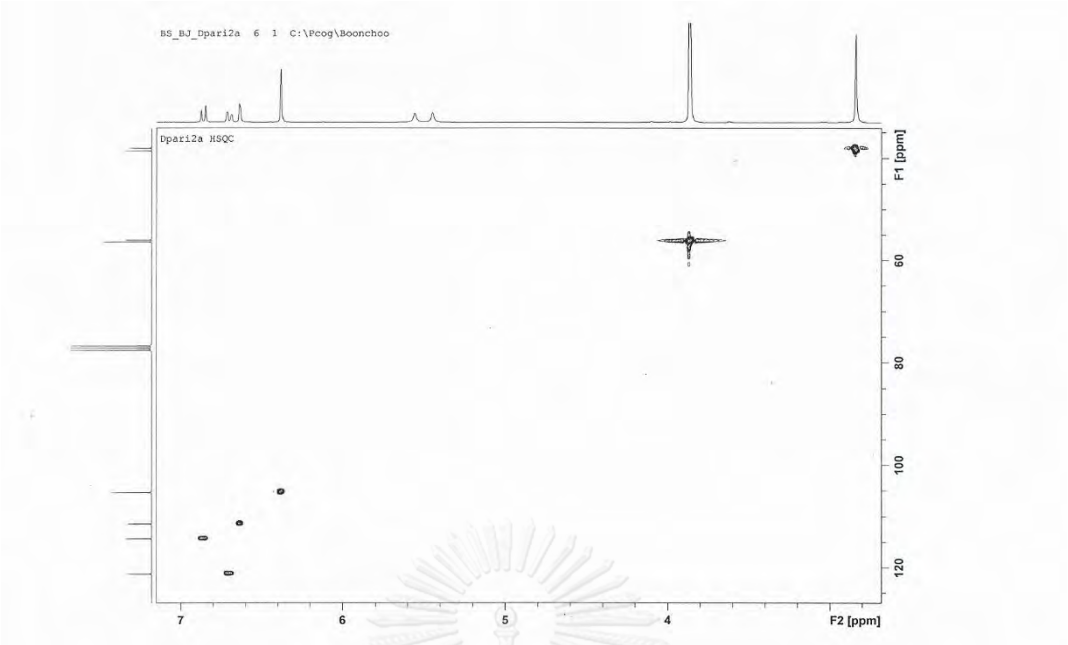


รูปที่ 13: ^{1}H NMR spectroscopy ของ moscatilin

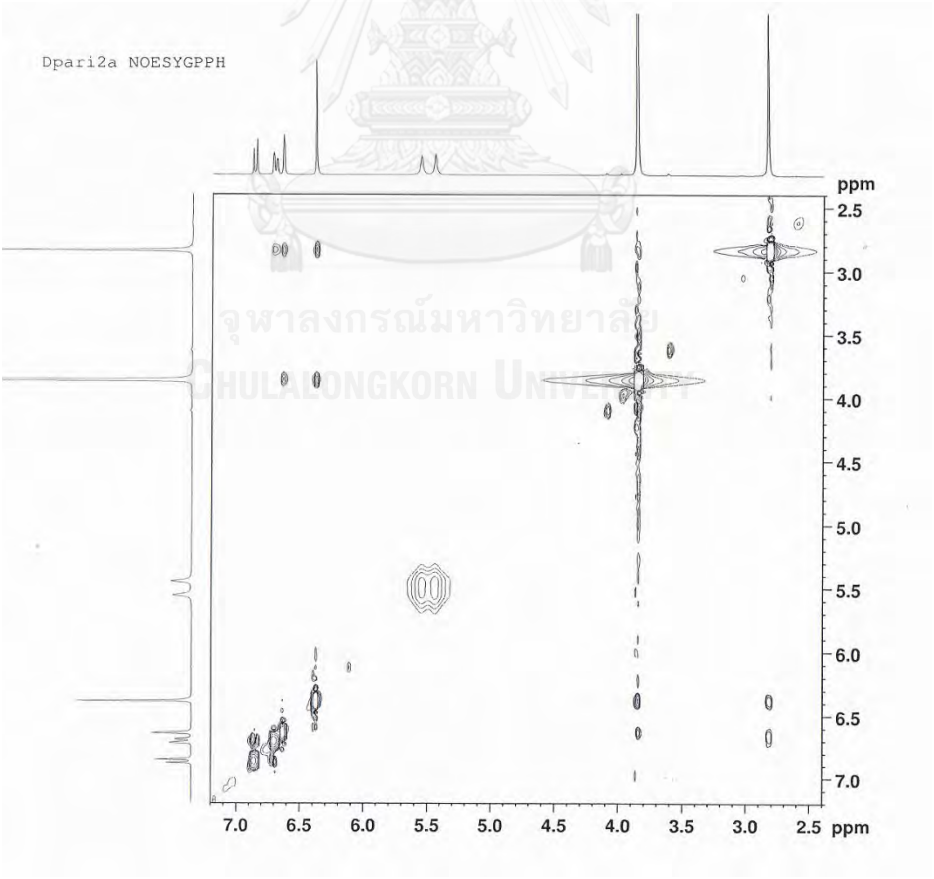


รูปที่ 14: ^{13}C NMR spectroscopy ของ moscatilin

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

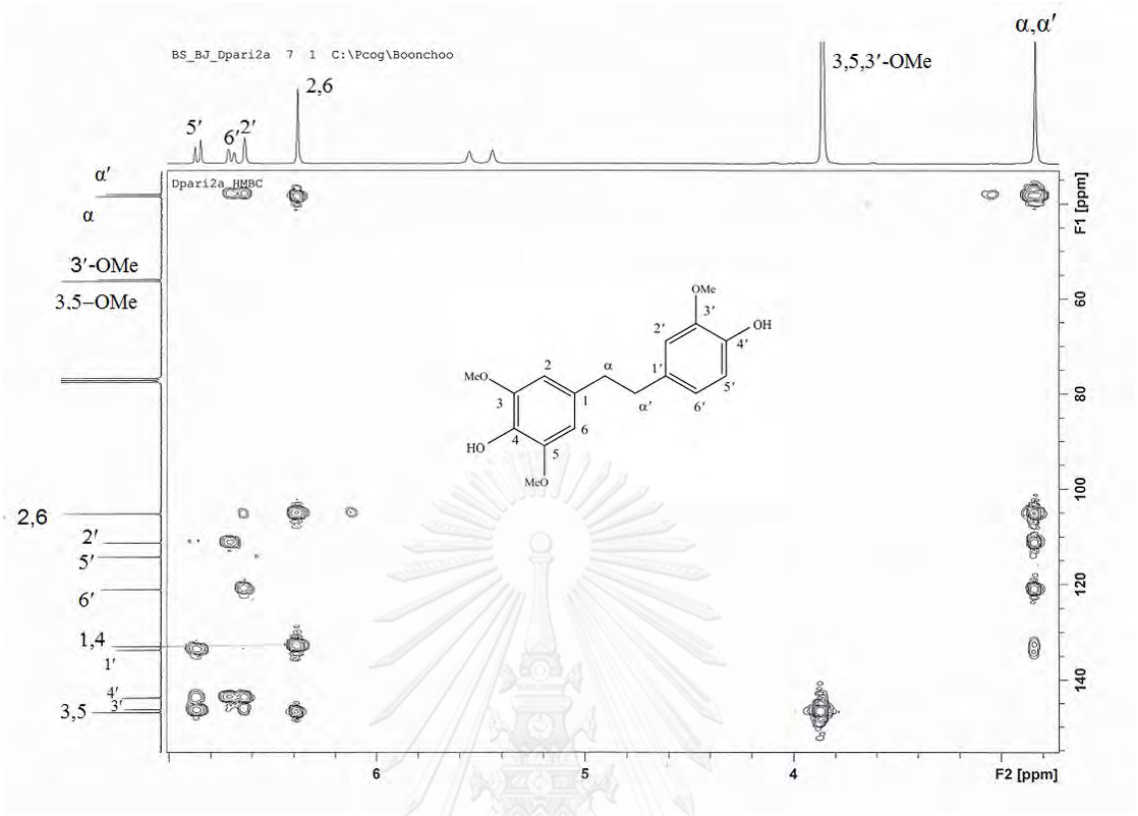


รูปที่ 15: HSQC NMR spectroscopy ของ moscatilin

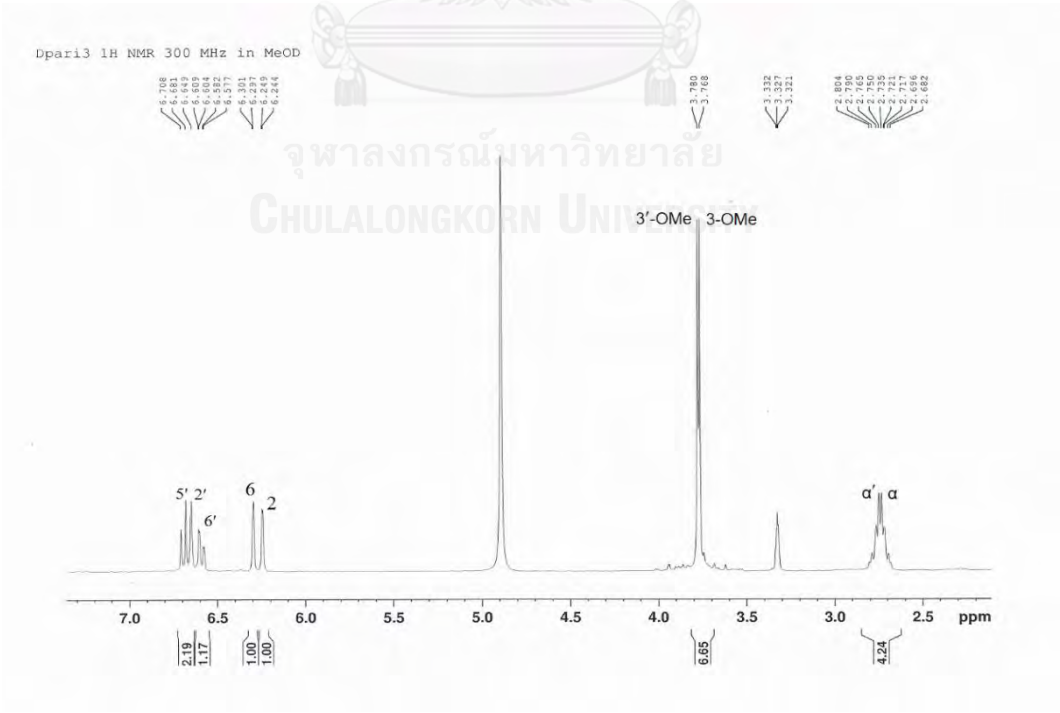


รูปที่ 16: NOESY NMR spectroscopy ของ moscatilin

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้มีการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



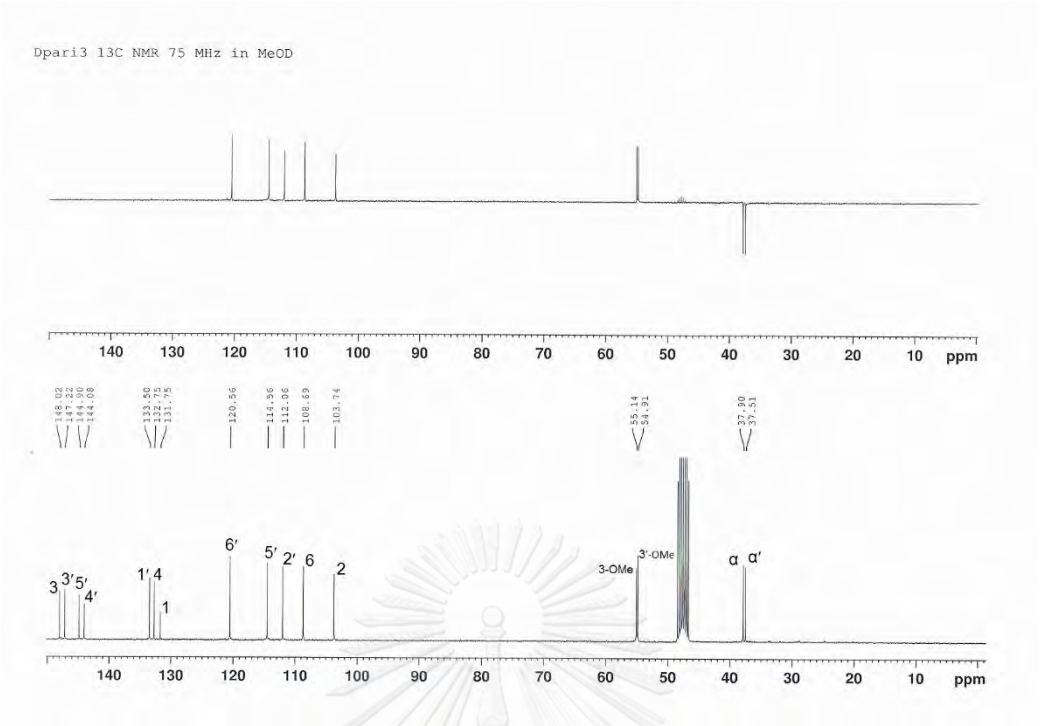
รูปที่ 17: HMBC NMR spectroscopy ของ moscatilin



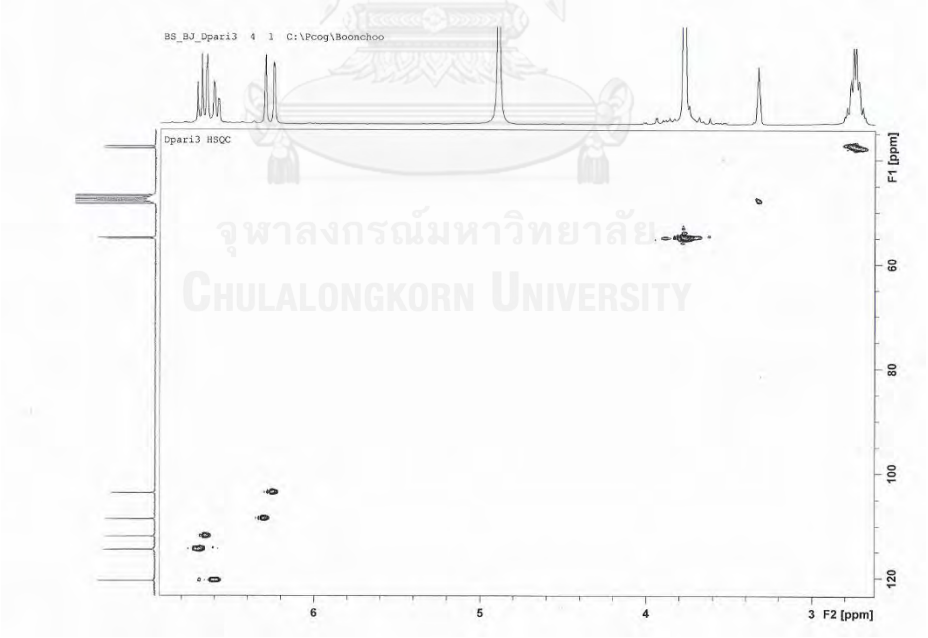
รูปที่ 18: ^{1}H NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



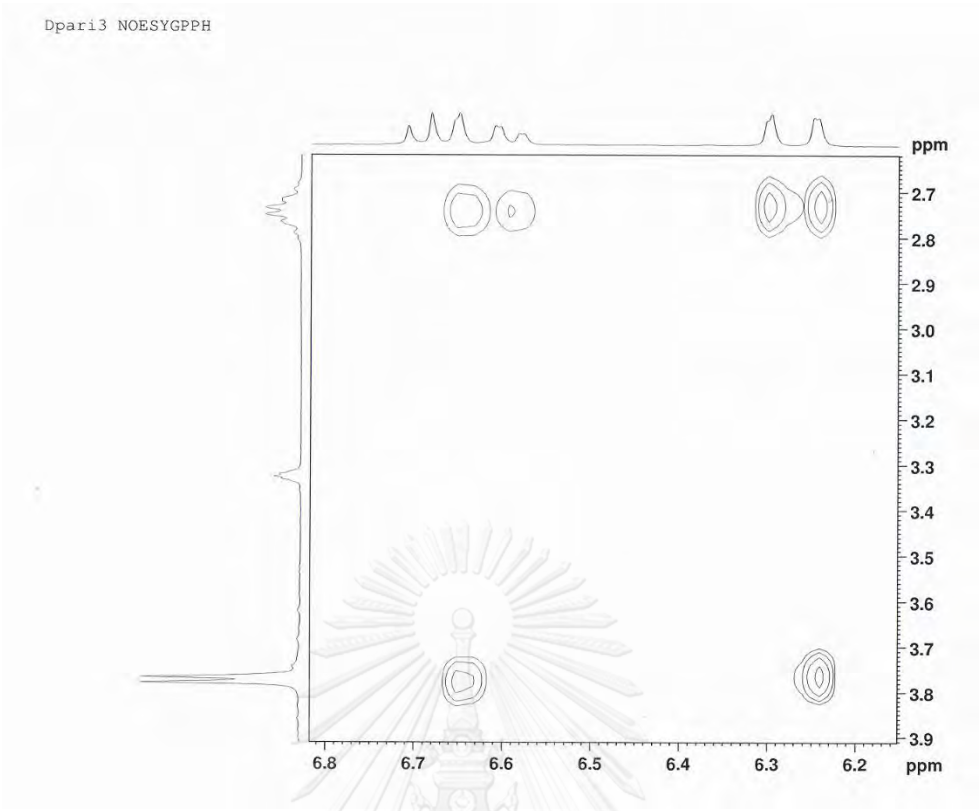
รูปที่ 19: ^{13}C NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl



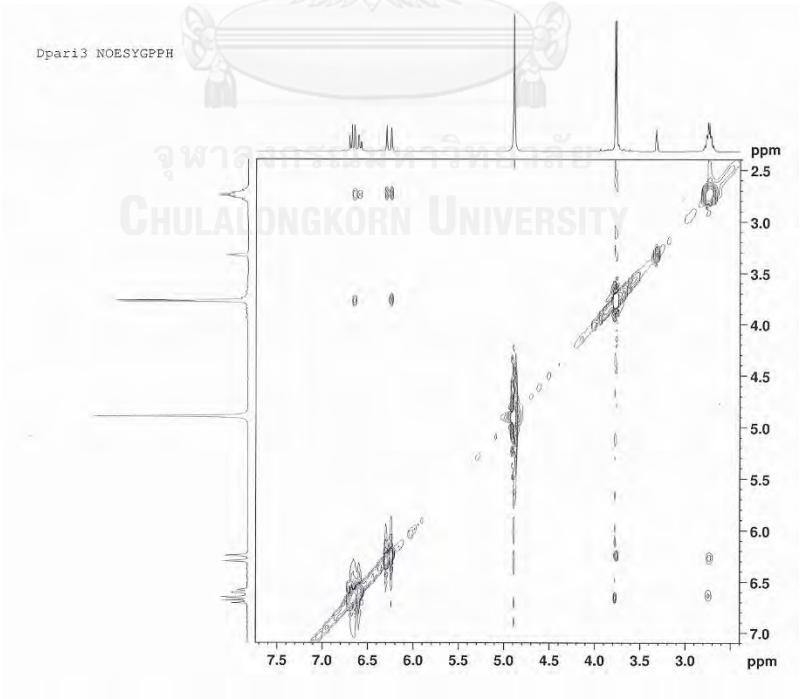
รูปที่ 20: HSQC NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

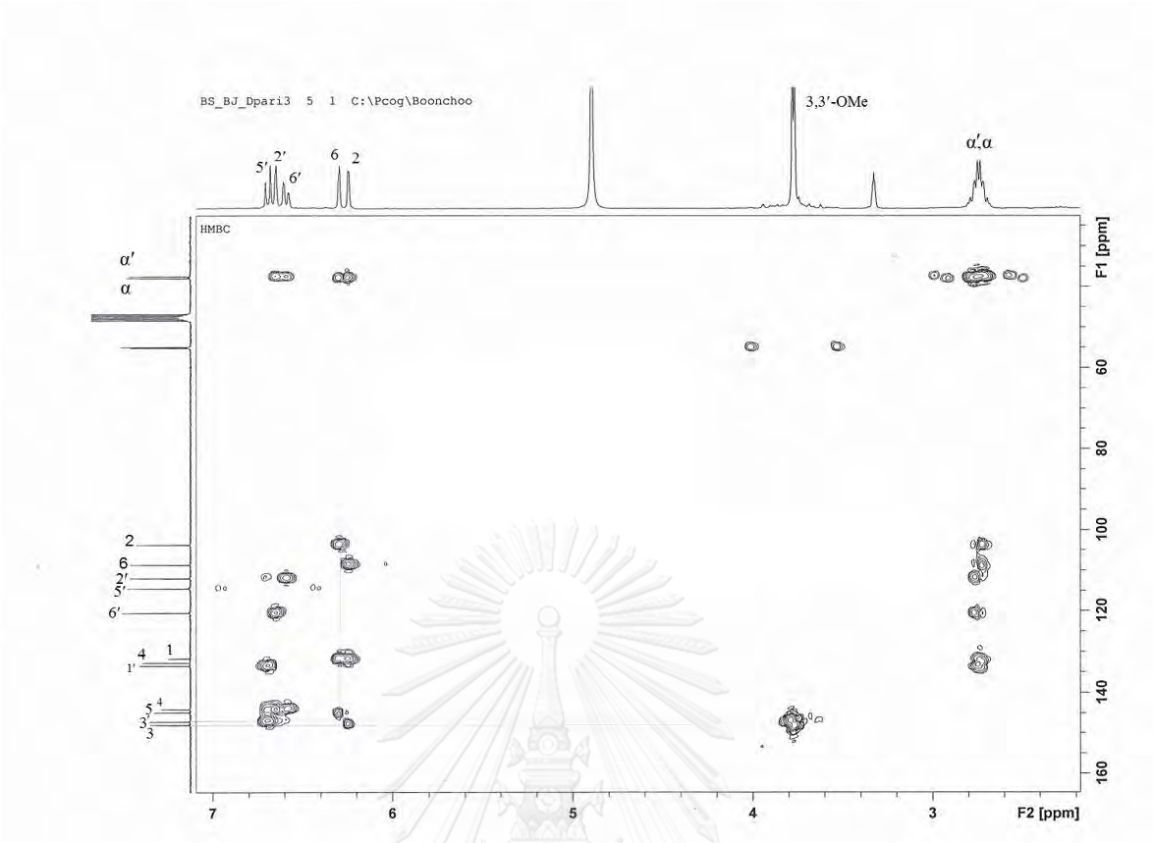


รูปที่ 21: NOESY NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl



รูปที่ 22: NOESY NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl

บทคัดย่อและฟ้อนข้อความฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 23: HMBC NMR spectroscopy ของ 4,5,4′-trihydroxy-3,3′-dimethoxybibenzyl

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.