

การศึกษาสารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกทองกวาว

นายสุธารินทร์ ปรีเปรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ปีการศึกษา 2568

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

การศึกษาสารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกทองกวาว

นายสุธารินทร์ ปรีเปรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ปีการศึกษา 2568
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

เรื่อง การศึกษาสารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกทองกวาว

โดย นายสุธารินทร์ ปรีเปรม

ได้รับอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. ดร.วันฉัตร ศิริสาร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อวัช วิเศษสัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฤชา ทับทิมใหม่)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิกานต์ ซ่อนกลิ่น)

ชื่อ : นายสุธารินทร์ ปรีเปรม
ชื่อวิทยานิพนธ์ : การศึกษาสารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกทองกวาว
สาขาวิชา : เคมีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อวัช วิเศษสัย
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฤชา ทับทิมใหม่
ปีการศึกษา : 2568

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีจากดอกทองกวาว (*Butea monosperma*) นำไปสู่การแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบฟลาโวนอยด์และอนุพันธ์รวม 7 ชนิด ได้แก่ medicarpin (**1**), sulfuretin (**2**), liquiritigenin (**3**), kaempferol (**4**), butein (**5**), iso-butrin (**6**) และ butrin (**7**) โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี NMR ในการวิเคราะห์โครงสร้าง สารประกอบที่แยกได้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จากผลการทดลองในระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสี พบว่า liquiritigenin (**3**) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้อย่างดีเยี่ยม (IC_{50} = 13.07 ± 2.58 µM) โดยมีกลไกการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) และสามารถลดการสร้างเม็ดสีในเซลล์ MNT-1 ได้ถึง 41% ที่ความเข้มข้น 300 µM โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ butein (**5**) และ sulfuretin (**2**) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงสุดในการทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP นอกจากนี้ butein (**5**) ยังแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ในการทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและเซลล์มะเร็ง medicarpin (**1**) แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* ได้ดีที่สุด (MIC = 30 µM) และที่สำคัญคือสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของทั้งเชื้อ *C. acnes* และ *Staphylococcus aureus* ได้อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง พบว่า sulfuretin (**2**) และ butein (**5**) มีฤทธิ์ระดับปานกลางต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 ในขณะที่ kaempferol (**4**), butein (**5**) และ iso-butrin (**6**) มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa งานวิจัยนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดจากดอกทองกวาว และข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการต่อยอดสู่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเวชสำอางและยาต่อไป

(มีจำนวนทั้งสิ้น 94 หน้า)

คำสำคัญ : ดอกทองกวาว ฤทธิ์ทางชีวภาพ การยับยั้งเอนไซม์ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Name : Mr. Sutarin Preepram
Thesis Title : Study of secondary metabolites and biological activities of *Butea monosperma* flowers
Major Field : Industrial Chemistry
King Mongkut's University of Technology North Bangkok
Thesis Advisor : Assistant Professor Awat Wisetsai
Co-Advisor : Assistant Professor Lueacha Tabtimmai
Academic Year : 2025

ABSTRACT

Phytochemical studies of the flowers of Thong-Kwaw (*Butea monosperma*) led to the isolation and identification of seven flavonoid compounds and their derivatives, namely medicarpin (**1**), sulfuretin (**2**), liquiritigenin (**3**), kaempferol (**4**), butein (**5**), iso-butrin (**6**), and butrin (**7**), using NMR spectroscopic techniques for structural analysis. The isolated compounds exhibited diverse biological activities. In melanin biosynthesis pathway, liquiritigenin (**3**) showed excellent tyrosinase inhibitory activity (IC_{50} = 13.07 ± 2.58 μM) via a competitive inhibition mechanism and reduced melanin production in MNT-1 cells by 41% at a concentration of 300 μM without cytotoxic effects. Additionally, butein (**5**) and sulfuretin (**2**) demonstrated strong antioxidant activities using DPPH, ABTS, and FRAP assays and butein (**5**) exhibited anti-inflammatory activity through potent inhibition of nitric oxide (NO) production. In antibacterial and anticancer activity tests, medicarpin (**1**) showed the most potent activity against *Cutibacterium acnes* (MIC = 30 μM) and significantly inhibited biofilm formation by both *C. acnes* and *Staphylococcus aureus*. For anti-cancer activity, sulfuretin (**2**) and butein (**5**) displayed moderate effects against HCT116 colon cancer cells, while kaempferol (**4**), butein (**5**), and iso-butrin (**6**) were active against HeLa cervical cancer cells. In conclusion, this study highlights the significant potential of *B. monosperma* flower extracts, providing valuable insights for future applications in the cosmetic and pharmaceutical industries. Potential of *B. monosperma* flower extracts, providing valuable insights for future applications in the cosmetic and pharmaceutical industries.

(Total 94 Pages)

Keywords: *Butea monosperma* flowers, Biological activities, Enzyme inhibitor, Anti-bacterial, Anti-cancer

_____ Advisor

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง “การศึกษาสารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกทองกวาว” สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจากคณาจารย์ บุคลากรและหน่วยงานต่าง ๆ ที่สนับสนุน ขอขอบคุณคณาจารย์ และหน่วยงานที่ให้ความอนุเคราะห์ดังนี้

ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ที่ได้ให้ความสนับสนุนในเรื่องสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการของภาควิชาที่ได้ให้ความช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย

ผศ.ดร.อวัช วิเศษสัย อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้แนวคิดและคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง ตลอดจนช่วยชี้แนะในการแก้ปัญหาในยามยากลำบาก ผศ.ดร.ฤชา ทับทิมใหม่ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้แนวคิดและคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง รวมถึงคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ศิษย์ตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ในภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม อ.ดร.อนุพงษ์ จูมแพง ที่คอยให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบคุณบิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อน ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านเสมอมา จนสำเร็จการศึกษา หากวิทยานิพนธ์มีข้อบกพร่องประการใด ทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สุธารินทร์ ปรีเปรม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขตงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและสมบัติทางชีวภาพ 4
2.2 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์และสารสำคัญในทองกวาว 11
2.3 สารพฤกษเคมีที่พบในแต่ละส่วนหลักของทองกวาว 13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 22
3.1 ตัวอย่างพืช 22
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 22
3.3 เชื้อแบคทีเรียในการทดลอง 25
3.4 การสกัดส่วนสกัดหยาบ 25
3.5 การแยกสารและทำให้บริสุทธิ์ 25
3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 26
3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส 27
3.8 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของสาร Liquiritigenin (**3**) 28
3.9 การจำลองการจับกันของโมเลกุล (Molecular Docking Simulation) 28
3.10 การทดสอบฤทธิ์ลดการเกิดเม็ดสีเมลานิน 28
3.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาว 30

3.12 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารที่ **1–7** 30
3.13 การทดสอบฤทธิ์ต้านกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสของสารที่ **1–7** 32
3.14 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ของสารที่ **1–6** 33
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 34
4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่พบ 34
4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 47
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร **1–7** 51
4.4 การจำลองการจับกันของโมเลกุล (Molecular docking simulation) ของสาร 3.. 52
4.5 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของสาร Liquiritigenin (**3**) 54
4.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (Cytotoxicity on keratinocyte cell) ของสาร **3** 56
4.8 การทดสอบการยับยั้งการลดเม็ดสีชนิด MNT-1 ของสาร **3** 57
4.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation) 59
4.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารที่ **1–7** 60
4.11 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสของสาร **1–7** 64
4.12 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa 65
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 67
5.1 สรุปผลการทดลอง 67
5.2 ข้อเสนอแนะ 68
บรรณานุกรม 69
ภาคผนวก ก รูปภาพ 80
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลาย 90
ภาคผนวก ค การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 93
ประวัติผู้เขียน 94

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2-1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบจากดอกทองกวาว 12

ตารางที่ 2-2 สารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในต้นทองกวาว 18

ตารางที่ 3-1 อุปกรณ์และเครื่องมือ 22

ตารางที่ 3-2 สารเคมี 24

ตารางที่ 3-3 องค์ประกอบและสัดส่วนของขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส 27

ตารางที่ 4-1 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Medicarpin (1) 36

ตารางที่ 4-2 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Sulfuretin (2) 37

ตารางที่ 4-3 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Liquiritigenin (3) 39

ตารางที่ 4-4 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Kaempferol (4) 40

ตารางที่ 4-5 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Butein (5) 42

ตารางที่ 4-6 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Iso-butrin (6) 43

ตารางที่ 4-7 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Butrin (7) 45

ตารางที่ 4-8 การค้นพบสารที่แยกได้กับพืชชนิดอื่น 46

ตารางที่ 4-9 ตารางสรุปฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 50

ตารางที่ 4-10 ผลของสาร Liquiritigenin (3) ต่อค่าคงที่ทางจลน์ของเอนไซม์ไทโรซิเนส 56

ตารางที่ 4-11 ค่าความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (clear zone) 61

ตารางที่ 4-12 ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและฆ่าแบคทีเรีย 62

ตารางที่ 4-13 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) และเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (HeLa) ของสารที่ 1–7 66

ตารางที่ ข-1 การเตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH stock solution ปริมาตร 100 mL 90

ตารางที่ ข-2 การเตรียมสารละลาย 7 mM ABTS stock solution ปริมาตร 50 mL 90

ตารางที่ ข-3 การเตรียมสารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ stock solution ปริมาตร 25 mL 90

ตารางที่ ข-4 การเตรียมสารละลาย 0.3 M acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 50 mL 90

ตารางที่ ข-5 การเตรียมสารละลาย 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl ปริมาตร 10 mL 90

ตารางที่ ข-6 การเตรียมสารละลาย mM $FeCl_3$ 20 ปริมาตร 10 mL 91

ตารางที่ ข-7 การเตรียม Potassium phosphate buffer saline (pH 6.8) ปริมาตร 100 mL ... 91

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ข-8 การเตรียม 6 mM L-Tyrosine (pH 6.8) ปริมาตร 30 mL 91
ตารางที่ ข-9 การเตรียม 1XPBS (pH 7.4) ปริมาตร 50 mL 91
ตารางที่ ข-10 การเตรียม 0.5 mg/mL MTT reagent ปริมาตร 20 mL 92
ตารางที่ ข-11 การเตรียมสารละลาย Resazurin 10X ปริมาตร 1 mL 92
ตารางที่ ข-12 การเตรียมสารละลาย 1% Crystal violet 92
ตารางที่ ค-1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (Tryptone Soya Broth) 93
ตารางที่ ค-2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB Agar (Tryptone Soya Broth Agar) 93

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1-1 แผนผังสรุปขอบเขตงานวิจัย 2
ภาพที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบแอลคาลอยด์ 4
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบสติลบีน 5
ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของ 3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) 6
ภาพที่ 2-4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่พบในขิง 7
ภาพที่ 2-5 ลักษณะของดอกทองกวาว โดย สุธารินทร์ ปรีเปรม 12
ภาพที่ 2-6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟลาวาโนน (flavanone) 14
ภาพที่ 2-7 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบชาลโคน (Chalcone) 15
ภาพที่ 2-8 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบไอโซฟลาโวน (Isoflavone) 15
ภาพที่ 2-9 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟลาโวนอล (Flavonol) 16
ภาพที่ 2-10 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเทอโรคาร์แพน (Pterocarpan) 16
ภาพที่ 2-11 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบออโรน (Aurone) 17
ภาพที่ 2-12 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบอื่นๆ เช่น Vanillic acid 17
ภาพที่ 4-1 โครงสร้างสารที่ **1** 35
ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์ HMBC ↷ และ ^{1}H-^{1}H COSY ของสาร Medicarpin (**1**) 35
ภาพที่ 4-3 โครงสร้างสารที่ **2** 37
ภาพที่ 4-4 โครงสร้างสารที่ **3** 39
ภาพที่ 4-5 โครงสร้างสารที่ **4** 40
ภาพที่ 4-6 โครงสร้างสารที่ **5** 41
ภาพที่ 4-7 โครงสร้างสารที่ **6** 44
ภาพที่ 4-8 โครงสร้างสารที่ **7** 45
ภาพที่ 4-9 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสาร **1–7** 48
ภาพที่ 4-10 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารที่ **1–7** 49
ภาพที่ 4-11 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารที่ **1–7** 50
ภาพที่ 4-12 กลไกลการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• และ $ABTS^{\bullet+}$ ของสาร sulfuretin (**2**) 51
ภาพที่ 4-13 ฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารที่ **1–7** 52

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4-14 อันตรกิริยาของ Tropolone ภายในบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนส 53
ภาพที่ 4-15 อันตรกิริยาของ liquiritigenin (**3**) ภายในบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนส..... 54
ภาพที่ 4-16 กราฟ Michaelis–Menten ของสาร **3** 55
ภาพที่ 4-17 กราฟ Lineweaver–Burk แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส
โดยสาร liquiritigenin ในช่วงความเข้มข้น 30–120 μM โดยใช้ L-tyrosine
เป็นซับสเตรตในช่วงความเข้มข้น 0.15–4.8 mM..... 56
ภาพที่ 4-18 การรอดชีวิตของเซลล์ผิวหนัง (HaCaT cell)..... 57
ภาพที่ 4-19 การลดลงของเม็ดสีเมลานินในเซลล์เม็ดสี MNT-1 ของสาร **3** 58
ภาพที่ 4-20 การรอดชีวิตของเซลล์เม็ดสีเมลาโนไซต์ (MNT-1) 58
ภาพที่ 4-21 ปริมาณไนตริกออกไซด์ (NO) ที่ถูกปล่อยออกมาโดยใช้สารที่ความเข้มข้น 150 μM... 60
ภาพที่ 4-22 MBC ของสาร **1** และ **3** ต่อเชื้อ *C. acnes* 62
ภาพที่ 4-23 การก่อตัวไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *C. acnes* ของสาร medicarpin (**1**)..... 63
ภาพที่ 4-24 การก่อตัวไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 10832 ของสาร
medicarpin (**1**)..... 64
ภาพที่ 4-25 ฤทธิ์การต้านเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสของสารที่ **1–7**..... 65
ภาพที่ 5-1 สารทั้งหมดที่แยกได้จากดอกทองกวาว 67
ภาพที่ ก-1 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, $CDCl_3$) ของสาร Medicarpin (**1**)..... 80
ภาพที่ ก-2 ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum ของสาร Medicarpin (**1**)..... 81
ภาพที่ ก-3 COSY spectrum ของสาร Medicarpin (**1**)..... 81
ภาพที่ ก-4 HSQC spectrum ของสาร Medicarpin (**1**)..... 82
ภาพที่ ก-5 HMBC spectrum ของสาร Medicarpin (**1**)..... 82
ภาพที่ ก-6 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, $CDCl_3$) ของสาร Sulfuretin (**2**)..... 83
ภาพที่ ก-7 ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum ของสาร Sulfuretin (**2**)..... 83
ภาพที่ ก-8 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, Acetone-d_6) ของสาร Liquiritigenin (**3**)..... 84

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ ก-9 ^{13}C-NMR (100 MHz, Acetone-d_6) spectrum ของสาร Liquiritigenin (**3**) 84
ภาพที่ ก-10 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, DMSO-d_6) ของสาร Kaempferol (**4**) 85
ภาพที่ ก-11 ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) spectrum ของสาร Kaempferol (**4**) 86
ภาพที่ ก-12 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, Acetone-d_6) ของสาร Butein (**5**) 86
ภาพที่ ก-13 ^{13}C-NMR (100 MHz, Acetone-d_6) spectrum ของสาร Butein (**5**) 87
ภาพที่ ก-14 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสาร Iso-butrin (**6**) 87
ภาพที่ ก-15 ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum ของ Iso-butrin (**6**) 88
ภาพที่ ก-16 รูปที่ ก-16 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสาร Butrin (**7**) 88
ภาพที่ ก-17 ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) spectrum ของสาร Butrin (**7**) 89
ภาพที่ ก-18 IC_{50} ของสารประกอบ **2–7** ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 89

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

แนวโน้มการวิจัยและพัฒนาในระดับสากลได้ให้ความสำคัญกับการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) จากแหล่งธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นทางเลือกในการจัดการกับปัญหาสุขภาพที่กลายเป็นหนึ่งในปัญหาของชาติที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็วทำให้ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของผิวหนัง และโรคไม่ติดต่อ เช่น เบาหวาน ความดัน และการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งล้วนมีปัจจัยร่วมที่สำคัญคือ ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และการอักเสบในระดับเซลล์ (World Health Organization, 2022; Atanasov et al., 2015)

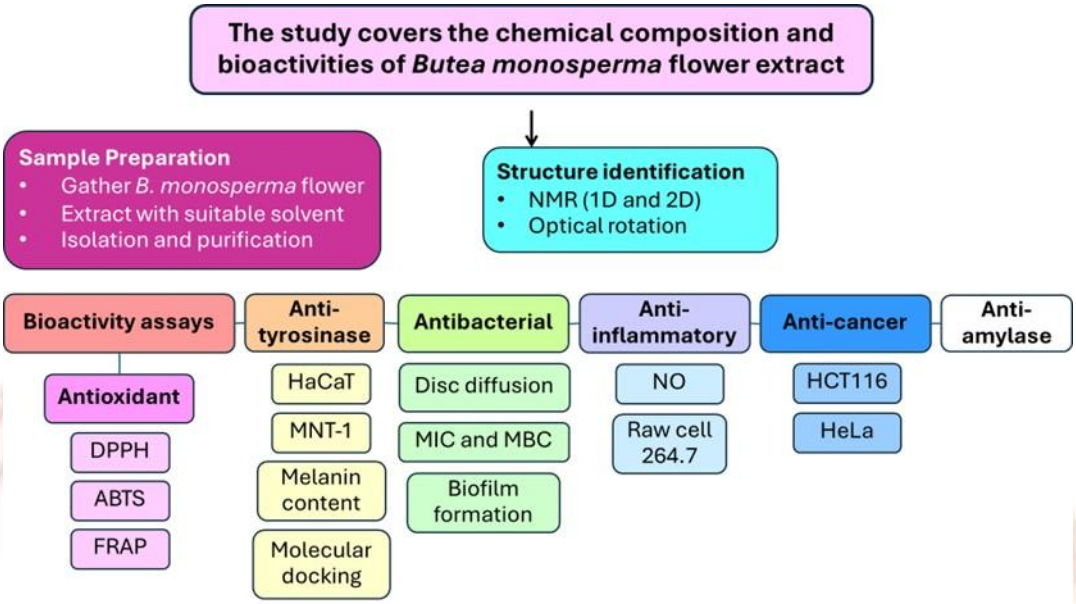
ดอกทองกวาว (*Butea monosperma*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้าน ในภูมิภาคเอเชียใต้ รวมถึงประเทศไทย ได้รับความสนใจอย่างมากในฐานะแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีศักยภาพ โดยมีรายงานว่า ส่วนของดอกจะประกอบด้วยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนหลายชนิด เช่น butein, butrin, iso-butrin, palasitrin, liquiritigenin และ สารในกลุ่ม isoliquiritigenin (Yadava & Tiwari, 2005) โดยมีงานวิจัยก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกทองกวาวมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Sharma & Kalia, 2021), ต้านริ้วรอยและการสร้างเมลานิน (Rasheed et al., 2017) รวมถึงฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Sutar, 2019) แม้จะมีหลักฐานสนับสนุนศักยภาพของสารสกัดหยาบจากทองกวาว แต่การนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงลึกยังคงมีข้อจำกัด ซึ่งสารสกัดหยาบประกอบไปด้วยสารสำคัญจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าสารใดเป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก (Atanasov et al., 2015) ด้วยเหตุนี้ งานวิจัยที่มุ่งเน้นไปที่การแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์จากดอกทองกวาว และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านี้ ทั้งการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน การเสื่อมของผิวหนัง การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง เพื่อเป็นข้อมูลเชิงลึกในเรื่องของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเชิงลึกในการนำข้อมูลดังกล่าวไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 แยกและพิสูจน์สารพฤกษเคมีในดอกทองกวาวที่เจริญเติบโตในประเทศไทย

1.2.2 ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ได้แก่ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส การยับยั้งการผลิตเม็ดสี การยับยั้งการอักเสบ การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง และการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

1.3 ขอบเขตงานวิจัย



ภาพที่ 1-1 แผนผังสรุปขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 การศึกษาการแยกองค์ประกอบทางเคมีในดอกทองกวาวโดยใช้เทคนิค Liquid-solid Chromatographyและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีที่พบในดอกทองกวาว โดยวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่งรวมทั้ง 1D และ 2D NMR และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น การตอบสนองต่อระนาบแสง (optical rotation) ตามความเหมาะสมของโครงสร้าง

1.3.2 ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยทดสอบเพื่อหาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ของสารบริสุทธิ์ในด้านต่างๆ เช่นเครื่องสำอาง และการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา ด้วยฤทธิ์ antioxidant, anti-inflammatory, anti-tyrosinase, antibacterial, anticancer และ anti-amylase

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบสารพฤกษเคมีในดอกทองกวาวที่เจริญเติบโตในประเทศไทย

1.4.2 ทำให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่พบต่อการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้งานในเครื่องสำอาง (การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส การยับยั้งการผลิตเม็ดสี การยับยั้งการ

อักเสบ การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง) และฤทธิ์ที่นำไปใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา (การยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง การยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส)

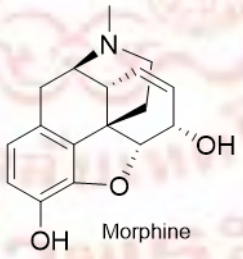
1.4.3 ทราบข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นแนวทางในการใช้งานกับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมยา

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและสมบัติทางชีวภาพ

ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติคือสารที่ผลิตขึ้นและพบในสิ่งมีชีวิต โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก คือ สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) สารปฐมภูมิมีบทบาทโดยตรงในกระบวนการดำรงชีวิต เช่น การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ ตัวอย่างเช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ในขณะที่สารทุติยภูมิไม่ได้เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการดำรงชีวิต แต่มีความสำคัญในการช่วยสิ่งมีชีวิตให้สามารถอยู่รอดและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ (Elshafie et al., 2023) ตัวอย่างของสารทุติยภูมิ ได้แก่ สารกลุ่มแอลคาลอยด์ สติลบีน เป็นต้น

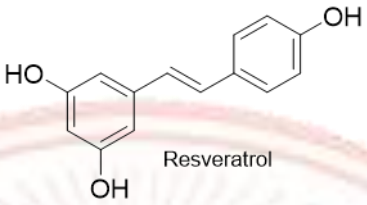
แอลคาลอยด์ (Alkaloids): คือกลุ่มของสารอินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติ ซึ่งมีไนโตรเจน (N) เป็นส่วนประกอบหลักในโครงสร้าง อะตอมไนโตรเจนในแอลคาลอยด์ทำให้สารมีลักษณะเป็นด่าง (alkaline) เนื่องจากไนโตรเจนสามารถจับกับโปรตอน (H^+) ซึ่งทำให้สารมีคุณสมบัติเป็นเบสในสารละลาย แอลคาลอยด์มีประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวาง เช่น Morphine เป็นแอลคาลอย์ที่พบในฝิ่น (Papaver somniferum) ถูกนำมาใช้เป็นยาระงับอาการปวดในปัจจุบัน (Kurek., 2019)



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบแอลคาลอยด์

สติลบีน (Stilbenes): สติลบีนเป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างหลักคือ 1,2-diphenylethene ซึ่งสามารถเกิดเป็น stereoisomers ได้ 2 รูปแบบ คือ *trans* และ *cis* โดยที่ *trans*-stilbene เป็นรูปแบบที่พบได้บ่อยที่สุดในพืช สติลบีนถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น resveratrol เป็นสติลบีนที่พบในองุ่น (*Vitis vinifera* L.) ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr) และบลูเบอร์รี่

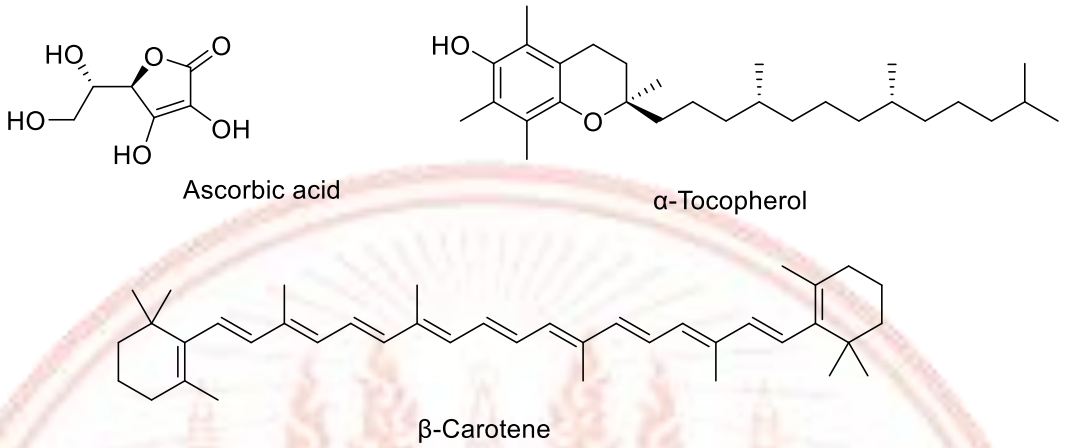
(Vaccinium corymbosum) เป็นต้น ถูกนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและบำรุงผิว (Kluska et al., 2023)



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบสติลบีน

2.1.1 อนุมูลอิสระ (Free radicals) และการอักเสบ (inflammation)

อนุมูลอิสระคือโมเลกุลที่สามารถดำรงอยู่ได้อย่างอิสระ โดยมีลักษณะเฉพาะคือมีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ในวงโคจรของอะตอม ดังนั้นอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่จะทำให้อนุมูลอิสระส่วนใหญ่มีสภาพไม่เสถียรและมีความว่องไวสูง อนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยาได้สองแบบ คือ การให้อิเล็กตรอนหรือการรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่น ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งสารออกซิแดนท์ (oxidants) และสารรีดิวซ์ (reductants) อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับสภาวะของโรคหลายชนิดนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นสารที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไฮดรอกซิลแรดิคัล (hydroxyl radical) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนแรดิคัล (superoxide anion radical) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ออกซิเจนซิงเกลต (oxygen singlet) ไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite) ไนตริกออกไซด์แรดิคัล (nitric oxide radical) และเปอร์ออกซีไนไตรต์แรดิคัล (peroxynitrite radical) สารเหล่านี้มีความว่องไวสูง และสามารถทำลายโมเลกุลที่มีความสำคัญทางชีวภาพในร่างกายได้ เช่น DNA โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งพบได้ทั้งในนิวเคลียสและเยื่อหุ้มเซลล์ (Lobo et al., 2010) ในทางตรงกันข้ามสารต้านอนุมูลอิสระสามารถนิยามได้ว่าเป็นโมเลกุลที่มีความเสถียรเพียงพอในการให้อิเล็กตรอนให้แก่อนุมูลอิสระ เพื่อลดศักยภาพในการก่อความเสียหายต่อเซลล์ โดยมีคุณสมบัติสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ก่อนที่โมเลกุลสำคัญจะถูกทำลาย สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็นสองประเภทหลัก คือ สารที่ร่างกายสามารถสร้างเองได้ และสารที่ต้องได้รับจากอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระที่มีมวลโมเลกุลต่ำบางชนิด เช่น กลูตาไธโอน (glutathione) ยูบิควิโนล (ubiquinone) และกรดยูริก (uric acid) จะถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการเผาผลาญภายในร่างกาย ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ เช่น วิตามินอี (α-tocopherol) วิตามินซี (ascorbic acid) และเบต้าแคโรทีน (β-carotene) หรือสาร resveratrol ที่กล่าวข้างต้นต้องได้รับจากอาหาร เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง (Lobo et al., 2010)

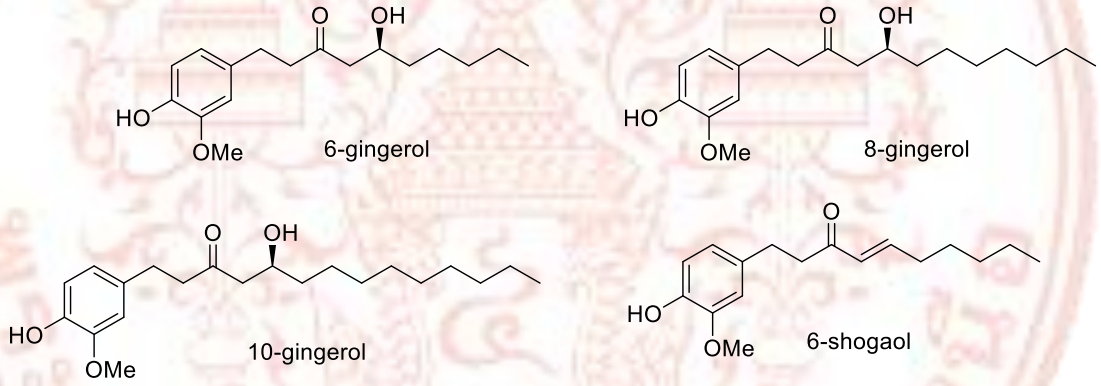


ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของ 3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ*:* สารต้านอนุมูลอิสระออกฤทธิ์ผ่านกลไกทางเคมีที่หลากหลาย ได้แก่ การถ่ายโอนอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer: HAT) การถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว (Single Electron Transfer: SET) และการจับโลหะทรานซิชันในรูปแบบคีเลต (metal chelation) โดยทั่วไปแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดอาจออกฤทธิ์ผ่านหลายกลไกพร้อมกัน หรือมีกลไกหลักเพียงหนึ่งกลไก ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสารเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดลักษณะการเกิดปฏิกิริยา การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่ม HAT ซึ่งวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งอนุมูลอิสระผ่านการให้อะตอมไฮโดรเจน ตัวอย่างวิธีการในกลุ่มนี้ได้แก่ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) (Re et al., 1999) ส่วนกลุ่ม SET จะตรวจวัดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระไปยังสารออกซิไดซ์ เช่น โลหะ หรือคาร์บอนิล ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของสาร ตัวอย่างวิธีการในกลุ่มนี้ ได้แก่ FRAP, Folin–Ciocalteu นอกจากนี้ยังมีวิธีการแบบผสม (HAT/SET) เช่น DPPH และ ABTS ซึ่งสามารถตอบสนองต่อกลไกทั้งสองได้ในเวลาเดียวกัน (Brand-Williams et al., 1995)

แม้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะมีบทบาทสำคัญในการลดความเสียหายของเซลล์จากความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) แต่ในระดับโมเลกุล ความเครียดออกซิเดชันยังเป็นปัจจัยกระตุ้นสำคัญของกระบวนการอื่นๆ เช่น การเกิดอักเสบ โดยการอักเสบเป็นกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการบาดเจ็บ การติดเชื้อ หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเองของร่างกายที่มีเป้าหมายในการจำกัดสิ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหาย การอักเสบ

อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อร่างกายและเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ สารธรรมชาติที่มีการค้นคว้าและมีฤทธิ์ทางยาต่อการต้านการอักเสบ เช่น ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) เป็นที่รู้จักกันดีว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคข้ออักเสบ ช่วยเรื่องทางเดินอาหาร (อาหารไม่ย่อย ท้องผูก และแผลในกระเพาะอาหาร) โรคหัวใจและหลอดเลือด (หลอดเลือดแดงแข็งและความดันโลหิตสูง) อาการอาเจียน โรคเบาหวาน และโรคมะเร็ง ตั้งแต่สมัยโบราณ (Mahdavi et al., 2018) พบสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในขิงประกอบด้วย 6,8,10-gingerol, 6,8,10-shagoal และ zingiberine สารเหล่านี้ช่วยลดความเสียหายจากออกซิเดชันและการอักเสบที่เกิดจากสาร chlorpyrifos ฤทธิ์การต้านการอักเสบของนั้นเป็นผลมาจากความสามารถในการลดระดับ NO, TNF-α และ caspase-3 การศึกษาทางคลินิกของ 6-shagoal ในการรักษาโรคเกาต์ในหนูทดลอง พบว่าสารช่วยลดระดับบีตา-กลูคูโรนิเดส, TNF-α และแลคเตตดีไฮโดรจีเนส



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่พบในขิง

นอกจากนี้ การศึกษาในพืชอื่นๆ จะช่วยสนับสนุนการศึกษาพฤษเคมีในธรรมชาติต่อการต้านการอักเสบ เช่น การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของเจลว่านหางจระเข้(*Aloe vera* (L.) burm) ในการเกิดรอยแดงที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลตบี (UVB) พบว่าเจลว่านหางจระเข้สามารถลดรอยแดงได้อย่างมีนัยสำคัญและพบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าครีมไฮโดรคอร์ติโซน ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นสารต้านการอักเสบในโรคผิวหนังได้ สารสกัดแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* L) พบว่ามีการยับยั้งการเกิดการอักเสบผ่านกลไก COX/PEE2 โดยการลด TNF-α, IL-6 และ IL-1β กัญชา (*Cannabis sativa* L) มักมีสารสำคัญในการช่วยรักษาโรคที่เกี่ยวข้อกับการอักเสบ เช่นสาร cannabidiol (CBD) และ

tetrahydrocannabinol สารนี้ถูกนำมาใช้เพื่อปกป้องระบบประสาท ควบคุมสมดุลของผิวหนัง และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เนื่องจากความสามารถในการยับยั้ง Toll-like receptor-4
แม้ว่าจะมีตัวเลือกการรักษาไม่ว่าจะแบบดั้งเดิมและแบบไม่ดั้งเดิม การรักษามักมีข้อเสียบางประการ เช่น ความปลอดภัย ประสิทธิภาพ และต้นทุนที่สูง ผลิตภัณฑ์สมุนไพรเป็นทางเลือกที่ใช้ในการรักษาโรคต่างๆ และค่อนข้างปลอดภัยเมื่อเทียบกับยาสังเคราะห์ (Jamshidi-Kia et al., 2018; Nasri, 2013) ตามรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) ประมาณ 80-85% ของประชากรโลกใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ รวมถึงใช้เป็นอาหารเสริมในชีวิตประจำวัน (WHO, 2003) ดังนั้นการหาพืชใหม่ๆ ที่มีความเป็นไปได้ต่อการรักษาจึงยังคงเป็นสิ่งสำคัญในการวิจัยทางด้านสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ

2.1.2 ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

การยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย ถือเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญในการพัฒนาแนวทางการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อในมนุษย์ สัตว์ และพืช การติดเชื้อแบคทีเรียสามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพในระดับที่รุนแรง ตั้งแต่การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินปัสสาวะ ไปจนถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะที่เป็นอันตรายต่อชีวิตได้ (Xu et al., 2018) การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสมและต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานส่งผลให้เกิดปัญหาความดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย (antibiotic resistance) ได้รับการยอมรับว่าเป็นหนึ่งในภัยคุกคามสำคัญด้านสาธารณสุขระดับโลกในปัจจุบัน การค้นคว้าและพัฒนาสารต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากแหล่งธรรมชาติหรือผ่านกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนายาต้านเชื้อที่มีประสิทธิภาพและสามารถเอาชนะปัญหาเชื้อดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิผล (Laxminarayan et al., 2016) จุลชีพก่อโรค เช่น *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Shigella sonnei* เป็นกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทั้งในด้านสุขภาพของมนุษย์และในอุตสาหกรรมอาหาร การติดเชื้อจากเชื้อเหล่านี้ก่อให้เกิดโรคที่มีตั้งแต่อาการอาหารเป็นพิษทั่วไปไปจนถึงการติดเชื้อในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ ปอด และแม้กระทั่งในกระแสเลือด *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นส่วนหนึ่งของจุลชีพประจำถิ่นบนผิวหนัง (normal flora) แต่ก็เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับอุปกรณ์ทางการแพทย์ (medical device-associated infections) เช่น การติดเชื้อที่สายสวนหลอดเลือดดำ และการติดเชื้อที่ข้อเทียม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ช่วยให้เชื้อ

สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวและหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันและยาปฏิชีวนะได้ ทำให้การรักษายากขึ้น (Otto, 2009; Rogozin et al., 2016) นอกจากนั้นจุลชีพชนิด *Cutibacterium acnes* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่ใช้ออกซิเจนที่อาศัยอยู่ตามรูขุมขนบนผิวหนังของมนุษย์เป็นหลัก และมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดสิว (acne vulgaris) โดยเชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ปราศจากออกซิเจนภายในรูขุมขนที่อุดตัน และผลิตเอนไซม์ที่กระตุ้นการอักเสบ การดื้อยาปฏิชีวนะของ *C. acnes* ก็นับเป็นปัญหาที่พบเพิ่มขึ้นในการรักษาสิว (Dreno et al., 2018; McDowell et al., 2013) ดังนั้นการป้องกันและควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อเหล่านี้จึงมีความสำคัญในระดับสาธารณสุขและการใช้ประโยชน์เชิงอุตสาหกรรมเช่นเครื่องสำอางเป็นอย่างยิ่ง จากงานวิจัยพืชสมุนไพรยังเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีโครงสร้างหลากหลายและซับซ้อน ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ในปี 2019 อวัช วิเศษสัยและคณะได้รายงานสารกลุ่ม anthracene และ anthraquinone ที่แยกได้จากรากของต้องพุดป่า (*Prismatomeris filamentosa*) พบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง Gram-positive และ Gram-negative ต่อเชื้อที่หลากหลายเช่น B. *subtilis, B. cereus, S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* และ *S. sonnei* (Wisetsai et al., 2019) ในปี 2021 ก็ได้รายงานสารในกลุ่ม acetophenone ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เช่นกัน โดยพบว่าสารบางชนิดให้การยับยั้งเชื้อเหล่านี้ได้ดีกว่ายาที่ใช้ในปัจจุบัน (Nathabumroong et al., 2021; Panyasawat et al., 2021; Wisetsai et al., 2021)

2.1.3 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกับการควบคุมกระบวนการสร้างเม็ดสี

เมลานินเป็นรงควัตถุธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในการปกป้องผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) อย่างไรก็ตาม การสร้างเมลานินที่มากเกินไปหรือไม่สม่ำเสมออาจนำไปสู่ภาวะเม็ดสีผิดปกติ เช่น ฝ้า กระ หรือจุดด่างดำ หรือภาวะผิวคล้ำผิดปกติ (hyperpigmentation) ส่งผลกระทบต่อความสวยงาม การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการเปลี่ยนไทโรซีนเป็น DOPA และ DOPA quinone ถือเป็นกลไกสำคัญในการลดการสร้างเมลานิน และกลายเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อผิวกระจ่างใสจากธรรมชาติ เอนไซม์ไทโรซิเนสยังมีบทบาทสำคัญในปรากฏการณ์ทางชีวเคมีที่เรียกว่า enzymatic browning หรือการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในผักและผลไม้เมื่อถูกทำลายเนื้อเยื่อ เช่น เมื่อปอกหรือหั่นผลไม้บางชนิด เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นแล้วก่อให้เกิดเม็ดสีควิโนนและเมลานิน ส่งผลต่อคุณภาพ ความสดใหม่ และมูลค่าทางการตลาดของผลิตผลทางการเกษตร (Chang, 2009) สารจากธรรมชาติมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีหรือเมลานิน (melanogenesis) ผ่านกลไกต่างๆ เช่น การยับยั้งการ

ทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส หนึ่งในสารที่ได้รับความสนใจอย่างมากคือ resveratrol มีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งไทโรซิเนสทั้งในระดับเอนไซม์และระดับยีน อีกทั้งยังสามารถลดปริมาณเมลานินในเซลล์เมลาโนไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นสารจากธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นสารลดเม็ดสีในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ดังนั้น การศึกษาค้นคว้าและหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากไม่เพียงแต่สารดังกล่าวจะมีศักยภาพในการยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานินอย่างมีประสิทธิภาพ หากแต่ยังมีแนวโน้มความปลอดภัยสูงเมื่อเทียบกับสารเคมีสังเคราะห์ อีกทั้งยังสอดคล้องกับแนวโน้มความต้องการของผู้บริโภคที่มุ่งเน้นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่เป็นมิตรต่อผิวและสิ่งแวดล้อม

2.1.4 เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส

เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (α-Amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน เช่น แป้งและไกลโคเจน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ขนาดใหญ่ ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก ๆ เช่น มอลโทส และกลูโคส เพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมและนำไปใช้เป็นพลังงานได้ การทำงานของเอนไซม์นี้เกิดขึ้นในหลายส่วนของระบบย่อยอาหาร โดยเฉพาะในช่องปากและลำไส้เล็ก การย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตอย่างรวดเร็วส่งผลให้น้ำตาลในเลือดพุ่งสูงขึ้นอย่างฉับพลัน ซึ่งหากเกิดขึ้นซ้ำ ๆ และต่อเนื่องอาจนำไปสู่ภาวะอินซูลินดื้อ (insulin resistance) และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเมตาบอลิกต่าง ๆ รวมถึงโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Scott et al., 2000) นอกจากบทบาทในร่างกายมนุษย์แล้ว เอนไซม์อะไมเลสยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ในกระบวนการผลิตขนมปัง เบียร์ และน้ำเชื่อมข้าวโพด โดยเอนไซม์จะช่วยในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลที่จำเป็นในกระบวนการเหล่านี้ การควบคุมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในทางการแพทย์ โดยเฉพาะในการจัดการระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน และในอุตสาหกรรมที่ต้องการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของคาร์โบไฮเดรตอย่างแม่นยำ (Chanda et al., 2023)

2.1.5 มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa)

โรคมะเร็ง เป็นกลุ่มโรคที่เกิดจากการเจริญเติบโต แบ่งตัว และแพร่กระจายของเซลล์ในร่างกายอย่างผิดปกติและไม่สามารถควบคุมได้ ส่งผลให้เกิดเนื้องอกซึ่งอาจลุกลามไปยังเนื้อเยื่อข้างเคียง และสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นผ่านทางกระแสเลือดหรือระบบน้ำเหลือง (metastasis) มะเร็งถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในระดับโลก และยังคงเป็นหนึ่งในสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของประชากร แม้จะมีความก้าวหน้าในด้านการวินิจฉัยและการรักษาอย่างต่อเนื่อง (World Health

Organization, 2024) การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในระดับห้องปฏิบัติการมักอาศัยสายเซลล์มะเร็งของมนุษย์เป็นแบบจำลอง เพื่อทดสอบผลของสารต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และการตายของเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ HCT116 (มะเร็งลำไส้ใหญ่) และเซลล์ HeLa (มะเร็งปากมดลูก) ซึ่งเซลล์ HCT116 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ มักถูกใช้เพื่อทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งการเจริญเติบโต กระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ซึ่งเป็นกลไกการตายของเซลล์ที่มีการควบคุมตามธรรมชาติและเป็นที่ต้องการในการกำจัดเซลล์มะเร็ง รวมถึงการยับยั้งการเคลื่อนที่และการรุกรานของเซลล์ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายของมะเร็ง และการเหนี่ยวนำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวในวัฏจักรเซลล์ (Ahmed et al., 2013; Pfeiffer et al., 2011) ในขณะที่เซลล์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1951 (Landry et al., 2013) ก็เป็นแบบจำลองมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) การยับยั้งการเจริญเติบโต การกระตุ้นกลไกการตายของเซลล์ในรูปแบบต่าง ๆ และการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง ความสามารถในการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วของเซลล์ HeLa ทำให้เซลล์นี้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการคัดกรองสารต้านมะเร็ง (Chen et al., 2017)

2.2 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์และสารสำคัญในทองกวาว

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทองกวาว

ทองกวาว มีชื่ออื่นๆ คือ กวาว ทองพรหมชาติ จอมทอง จาน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Butea monosperma* อยู่ในวงศ์ Fabaceae เป็นต้นไม้ผลัดใบขนาดกลางที่สูงได้ถึง 8-15 เมตร เปลือกมีสีเทาและมีรอยแตกเป็นร่อง ๆ ใบเป็นแบบขนนก ประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบที่ออกสลับกัน ดอกมีสีเหลืองถึงแดงแสดโดยจะออกเป็นช่อบริเวณก้านดอกและที่ปลายก้าน พบมากทางภาคเหนือ สวนภาคอื่นขึ้นกระจัดกระจาย เปลือกใช้ทาเชือกและกระดาษ รากมีรสเมาร้อน ใช้รักษาอาการท้องเฟ้อ ขับพยาธิ แก้ริดสีดวงทวาร ส่วนใบใช้พอกสิว ถอนพิษ แก้ปวด ส่วนดอกใช้ถอนพิษไข้ แก้กระหายน้ำ เป็นยาขับปัสสาวะ สมานแผลปากเปื่อย แก้พิษฝี นอกจากนั้นยังให้สีเหลืองใช้ในการย้อมผ้า (Chokchaisiri et al., 2009)

Kingdom: Plantae

Class: Magnoliophyta

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Genus: *Butea*



ภาพที่ 2-5 ลักษณะของดอกทองกวาว โดย สุธารินทร์ ปรีเปรม

สรรพคุณทางโภชนาการดอกทองกวาวมักถูกใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ และการรักษาบาดแผล นอกจากนี้ยังมีการใช้เป็นยาฉีดกำจัดพยาธิในสัตว์ ดอกทองกวาวมีสารสำคัญอย่าง quercetin และ astragalin ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีสมบัติต้านการอักเสบ ช่วยลดอาการอักเสบและรักษาการติดเชื้อในผิวหนัง บางครั้งมีการนำดอกทองกวาวมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูงอีกด้วย ฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบจากดอกทองกวาวมีการรายงานในการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังสรุปใน **ตารางที่ 2-1**

ตารางที่ 2-1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบจากดอกทองกวาว

Bioactivities	Extract	Doses	References
Antioxidant	n-Butanol	69.09 µg/mL	Jamkhande et al., 2013
Antibacterial	Chloroform	101 µg/mL	Dhole, 2021
	Ethanol	124 µg/mL	
Anti-tyrosinase	Ethanol	0.02 mg/mL	Narin et al., 2021
Anti-cancer	hydroalcoholic	683.80 µg/mL	Kamble et al., 2015
	Methanolic	100 mg/kg	Krolikiewicz-Renimel et al., 2013
	n-Butanol	10–1000 µg/mL	Kumar et al., 2015
Anti-inflammatory	Hydroalcoholic	2.5 mg/mL	Krolikiewicz-Renimel et al., 2013
	Methanol	600 mg/kg	Shahavi et al., 2008

2.3 สารพฤกษเคมีที่พบในแต่ละส่วนหลักของทองกวาว

การศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีในแต่ละส่วนหลักของทองกวาว (*Butea monosperma*) พบว่ามีความหลากหลายทางโครงสร้างของสารออกฤทธิ์และมีศักยภาพทางชีวภาพที่แตกต่างกันไป จากรายงานพบสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ไอโซฟลาโวน ชาลโคน ตามด้วยสารกลุ่มออโรน สารที่แยกได้ในแต่ละส่วนของทองกวาวมีโครงสร้างทางเคมีตามที่แสดงใน**ภาพที่ 2-2–2-8** และข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพ (**ตารางที่ 2**) สรุปได้ดังการรายงานต่อไปนี้

2.3.1 ดอก

มีการวิจัยอย่างกว้างขวางของสารพฤกษเคมีในดอก พบว่าเป็นแหล่งรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ เช่น butin (**1**) butein (**2**) butrin (**3**) และ iso-butrin (**4**) (Puri et al., 1955) สารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่โดดเด่น โดย iso-butrin สามารถยับยั้งการอักเสบได้สูงถึง 63% (Rasheed et al., 2010) และ sulphurein (**8**) ก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน (Westenburg et al., 2000) นอกเหนือจากฤทธิ์ดังกล่าว สารจากดอกทองกาวยังแสดงศักยภาพในการต้านมะเร็ง โดยเฉพาะ butein (**2**) ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลากหลายชนิด (Lin et al., 2021) และ isocoreopsin (**7**) ที่มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และตับ (Subramaniyan et al., 2016) ในมิติอื่น ๆ สาร butin (**1**) มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพเมตาบอลิซึมและระบบประสาท โดยมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ป้องกันความจำเสื่อมในหนูเบาหวาน ปกป้องเซลล์หัวใจ และยับยั้งการสร้างเม็ดสี (Omer et al., 2022; Bukhari et al., 2024; Duan et al., 2017; Lv et al., 2015) ยิ่งไปกว่านั้น ดอกทองกาวยังเป็นแหล่งของสารต้านจุลชีพที่สำคัญ โดย butein (**2**) มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อวัณโรค (Chokchaisiri et al., 2009) และยังมีการค้นพบฟลาโวนไกลโคไซด์ (**9**) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีอีกด้วย (Yadava et al., 2007)

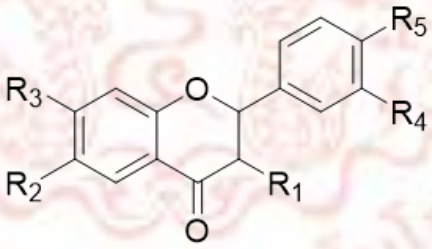
2.3.2 ใบ

ในส่วนของใบพบการรายงานสารชนิดฟลาโวนอยด์ ตัวอย่างเช่น สาร kaempferol (**19**) quercetin (**20**) luteolin (**21**) apigenin (**22**) apigenin-*C*-hexoside-*C*-pentoside (**23**) apigenin-*C*-hexoside-*C*-pentoside isomer (**24**) apigenin-*C*-hexoside-*C*-hexoside (**25**) genistin (**26**) vanillic acid (**27**) apigenin-7-*O*-diglucuronide (**28**) apigenin-6-8-di-*C*-pentoside (**29**) (Kumari et al., 2017; Farooq et al., 2020) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

(Tian et al., 2020) และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Loke et al., 2008; Kim et al., 1999) อีกทั้งยังแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยสาร **19** มีฤทธิ์ต่อมะเร็งเต้านมและปากมดลูก (Zhu et al., 2019; Afroze et al., 2022) ส่วนสาร **22** มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Mohammed et al., 2022) นอกจากนี้สาร **19** ยังมีฤทธิ์ในการปกป้องตับ (Hepatoprotective effect) ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่ช่วยป้องกันหรือลดความเสียหายต่อเซลล์ตับที่เกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น สารพิษ ยาบางชนิด หรือโรคตับ และยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้หลายชนิด (Wang et al., 2015; Calzada, 2005)

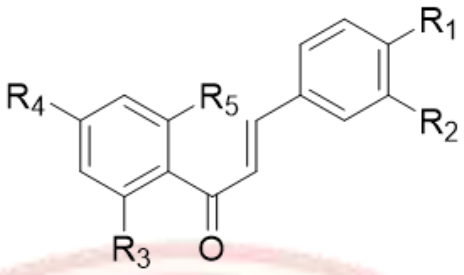
2.3.3 เปลือก

เปลือกมีองค์ประกอบของสารกลุ่มไอโซฟลาโวน เช่นสาร medicarpin (**30**) buteaspermin A (**31**) buteaspermin B (**32**) buteaspermanol (**33**) prunetin (**34**) และ cajanin (**35**) (Sharma et al., 2011) สารกลุ่มนี้มีศักยภาพสูงในการต้านการอักเสบ ป้องกันเซลล์ประสาท และต้านมะเร็ง ดังที่พบในสาร medicarpin และสาร prunetin (Chern et al., 2021; Wang et al., 2019; Karayildirim et al., 2021) อีกทั้งยังมีฤทธิ์อื่นๆ เช่นสาร cajanin ที่ช่วยยับยั้งการสร้างเม็ดสี และสาร cladrin (**36**) ที่ช่วยเสริมสร้างความหนาแน่นของกระดูก (Netcharoensirikul et al., 2021; Khan et al., 2013)



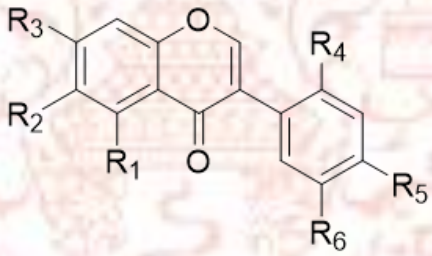
B1 $R_1 = R_2 = H, R_3 = R_4 = R_5 = OH$ (Butin)
B2 $R_1 = R_2 = H, R_3 = R_4 = Glc, R_5 = OH$ (Butrin)
B7 $R_1 = R_2 = H, R_3 = Glc, R_4 = R_5 = OH$ (Isocoreopsin)
B14 $R_1 = R_2 = H, R_3 = R_4 = Glc, R_5 = OH$ (Isomonospermoside)
B15 $R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = R_5 =$ OH (Liquiritigenin)
B33 $R_1 = R_2 = OH, R_3 = COCH_3, R_4 = R_5 = H$ (Buteaspermanol)

ภาพที่ 2-6 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟลาวาโนน (flavanone)



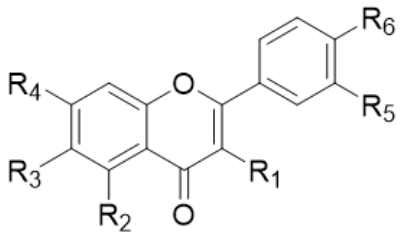
B3 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = OH, R_5 = H$ (Butein)
B4 $R_1 = R_3 = R_5 = OH, R_2 = R_4 = Glc$ (Isobutrin)
B6 $R_1 = R_2 = R_3 = OH, R_4 = Glc, R_5 = H$ (Coreopsin)
B10 $R_1 = R_3 = R_4 = OH, R_2 = Glc$ (Dihydromonopsermoside)
B11 $R_1 = R_3 = R_4 = OH, R_2 = Glc, R_5 = H$ (Monospermoside)
B12 $R_1 = R_3 = R_4 = OH, R_2 = R_5 = H$ (Isoliquiritigenin)

ภาพที่ 2-7 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบชาลโคน (Chalcone)



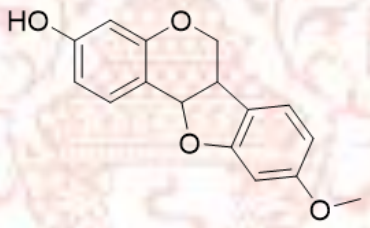
B16 $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = H, R_3 = OH, R_6 = OCH_3$ (Formonetin)
B17 $R_1 = R_4 = R_6 = H, R_2 = R_5 = OCH_3, R_3 = OH$ (Afrormosin)
B18 $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = H, R_3 = Glc, R_5 = OCH_3$ (Formononetin-7-*O*-β-D-glucopyranoside)
B26 $R_1 = R_5 = OH, R_2 = R_4 = R_6 = H, R_3 = Glc$ (Genistin)
B34 $R_1 = R_5 = OH, R_2 = R_4 = R_6 = H, R_3 = OCH_3$ (Prunetin)
B35 $R_1 = R_4 = R_5 = OH, R_2 = R_6 = H, R_3 = OCH_3$ (Cajanin)
B36 $R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = OH, R_5 = R_6 = OCH_3$ (Cladrin)

ภาพที่ 2-8 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบไอโซฟลาโวน (Isoflavone)

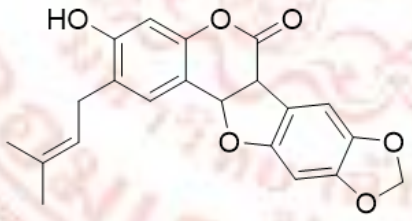


B9 $R_1 = R_3 = R_6 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_4 = 3Glc$ (5,7-dihydroxy-3,6,4′-trimethoxyflavone glycoside)
B13 $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_4 = R_5 = R_6 = OH$ (7,3′,4′-Trihydroxyflavone)
B19 $R_1 = R_2 = R_4 = OH$, $R_6 = R_3 = R_5 = H$ (Kaempferol)
B20 $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = OH$, $R_3 = H$ (Quercetin)
B21 $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = OH$ (Luteolin)
B22 $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = R_4 = R_6 = OH$ (Apigenin)
B23 $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = Glc$, $R_4 = Pent$, $R_6 = OH$ (Apigenin-*C*-hexoside-*C*-pentoside)
B24 $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = Pentose$, $R_4 = Glc$, $R_6 = OH$ (Apigenin-*C*-hexoside-*C*-pentoside isomer)
B25 $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = OH$, $R_4 = R_6 = Glc$ (Apigenin-C-hexoside-*C*-hexoside)
B28 $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = R_4 = Glucuronide$, $R_6 = OH$ (Apigenin-7-*O*-diglucuronide)
B29 $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = R_6 = Pent$, $R_4 = OH$ (Apigenin-6-8-di-*C*-pentoside)

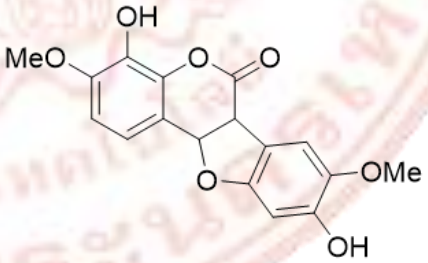
ภาพที่ 2-9 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟลาโวนอล (Flavonol)



B30 Medicarpin

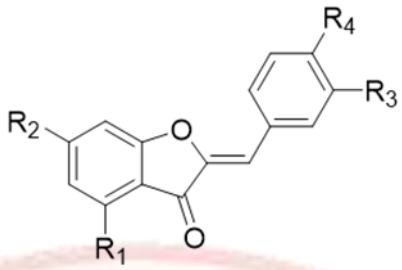


B31 Buteaspermin A



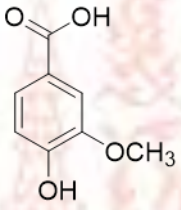
B32 Buteaspermin B

ภาพที่ 2-10 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบเทอโรคาร์แพน (Pterocarpan)



B5 R1 = R3 = Glc, R_2 = H, R_4 = OH (Palasitrin)
B8 R_1 = H, R_2 = Glc, R_3 = R_4 = OH (Sulfurein)

ภาพที่ 2-11 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบออโรน (Aurone)



B27 Vanillic acis

ภาพที่ 2-12 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบอื่นๆ เช่น Vanillic acid

จากข้อมูลสนับสนุนข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจในการศึกษา สารบริสุทธิ์ที่แยกได้และฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกทองกวาว (*Butea monosperma*) ซึ่งในปัจจุบันยังคงมีรายงานการศึกษาในประเทศไทยไม่มากนัก โดยเฉพาะในด้านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ แม้ว่าจะมีการศึกษาส่วนสกัดหยาบของดอกทองกวาวในตัวทำละลายประเภทต่าง ๆ ดังนั้น การแยกและศึกษาสารบริสุทธิ์จากดอกทองกวาวจึงนับเป็นแนวทางที่มีความสำคัญที่จะทำให้เข้าใจกลไกของฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบสารที่มีศักยภาพทางชีวภาพและสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือเวชสำอางในอนาคตได้

ตารางที่ 2-2 สารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในต้นทองกวาว

สาร	ส่วน	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ปริมาณที่ใช้	อ้างอิง
Butin (**B1**)	ดอก	Anti-melanogenesis	1 μM	Lv et al., 2015
		Anti-apoptosis	12.5-50 μM	Duan et al., 2017
		Neuroprotection	25 & 50 mg/kg	Omer et al., 2022
		Anti-diabetic	25 & 50 mg/kg	Bukhari et al., 2024
		Anti-tuberculosis	MIC = 25 μg/mL	Chokchaisiri et al., 2009
Butein (**B2**)	ดอก	Anti-inflammation	0-10 μM	Rasheed et al., 2010
		Anti-gastric cancer	10–30 μM	Padmavathi et al., 2016
		Anti-cervical cancer	20 μM	
		Anti-breast cancer	10 μg/mL	
		Anti-colorectal cancer	40 μM	
		Anti-tuberculosis	MIC = 12.5 μg/mL	Chokchaisiri et al., 2009
Butrin (**B3**)	ดอก	Antioxidant DPPH	35% at 10 μg/mL	Rasheed et al., 2010
		Anti-inflammation	52% at 1 μg/mL	
		Anti-tuberculosis	MIC = 50 μg/mL	Chokchaisiri et al., 2009
Iso-butrin (**B4**)	ดอก	Antioxidant DPPH	40% at 10 μg/mL	Rasheed et al., 2010
		Anti-inflammation	63% at 1 μg/mL	
Palastrin (**B5**)	ดอก	-	-	Puri et al., 1955
Coreopsin (**B6**)	ดอก	Anti-α-amylase	6.13 μM	Cui et al., 2025
Isocoreopsin (**B7**)	ดอก	Anti-inflammation	33% at 1 μg/mL	Rasheed et al., 2010
		Anti-colorectal cancer	50 μg/mL	Subramaniyan et al., 2016
		Anti-hepatoma	100 μg/mL	Subramaniyan et al., 2016

ตารางที่ 2-2 สารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในต้นทองกวาว (ต่อ)

สาร	ส่วน	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	ปริมาณที่ใช้	อ้างอิง
Sulfurein (**B8**)	ดอก	Antioxidant DPPH	IC_{50} = 18.7 µg/mL	Westenburg et al., 2000
Flavonol glycoside (**B9**)	ดอก	Anti-fungal	-	Yadava et al., 2007
Dihydromonospermoside (**B10**)	ดอก	Anti-tuberculosis	MIC = 50 µg/mL	Chokchaisiri et al., 2009
Monospermoside (**B11**)	ดอก	Anti-tuberculosis	MIC = 25 µg/mL	Chokchaisiri et al., 2009
Isoliquiritigenin (**B12**)			MIC = 25 µg/mL	
7,3′,4′ trihydroxy flavone (**B13**)			MIC = 50 µg/mL	
Isomonospermoside (**B14**)			MIC = 25 µg/mL	
Liquiritigenin (**B15**)			MIC = 25 µg/mL	
Formononetin (**B16**)			MIC = 50 µg/mL	
Afrormosin (**B17**)			MIC = 25 µg/mL	
Formononetin-7-*O*-*β*-D-glucopyranoside (**B18**)			MIC = 100 µg/mL	
Kaempferol (**B19**)	ใบ	Hepatoprotective	10-20 mg/kg	Wang et al., 2015
		Anti-hepatitis B	10 µg/mL	Parvez et al., 2022
		Antioxidant DPPH	IC_{50} = 5.31 µg/mL	Tian et al., 2020
		Antioxidant ABTS	IC_{50} = 0.85 µg/mL	
		Anti-fungal	IC_{50} = 25 µg/mL	Yordanov et al., 2008
		Anti-breast cancer	43 µM	Zhu et al., 2019
Quercetin (**B20**)	ใบ	Antioxidant DPPH	IC_{50} = 1.84 µg/mL	Tian et al., 2020
		Antioxidant ABTS	IC_{50} = 0.50 µg/mL	
		Anti-colorectal cancer	IC_{50} = 36 µg/mL	Mohammed et al., 2022
		Anti-inflammatory	2 µM	Loke et al., 2008

ตารางที่ 2-2 สารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในต้นทองกวาว (ต่อ)

Luteolin (**B21**)	ใบ	Antioxidant DPPH	IC_{50} = 2.09 µg/mL	Tian et al., 2020
		Antioxidant ABTS	IC_{50} = 0.59 µg/mL	
		Anti-inflammatory	27 µM	Kim et al., 1999
Apigenin (**B22**)	ใบ	Antioxidant ABTS	IC_{50} = 0.82 µg/mL	Farooq et al., 2020
		Anti-inflammatory	IC_{50} = 23 µM	
Apigenin-*C*-hexoside-*C*-pentoside (**B23**)		-	-	
Apigenin-*C*-hexoside-*C*-pentoside isomer (**B24**)		-	-	
Apigenin-*C*-hexoside-*C*-hexoside (**B25**)		-	-	
Genistin (**B26**)		Anti-brain cancer	IC_{50} = 26.9 µM	
Vanillic acid (**B27**)	เปลือก	Inhibit LPS	50 mg/kg	
Apigenin-7-*O*-diglucuronide (**B28**)		-	-	
Apigenin-6-8-di-*C*-pentoside (**B29**)		-	-	
Medicarpin (**B30**)	เปลือก	Anti-inflammatory	IC_{50} = 5 µM	Chern et al., 2021
		Neuroprotective	IC_{50} = 13 µM	
		Anti-breast cancer	IC_{50} = 13.14 µg/mL	Wang et al., 2019
		Antigonococcal	MIC = 0.25 mg/mL	Williams et al., 2021
Buteaspermin A (**B31**)	เปลือก	-	-	Maurya et al., 2009
Buteaspermin B (**B32**)		-	-	
Buteaspermanol (**B33**)		-	-	

ตารางที่ 2-2 สารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในต้นทองกวาว (ต่อ)

Prunetin (**B34**)	เปลือก	Anti-inflammatory	IC_{50} = 5.18 µg/mL	Karayildirim et al., 2021
Cajanin (**B35**)	เปลือก	Anti-bladder cancer Anti-inflammatory	IC_{50} = 21.11 µg/mL IC_{50} = 19.38 µM	Netcharoensirikul et al., 2021
Cladrin (**B36**)	เปลือก	Anti-melanogenesis Osteogenic	IC_{50} = 77.47 µM 1 & 10 mg/kg/day	Khan et al., 2013



บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ดอกของต้นทองกวาว (*B. monosperma*) เก็บตัวอย่างจากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2567 หลังจากได้รับการตรวจสอบยืนยันชนิดพืชแล้ว ทำให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง พืชแห้งมีรหัสตัวอย่าง AVS-NPR004 เก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ตารางที่ 3-1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

รายชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ	**บริษัทที่ผลิต**
1) คอลัมน์แก้ว	-
2) แท่งแก้วกวนสาร	-
3) ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 mL	Pyrex®
4) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL	Pyrex®
5) บีกเกอร์ขนาด 250 mL	KIMA
6) บีกเกอร์ขนาด 400 mL	Pyrex®
7) บีกเกอร์ขนาด 600 mL	Pyrex®
8) บีกเกอร์ขนาด 1000 mL	Pyrex®
9) ถังแช่สารสแตนเลส	หัวม้าลาย
10) ขวดแก้วเก็บสาร	-
11) กระบอกตวงขนาด 10 mL	Glassco
12) กระบอกตวงขนาด 100 mL	Glassco
13) กระบอกตวงขนาด 500 mL	Glassco
14) ออโต้ปิเปตขนาด 0.5-10 mL	Labnet
15) ออโต้ปิเปตขนาด 2-20 mL	Labnet

ตารางที่ 3-**1** เครื่องมือและอุปกรณ์ (ต่อ)

รายชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ	**บริษัทที่ผลิต**
16) ออโต้ปิเปตขนาด 20-200 mL	Labnet
17) ออโต้ปิเปตขนาด 100-1000 mL	Labnet
18) ออโต้ปิเปตแบบหลายช่อง ขนาด 20-200 mL	Labnet
19) Thin-layer chromatography (TLC)	Merck, Darmstadt, Germany
20) Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) 400 MHz	Bruker, Germany
21) เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader)	Lab Leader
22) จานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติก	NEST®qw
23) คิวเวทพลาสติก	-
24) หลอดทดลอง	-
25) ตะเกียงแอลกอฮอล์	-
26) ลูปเขี่ยเชื้อ (loop)	-
27) เครื่องชั่งความละเอียดสูง	METTLER TOLEDO
28) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)	Scientific Industries
29) เครื่องวัด pH (pH Meter)	METTLER TOLEDO
30) เครื่องดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	DLAB
31) เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)	IKA®
32) เครื่องดูดสารเคมี (Hood)	Easy Lab®
33) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	TOMY KOGO รุ่น ES-315
34) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)	BIOBASE
35) ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)	FINEPCR
36) เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)	BINDER
37) เครื่องกำเนิดแสงอัตราไวโอเลต (UVC light)	-
38) ตู้บ่มเชื้อ	Mammert
39) 96-well plate	Thermo Scientific
40) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)	Blue Ray BIOTECH

ตารางที่ 3-2 สารเคมี

รายชื่อสารเคมี	**บริษัทที่ผลิต**
1) Hexane	P.K.C. INSTRUMENT LTD., PART.
2) Ethyl acetate	P.K.C. INSTRUMENT LTD., PART.
3) Dichloromethane	P.K.C. INSTRUMENT LTD., PART.
4) Methanol	P.K.C. INSTRUMENT LTD., PART.
5) Acetone	P.K.C. INSTRUMENT LTD., PART.
6) Ethanol	P.K.C. INSTRUMENT LTD., PART.
7) p-anisaldehyde	Sigma-Aldrich
8) Silica gel 60 (230-400 mesh)	Merck, Darmstadt, Germany
9) 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) extrapure, 95%	Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd.
10) extrapure AR (2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium Salt), 98.5% (ABTS)	Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd
11) Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 99%	QRëC™
12) Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)	Sigma-Aldrich
13) Glacial acetic (CH_3COOH)	QRëC™
14) Sodium acetate (CH_3COONa)	QRëC™
15) 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	Sigma-Aldrich
16) Ferric chloride anhydrous 99% AR. grade	Loba
17) 37% HCl	QRëC™
18) Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	univAR™
19) Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	QRëC™
20) Tryptone Soya Broth (TSB Broth)	HIMEDIA®
21) Agar powder	HIMEDIA®
22) ยาปฏิชีวนะ Ampicillin	aMReSCO®
23) Resazurin	-

3.3 เชื้อแบคทีเรียในการทดลอง

1) *Staphylococcus aureus* ATCC 10832

2) *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

3) *Cutibacterium acnes*

4) *Staphylococcus epidermidis*

3.4 การสกัดส่วนสกัดหยาบ

นำดอกทองกวาวแห้ง ปริมาณ 5 kg มาแช่ในเมทานอล ปริมาตร 20 L เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองและนำสารละลายทำให้เข้มข้นภายใต้ความดันที่ลดลงที่ 40 °C โดยใช้เครื่องระเหยสูญยากาศ (rotary evaporator) จากนั้นนำสารสกัดหยาบละลายในน้ำและสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำไปสูงโดยใช้ n-hexane และ ethyl acetate (EtOAc) โดยจะสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดในปริมาตร 1 L จำนวน 3 ครั้ง โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้มาระเหยแห้งเพื่อกำจัดตัวทำละลาย บันทึกน้ำหนักและเก็บที่อุณภูมิ

3.5 การแยกสารและทำให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ EtOAc มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel chromatography (CC) ด้วยระบบ EtOAc ใน n-hexane เริ่มจากอัตราส่วน 5:95 ไปจนถึง 100:0 ตามด้วยการเพิ่มความเป็นขั้วของระบบด้วย MeOH ใน EtOAc ในอัตราส่วน 5:95 ไปจนถึง 50:50 จะได้ 6 fractions (BME1-BME6) นำ BME2 มาแยกด้วย CC โดยใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย n-hexane:EtOAc (3:7) ได้ 4 fractions ย่อย ได้แก่ BME2.1–BME2.4 สาร 4 (ของแข็งสีขาว น้ำหนัก 10.2 mg) แยกจาก fraction ย่อย BME2.4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ CC โดยใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย n-hexane:EtOAc (4:6) เป็นตัวชะ ส่วนสาร 1 (ของแข็งสีแดงส้ม น้ำหนัก 9.1 mg) ได้จาก fraction ย่อย BME2.3 โดยแยกผ่าน Sephadex LH-20 ใช้ MeOH:CH2Cl2 (1:9) เป็นตัวชะล้างแบบ isocratic สำหรับ fraction BME4 ทำให้บริสุทธิ์ด้วย CC โดยใช้ acetone:EtOAc:n-hexane ในอัตราส่วน 1:3:7 เป็นตัวชะล้าง ได้สาร 5 (ของแข็งสีส้ม น้ำหนัก 12.4 mg) และสาร 3 (ของแข็งสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 15.2 mg) ขณะที่ fraction BME6 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ CC และชะด้วย n-hexane:EtOAc (1:1) ได้สาร 2 (ของแข็งสีเหลืองน้ำตาล น้ำหนัก 6.2 mg) สาร 6 (ของแข็งสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 17.1 mg) และสาร 7 (ของแข็งสีเหลืองอมน้ำตาลน้ำหนัก 12.2 mg)

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH (ดูเพิ่มเติมได้จากภาคผนวก ข) เติมสารละลาย 1.5 mM (1–7) ลงในหลุม 96 well plate โดยทำซ้ำจำนวน 3 หลุม (triplicate) ปริมาตรหลุมละ 20 µL ต่อหลุมจากนั้นเติมสารละลาย 0.1 mM DPPH ลงในแต่ละหลุม ปริมาตรหลุมละ 180 µL และนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากครบเวลาบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 517 nm โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท จากนั้นคำนวณโดยสมการด้านล่าง (Sonklin et al., 2021)

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \left(\frac{OD517_{negative} - OD517_{positive}}{OD517_{negative}}\right) \times 100$$

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย 7 mM $ABTS^{\bullet+}$ ผสมกับ 2 mM $K_2S_2O_8$ บ่มในที่มืด 15 ชั่วโมง (ดูเพิ่มเติมได้จากภาคผนวก ข) เติมสารละลาย 1.5 mM (1–7) ลงในหลุม 96 well plate โดยสารแต่ละชนิดทำซ้ำจำนวน 3 หลุม (triplicate) ปริมาตรหลุมละ 10 µL จากนั้นเติมสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 190 µL นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 นาที หลังครบเวลา บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 734 nm โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท ค่าการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยใช้สูตรด้านล่าง (Sonklin et al., 2021)

$$\text{ABTS scavenging activity (\%)} = \left(\frac{OD734_{negative} - OD734_{positive}}{OD734_{negative}}\right) \times 100$$

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

เตรียม FRAP reagent (ดูได้จากภาคผนวก ข) เติมสารละลาย 5 mM (1–7) ลงในหลุม 96 well plate โดยสารแต่ละชนิดทำซ้ำจำนวน 3 หลุม (triplicate) ปริมาตรหลุมละ 5 µL เติม FRAP

reagent หลุมละ 195 µL นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยมี 5 mM quercetin เป็นตัวควบคุมเชิงบวก หลังจากครบเวลา ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 593 nm โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท ค่าการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างรายงานเป็น µM ของ Fe^{2+} ต่อปริมาตรจากสมการของกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ $FeSO_4$ (Sonklin et al., 2021)

3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส

เตรียม 50 mM สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH 6.8) จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate หลุมละ 60 µL ตามด้วยการเติมสารละลาย 300 µM (1–7) ลงในหลุม หลุมละ 10 µL (โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 µM) แล้วเติม 500 U/mL (โดยมีจำนวนยูนิตสุดท้ายเท่ากับ 50 U/µL) เอนไซม์ไทโรซิเนสลงไปหลุมละ 10 µL จากนั้นบ่มส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติม 6 mM L-tyrosine ลงไปอีก 20 µL และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที โดยองค์ประกอบแสดงดังใน**ตารางที่ 3-4** และคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ตามสูตรด้านล่าง

ตารางที่ 3-3 องค์ประกอบและสัดส่วนของขั้นตอนการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารผสม	ปริมาตรที่ใช้สำหรับการทดสอบไทโรซิเนส (µL)		
	negative	positive	sample
50 mM บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต pH 6.8	80	70	60
สาร 1-7 (300 µM)	-		10
500 U/mL เอนไซม์	-	10	10
6 mM L-Tyrosine	20	20	20
ปริมาตรรวม	100	100	100

$$\text{Enzyme activity (\%)} = \left(\frac{OD490_{sample} - OD490_{negative}}{OD490_{positive} - OD490_{negative}}\right) \times 100$$

3.8 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของสาร Liquiritigenin (3)

เตรียม 50 mM สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH 6.8) จากนั้นเตรียมสารละลาย 0.3 ถึง 1.2 mM liquiritigenin (**3**) รวมทั้ง 500 U/mL เอนไซม์ไทโรซิเนส และ 6 mM L-tyrosine โดยทั้งหมดละลายใน 50 mM บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH 6.8) ขั้นตอนการทดสอบเริ่มจากการเติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 80 µL ลงในทุกหลุม ยกเว้น 3 หลุมแรก จากนั้นเติม L-tyrosine ปริมาตร 160 µL ลงใน 3 หลุมแรก และทำการเจือจางแบบ two-fold ถัดไปเติมสารละลาย 0.3 ถึง 1.2 mM liquiritigenin (**3**) ลงในหลุมต่างๆ โดยหลุมที่ไม่เติมสารละลาย **3** จะเป็นตัว positive control จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm แบบไคเนติก ที่อุณหภูมิ 37°C โดยใช้เครื่อง Victor Nivo Multimode Plate Reader โดยบันทึกค่าทุกๆ 5 นาที ใน 60 นาที (interval) (Joompang et al., 2020)

3.9 การจำลองการจับกันของโมเลกุล (Molecular Docking Simulation)

เตรียมโปรตีน (PDB: 2Y9X) จากนั้นปรับโครงสร้างของเปปไทด์ในโปรแกรม Discovery Studio 2017 นำโครงสร้างเอนไซม์ที่ลบโมเลกุลน้ำและสาร tropolone ออก พร้อมเติมอะตอมไฮโดรเจน กำหนดให้รัศมีการ docking มีค่าเท่ากับ 10 Å จากนั้นใช้ฟังก์ชัน Goldscore วิเคราะห์โดยใช้ฟังก์ชันในการค้นหาแบบ flexible (100 GA runs) และเลือกโครงสร้างที่มีคะแนน GOLD fitness สูงสุดเพื่อแทนการจับกันที่เป็นไปได้มากที่สุด จากนั้นวิเคราะห์รูปแบบการจับกันโดยใช้โปรแกรม Discovery Studio 2017 R2 Client. (Joompang et al., 2020)

3.10 การทดสอบฤทธิ์ลดการเกิดเม็ดสีเมลานิน

3.10.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เคราติโนไซต์สายพันธุ์ HaCaT จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี FBS 10% และยาปฏิชีวนะ 1% เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง นอกจากนี้เพาะเลี้ยงเซลล์เมลาโนไซต์สายพันธุ์ MNT-1 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ผสมกับ DMEM 10% ที่มี FBS 20% และยาปฏิชีวนะ 1% เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมงเช่นกัน สำหรับเซลล์แมคโครฟาจสายพันธุ์ RAW 264.7 ทำการเพาะเลี้ยงในแผ่นเพลตชนิด 96 หลุม โดยใช้จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่เสริมด้วย FBS 10% และยาปฏิชีวนะ (เช่น penicillin-streptomycin) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.10.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังด้วยวิธี MTT

เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้น 4.68 ถึง 150 µM โดยมี 10%DMSO เป็น positive control บ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นมาทดสอบความมีชีวิต พร้อมทั้งกำหนดค่า IC_{50} ด้วย ด้วยสารละลาย 5 mg/mL MTT โดย ปริมาตร 10 µL บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งก่อนละลายตะกอนด้วย DMSO 50 µL ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ตามด้วยวัดการดูดกลืนความยาวคลื่นมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 630 nm และคำนวณการรอดชีวิตตามสูตรด้านล่าง

$$\text{Cell viability} = \left(\frac{OD570_{positive} - OD570_{negative}}{OD630_{positive} - OD630_{negative}}\right) \times 100$$

3.10.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดสีด้วยวิธี MTT

เลี้ยงเซลล์เมลาโนไซท์ชนิด MNT-1 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่มี 10%DMEM 20%FBS และยาปฏิชีวนะ 1% เลี้ยงเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้นในช่วง 150-300 µM เป็น positive control และมีกลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารเป็น negative control บ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 5 mg/mL MTT ปริมาตร 10 µL ลงในแต่ละหลุม และบ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและละลายตะกอนผลึก formazan ด้วย DMSO ปริมาตร 50 µL ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm และวัดการดูดกลืนความยาวคลื่นมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 630 nm ก่อนนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตโดยใช้สูตรด้านล่าง

$$\text{Cell viability} = \left(\frac{OD570_{positive} - OD570_{negative}}{OD630_{positive} - OD630_{negative}}\right) \times 100$$

3.10.4 การทดสอบฤทธิ์การลดการสร้างเม็ดสีใน MNT-1 ของ Liquiritigenin (3)

เซลล์ MNT-1 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุมใน 12 well plate หลังจากเซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวได้ดีแล้ว จะมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ผสมสารละลาย 150 ถึง 300 µM liquiritigenin โดยมี

α-Arbutin เป็น positive control พร้อมกับเติม 1μM α-MSH เพื่อกระตุ้นการสร้างเมลานิน จากนั้นบ่มเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Theeraraksakul et al., 2023)

3.10.5 การวัดปริมาณเมลานินในเซลล์ MNT-1

จากวิธีข้างต้น เซลล์ในหลุมเพลตจะถูกดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วล้างด้วย PBS ปริมาตร 200 μL 1 ครั้ง จากนั้นเติม trypsin ปริมาตร 200 μL และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสออก เติมสารละลาย 1 N NaOH/10% DMSO ปริมาตร 200 μL ลงในตะกอนเซลล์ และบ่มที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm (Theeraraksakul et al., 2023)

3.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เม็ดเลือดขาว

เซลล์ RAW 264.7 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงใน 96 well plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี 10%FBS และยาปฏิชีวนะ (เช่น penicillin-streptomycin) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารละลาย 150 μM (**1–7)** และบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ที่ความเข้มข้น 1 μg/mL โดยใช้ไดโคลฟีแนค (diclofenac) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ภายหลังการกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกเก็บรวบรวมเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณการปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO) โดยใช้ Griess reagent ส่วนเซลล์ในแต่ละหลุมจะถูกนำมาประเมินอัตราการรอดชีวิตโดยใช้วิธี MTT assay โดยเริ่มจากการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารละลาย 0.5 mg/mL MTT ปริมาตร 10 μL ต่อหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ออก และเติม DMSO ปริมาตร 50 μL ต่อหลุม เพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น เขย่าเพลตเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Theeraraksakul et al., 2023)

3.12 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารที่ 1-7

3.12.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เริ่มต้นจากการนำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคจาก glycerol stock ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 5 mL และบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA เพื่อแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นเลือกโคโลนี

เดี่ยวมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 5 mL และบ่มในสภาวะเดียวกันอีกครั้ง เพื่อใช้เป็นเชื้อก่อนเลี้ยง (starter culture) ต่อมานำเชื้อก่อนเลี้ยงมาขยายในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 5 mL โดยให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้ออยู่ที่ 1% (v/v) แล้วบ่มในเครื่องเขย่าที่ 37°C ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ตรวจวัดค่าความขุ่นที่ OD_{600} ทุก ๆ 30 นาที เพื่อเฝ้าติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยกำหนดให้ช่วง mid-log phase เป็นช่วงที่มีค่าความขุ่น OD_{600} เท่ากับ 0.5

3.12.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion

เตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยมีค่า OD_{600} ความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 ที่จะใช้ในการทดสอบด้วยการ swab ให้ทั่วเพลทอาหาร จากนั้นวางแผ่นดิสปลอดเชื้อ จำนวน 8 แผ่นต่อจาน เติม 1 mg/mL ยาปฏิชีวนะ ampicillin ปริมาตร 5 µL และสารละลาย 50 µM (**1**–**7**) ลงบนแผ่นดิส จากนั้นนำเพลทไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.12.3 การกำหนดความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration ; MIC)

เตรียมสารละลาย 50 µM **1-7** และยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 mg/mL ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ใน 96 well plate จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงแบบลำดับสอง (two-fold serial dilution) จากนั้นเติมแบคทีเรียในช่วง mid-log phase ปริมาตร 5 µL ลงในหลุมที่มีสาร **1**-**7** negative control ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 µL และการทดลองชุดควบคุมเชิงบวก ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 100 µL และแบคทีเรียก่อโรค ปริมาตร 5 µL ซึ่งชุดการทดลองควบคุมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้นที่ 100 µg/mL (Barzkar et al., 2024)

3.12.4 การทดสอบความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MBC)

แบคทีเรียจากหลุมที่ไม่แสดงการเปลี่ยนสีของสาร Resazurin ตามที่ระบุในหัวข้อ 3.12.3 จะถูกนำมาทดสอบการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งชนิด TSA โดยใช้วิธี spot test จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงประเมินค่า MBC โดยพิจารณาจากการมีหรือไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ซึ่งค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญเติบโตจะถือเป็นค่า MBC ของสาร **1**-**7**

3.12.5 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของแบคทีเรียก่อโรค

หลังจากเตรียมตัวอย่างร่วมกับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคตามขั้นตอนในข้อ 3.12.1 แล้ว ให้ดูดเซลล์แขวนลอย (planktonic cells) ออกอย่างระมัดระวัง และล้างด้วยสารละลาย 1X PBS ปริมาตร 200 µL จากนั้นผึ่งให้แห้งก่อนทำการตรึงไบโอฟิล์มด้วยเมทานอล ปริมาตร 200 µL โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จนตัวอย่างแห้งสนิท หลังจากนั้นจึงย้อมสีไบโอฟิล์มด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ปริมาตร 200 µL และบ่มไว้เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดสีย้อมออกแล้วล้างด้วยน้ำประปา พร้อมผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สุดท้าย ละลายไบโอฟิล์มด้วย 33% กรดอะซิติก ปริมาตร 50 µL จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การสร้างไบโอฟิล์ม (%Biofilm formation) ตามสูตรด้านล่าง

$$\text{Biofilm formation (\%)} = \left(1 - \frac{OD570_{positive} - OD570_{sample}}{OD570_{sample} - OD570_{negative}}\right) \times 100$$

3.13 การทดสอบฤทธิ์ต้านกิจกรรมเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสของสารที่ 1-7

เตรียมสารละลาย 50 mM บัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH 6.8) ปริมาตร 150 mL จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 60 µL ลงในแต่ละหลุมของ 96 well plate ตามด้วยสารละลาย 1.5 mM (**1**–**7**) และมี 1.5 mM acarbose เป็น positive control หลุมละ 10 µL แล้วเติม 1.5U/µL เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส ปริมาตร 10 µL ลงในแต่ละหลุม negative control จากนั้นบ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติม 1% น้ำแป้ง ปริมาตร 20 µL ในทุกหลุม แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 80°C ระยะเวลา 15 นาที และเติมสารละลาย GOPOD ปริมาตร 200 µL บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

3.14 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ของสารที่ 1-6

3.14.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ในอาหาร DMEM ที่เติม 10%FBS และ ยาปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่มีความชื้นและ 5% CO_2 (Tabtimmai et al., 2025)

3.14.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็นอาหารที่มีสารละลาย 4.68 ถึง 150 µM (**1–6)** และใช้สารละลาย 10%DMSO เป็น positive control จากนั้นบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดและชุดควบคุมดังกล่าวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายหลังการบ่ม ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์และหาค่า IC_{50} โดยใช้สารละลาย 0.5 mg/mL MTT ปริมาตร 10 µLต่อหลุม และบ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออก แล้วละลายผลึก formazan ด้วย DMSO ปริมาตร 50 µL ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm และวัดค่าพื้นหลังที่ความยาวคลื่น 630 nm ก่อนนำข้อมูลมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์โดยใช้สูตรด้านล่าง (Tabtimmai et al., 2025)

$$\text{Cell viability} = \left(\frac{OD570_{positive} - OD570_{negative}}{OD630_{positive} - OD630_{negative}} \right) \times 100$$

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

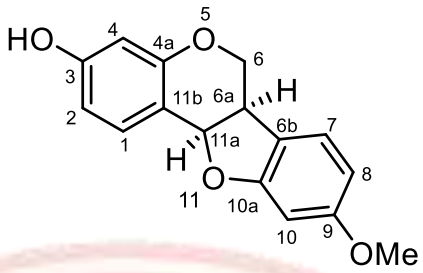
4.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่พบ

สารทั้งหมดที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ โครงสร้างของสารสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปี โดยใช้ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) ที่ประกอบด้วยเทคนิค 1D (^{1}H และ ^{13}C NMR) รวมทั้ง 2D (COSY, HSQC และ HMBC) สำหรับโครงสร้าง 3 มิติสัมบูรณ์สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยการวัดการหมุนเชิงแสง (optical rotation) หรือ การหมุนโพลาไรเซชัน (polarization rotation) โดยวัดค่าแอลฟ่าดี $[\alpha]_D$ เพื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่มีการรายงานมาก่อนหน้า สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างสามารถแยกการวิเคราะห์ของสารแต่ละสารได้ดังต่อไปนี้

4.1.1 สารที่ 1 (Medicarpin)

สารที่ **1** มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอมส้ม จัดเป็นสาร pterocarpan ในกลุ่ม flavonoids มีสูตรโมเลกุล $C_{16}H_{14}O_4$ จากการวิเคราะห์ด้วย NMR พบว่าใน ^{1}H NMR spectrum (**ภาพที่ ก-1**) มีสัญญาณของหมู่ methoxy ที่ δ_H 3.76 (3H, s, 9-OMe) และสัญญาณโปรตอนของอะโรมาติกที่ δ_H 7.12 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-1), 7.38 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-7), (6.41-6.55 (4H, m, H-2, H-4, H-8, H-10) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของ methylene ที่ δ_H 4.24 (2H, dd, *J* = 5.2, 10.8 Hz, H-6) และโปรตอน methine ที่ δ_H 3.50 (1H, m, H-6a) และ 5.49 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, H-11a)

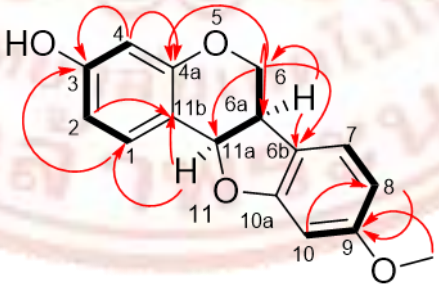
จากข้อมูล ^{13}C NMR NMR (**ภาพที่ ก-2**) แสดงคาร์บอนจำนวน 16 สัญญาณ โดยพบว่าเป็นสัญญาณคาร์บอนของหมู่ methoxy ที่ δ_C 55.9 (9-OMe) และสัญญาณคาร์บอนของ deshielded aromatic เนื่องจากอิทธิพลของหมู่ hydroxyl ที่ δ_C 157.5 (C-3), 161.5 (C-9), 161.1 (C-10a) และ 157.5 (C-4a) รวมถึงสัญญาณของอะโรมาติกที่ δ_C 133.4 (C-1), 110.2 (C-2), 104.1 (C-4), 125.2 (C-7), 106.8 (C-8), 113.0 (C-11b) และ 119.5 (C-6b) ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR แสดงใน **ตารางที่ 4-1** จากการค้นคว้าในฐานข้อมูล พบว่าข้องมูล 1D NMR มีความใกล้เคียงกับสารที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ และจากการเปรียบเทียบข้อมูล NMR (**ตารางที่ 4-1**) พบว่าสารที่ **1** เป็นสารที่ชื่อว่า Medicarpin ซึ่งถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์ในปี 1965 จากต้น *Swarzia madagascariensis* (Harper et al., 1965; Sakagami et al., 1974)



Medicarpin (1)

ภาพที่ 4-1 โครงสร้างสารที่ **1**

และจากการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค 2D NMR ประกอบด้วย COSY, HSQC และ HMBC (**ภาพที่ ก-3–ก-5**) พบว่าจากเทคนิค ^{1}H-^{1}H COSY spectrum แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอน H-1 กับ H-2 นอกจากนี้ยังพบระบบ W-coupling ของโปรตอน H-2 กับ H-4 ซึ่งเป็น long-range coupling ที่เกิดขึ้นจากผลของการเกิด resonance ของวงแอโรมาติก พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-7 กับ H-8 และความสัมพันธ์ของโปรตอน H-8 กับ H-10 (W-coupling) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของโปรตอน H-6, H-6a และ H-11a ซึ่งแดสงให้เห็นว่าโปรตอนเหล่านี้อยู่ในระบบเดียวกัน ดังแสดงใน**ภาพที่ 4-2** จากข้อมูลHMBC spectrum แสดงการเชื่อมต่อระหว่าง H-1 กับ C-3 และ H-4 กับ C-3 และ C-4a ซึ่งช่วยยืนยันโครงสร้างของระบบวงแหวนแอโรมาติก นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของ H-6 กับ C-4a, C-6a, C-6b และ C-11a; H-6a กับ C-6 และ C-6b; H-8 กับ C-9 และ H-10 กับ C-8 ซึ่งความสัมพันธ์เหล่านี้ช่วยยืนยันการมีอยู่ของวงเฮเทอร์โรไซคลิกเหล่านี้ อีกทั้งยังพบว่าหมู่เมทิลที่ δ_H 3.76 มีการเชื่อมต่อกับ δ_C 161.5 (C-9) ใน HMBC spectrum ซึ่งบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของหมู่ methoxy ที่ตำแหน่ง C-9 รายระเอียดความสัมพันธ์ของ HMBC 2D NMR แสดงดัง**ภาพที่ 4-2**



ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์ HMBC ⌒ และ ^{1}H-^{1}H COSY ของสาร Medicarpin (**1**)

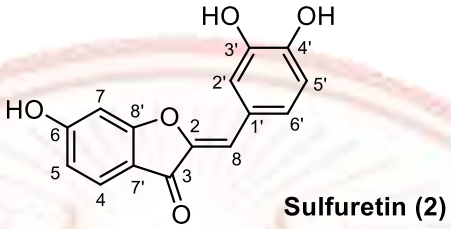
ตารางที่ 4-1 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Medicarpin (**1**)

No.	Medicarpin (300 MHz, acetone-d_6)		สาร **1** (400 MHz, $CDCl_3$)	
	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)
1	133.4	7.10 (1H, d, 8.2)	132.3	7.12 (1H, d, 8.4)
2	111.0	6.22-6.45 (1H, m)	109.9	6.41-6.55 (1H, m)
3	160.4	-	160.8	-
4	104.4	6.22-6.45 (1H, m)	103.8	6.41-6.55 (1H, m)
4a	158.3	-	157.2	-
6	67.8	3.46 (1H, d, 6.2)	66.6	3.60 (1H, d, 10.8)
		4.13 (1H, dd, 10.0 and 10.0)		4.24 (1H, dd, and 10.8)
6a	41.2	3.45 (1H, m)	39.6	3.50 (1H, m)
6b	121.2	-	119.2	-
7	126.3	7.20 (1H, d, 8.4)	124.9	7.38 (1H, d, 8.4)
8	107.5	6.22-6.45 (1H, m)	106.5	6.41-6.55 (1H, m)
9	163.0	-	161.2	-
10	98.0	6.22-6.45 (1H, m)	97.0	6.41-6.55 (1H, m)
10a	162.4	-	156.7	-
11a	80.4	5.38 (1H, d, 6.0)	79.0	5.49 (1H, d, 6.8)
11b	113.2	-	113.0	-
OMe	56.1	3.62 (3H, s, OMe)	55.6	3.76 (3H, s, OMe)
3-OH	-	8.46 (1H, s)	-	8.10 (1H, s, OH)

4.1.2 สารที่ 2 (Sulfuretin)

สารที่ **2** เป็นผงสีเหลืองน้ำตาล มีสูตรโมเลกุล $C_{15}H_{10}O_5$ และจัดอยู่ในกลุ่ม aurone โดยเป็นสารประเภท flavonoid จากการวิเคราะห์ด้วย NMR พบว่าใน ^{1}H NMR spectrum (**ภาพที่ ก-6**) มีสัญญาณของ olefinic proton ที่ δ_H 6.70 (d, *J* = 2.0 Hz, H-8) และสัญญาณของวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ 3 ตำแหน่ง ซึ่งแสดงลักษณะเฉพาะของระบบ ABX ได้แก่ δ_H 6.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 7.53 (1H, m, H-2') และ 7.25 (1H, dd, *J* = 8.4 Hz, H-6') และสัญญาณในย่านแอโรมาติกอื่น ๆ ที่ δ_H 7.51 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-4) และ 6.68-6.70 (2H, m, H-5 และ H-7) สำหรับ ^{13}C NMR spectrum (**ภาพที่ ก-7**) แสดงทั้งหมด 15 สัญญาณ โดยพบสัญญาณของ carbonyl 1 สัญญาณ ที่ δ_C 181.96 (C-3) พบ olefinic carbon 2 สัญญาณที่ δ_C 147.57 (C-2) กับ δ_C 181.96 (C-3) และพบ 12 สัญญาณคาร์บอนของแอโรมาติกดังแสดงใน **ตารางที่ 4-2** จากการเปรียบเทียบข้อมูล 1D

NMR ของสารนี้ พบว่ามีค่า chemical shifts ใกล้เคียงกับสารที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้าโดยถูกค้นพบในปี 2003 จากต้น *Albizzia julibrissin* ดังแสดงการเปรียบเทียบใน**ตารางที่ 4-2** จึงสรุปว่าสารนี้เป็นสารที่มีชื่อว่า sulfuretin (Jung et at., 2003)



ภาพที่ 4-3 โครงสร้างสารที่ **2**

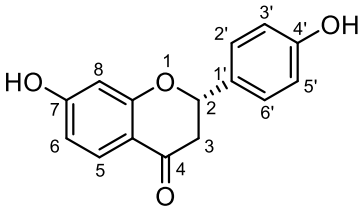
ตารางที่ 4-2 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Sulfuretin (**2**)

No.	Sulfuretin (500 MHz, CD_3OD)		สาร **2** (400 MHz, acetone-d_6)	
	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)
2	146.4	-	147.5	-
3	183.1	-	181.9	-
4	125.5	7.50 (1H, d, 8.25)	126.0	7.51 (1H, d, 8.4)
5	98.0	6.62-6.58 (1H, m)	99.55	6.68-6.70 (1H, m)
6	168.5		170.7	
7	112.8	6.62-6.58 (1H, m)	111.6	6.68-6.70 (1H, m)
8	167.2	-	169.4	-
9	113.4	-	113.0	-
10	113.3	6.62-6.58 (1H, m)	114.9	6.70-6.68 (1H, m)
7-OH	-	-	-	-
1′	124.2	-	125.3	-
2′	117.6	7.42 (1H, br s)	118.3	7.53 (1H, m)
3′	145.4	-	146.7	-
4′	148.0	-	149.1	-
5′	115.3	6.74 (1H, d, 8.25)	116,6	6.88 (1H, d, 8.4)
6′	125.0	7.13 (1H, d, 7.3)	125.1	7.25 (1H, d, 8.4)
4′-OH	-		-	-
3′-OH	-		-	-

4.1.3 สารที่ 3 (Liquiritigenin)

สารที่ **3** เป็นของแข็งผลึกสีเหลืองน้ำตาล มีสูตรโมเลกุล $C_{15}H_{12}O_4$ และจัดอยู่ในกลุ่ม flavanone ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธ์ของ flavonoids จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR พบว่าใน ^{1}H NMR spectrum (**ภาพที่ ก-8** และ**ตารางที่ 4-3**) มีสัญญาณที่สอดคล้องกับโครงสร้างของ flavanone skeleton ในส่วนของโครงสร้าง chromanone (C-ring) พบสัญญาณของ proton ที่ตำแหน่ง C-2 และ C-3 โดยมีสัญญาณที่ δ_H 5.46 (1H, dd, *J* = 2.8, 3.2 Hz, H-2) ซึ่งเป็น chiral center และสัญญาณของ methylene proton ที่ δ_H 2.69 (1H, dd, *J* = 2.4, 16.8 Hz, H-3a) และ δ_H 3.07 (1H, dd, *J* = 18.8, 22.8 Hz, H-3b) สำหรับ A-ring พบสัญญาณของ ortho coupling ที่ δ_H 7.72 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5) และ δ_H 6.58 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz, H-6) รวมถึง meta coupling ระหว่าง δ_H 6.58 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.4 Hz, H-6) และ δ_H 6.41 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-8) แสดงถึง proton ในวง A ที่มีการแทนที่ของหมู่ฟังก์ชัน ในส่วนของ B-ring พบว่าสัญญาณของ proton ที่ตำแหน่ง H-2′, H-3′, H-5′, และ H-6′ แสดงรูปแบบการแทนที่แบบ para-substituted อย่างสมมาตร โดยให้สัญญาณ δ_H 7.39 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2′, H-6′) และ δ_H 6.89 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3′, H-5′) ซึ่งสะท้อนถึงการมีหมู่ฟังก์ชันที่ตำแหน่ง C-4′ ทั้งนี้ สัญญาณที่ δ_H 7.72 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5) มีการ deshielded เล็กน้อย ซึ่งคาดว่าเกิดจากอิทธิพลของหมู่ electron-withdrawing group (EWG) ที่ตำแหน่ง C-5 ซึ่งมีผลต่อสนามแม่เหล็กของ proton ใกล้เคียง

สำหรับ ^{13}C NMR spectrum (**ภาพที่ ก-9** และ**ตารางที่ 4-3**) พบสัญญาณทั้งหมด 15 สัญญาณ ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างของ liquiritigenin โดยสัญญาณของ carbonyl carbon ปรากฏที่ δ_C 189.7 (C-4) ตำแหน่งที่บ่งชี้ถึงโครงสร้างของ flavanone นอกจากนี้ สัญญาณ chiral carbon ปรากฏที่ δ_C 79.6 (C-2) ซึ่งเป็นคาร์บอนที่เชื่อมกับหมู่ไฮดรอกซีและเป็นจุดสำคัญทาง stereochemistry ของสาร สัญญาณ methylene carbon ที่ δ_C 43.7 (C-3) บ่งบอกถึงลักษณะโครงสร้างของ flavanone skeleton สำหรับ quaternary carbons สัญญาณปรากฏที่ δ_C 114.2 (C-10) และ δ_C 130.3 (C-1′) โดย C-10 เป็นส่วนหนึ่งของวง A ที่เชื่อมกับ C-9 (δ_C 163.8) ส่วน C-1′ เป็นคาร์บอนในวง B ซึ่งมีลักษณะเป็น benzyl carbon นอกจากนี้ ยังพบสัญญาณของ oxygenated carbons ที่ δ_C 165.9 (C-7), δ_C 163.8 (C-9) และ δ_C 157.7 (C-4′) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่หมู่ไฮดรอกซีหรือออกซิเจนเชื่อมอยู่ สอดคล้องกับโครงสร้างของ flavonoid ดังแสดงใน **ตารางที่ 4-3**



Liquiritigenin (3)

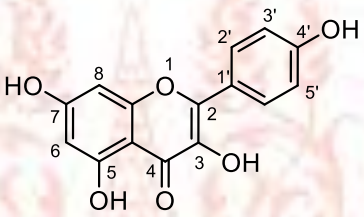
ภาพที่ 4-4 โครงสร้างสารที่ **3**

ตารางที่ 4-3 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Liquiritigenin (**3**)

No.	Liquiritigenin (400 MHz, acetone-d_6)		สาร **3** (400 MHz, acetone-d_6)	
	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)
2	79.5	5.40 (1H, dd, 2.8, 12.8)	79.6	5.46 (1H, dd, 2.8, 3.2)
3	43.8	2.62 (1H, dd, 2.8, 16.8)	43.7	2.69 (1H, dd, 2.4, 16.8)
		3.00 (1H, dd, 12.8, 16.8)		3.07 (1H, dd, 18.8, 22.8)
4	189.6	-	189.7	-
5	128.5	7.68 (1H, d, 8.8)	128.6	7.72 (1H, d, 8.8)
6	110.9	6.54 (1H, dd, 2.4, 8.8)	110.3	6.58 (1H, dd, 2.0, 8.4)
7	165.9	-	164.4	-
8	102.8	6.38 (1H, d, 2.4)	102.7	6.41 (1H, d, 2.4)
9	163.8	-	163.6	-
10	113.5	-	114.2	-
1′	130.4	-	130.3	-
2′	128.0	7.36 (2H, d, 8.8)	128.0	7.39 (2H, d, 8.8)
3′	115.2	6.87 (2H, d, 8.8)	115.2	6.89 (2H, d, 8.8)
4′	157.7	-	157.7	-
5′	115.2	6.87 (2H, d, 8.8)	114.2	6.89 (2H, d, 8.8)
6′	128.0	7.36 (2H, d, 8.8)	128.0	7.39 (2H, d, 8.8)

4.1.4 สารที่ 4 (Kaempferol)

สารที่ **4** เป็นของแข็งผลึกสีขาว มีสูตรโมเลกุล $C_{15}H_{10}O_6$ และจัดอยู่ในกลุ่ม flavanol ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธ์ของ flavonoid จากการวิเคราะห์ ^{1}H NMR spectrum (**ภาพที่ ก-10** และ**ตารางที่ 4-4**) พบสัญญาณแอโรมาติกsinglet ที่ δ_H 6.65 (1H, s, H-6) และ 6.40 (1H, s, H-8) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของวงแหวนแอโรมาติกที่ ring A ที่มีการแทนที่ของวงที่ตำแหน่งที่ C-5 และ C-7 นอกจากนี้ ยังพบสัญญาณ ortho coupling ที่ δ_H 7.39 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2′, H-6′) และ δ_H 6.82 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3′, H-5′) ซึ่งเป็นลักษณะของ para-substituted pattern บนวงเบนซีน ring B



Kaempferol (4)

ภาพที่ 4-5 โครงสร้างสารที่ **4**

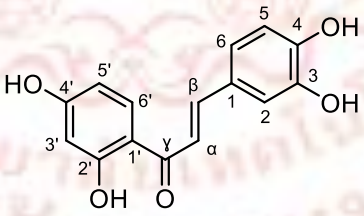
ตารางที่ 4-4 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Kaempferol (**4**)

No.	Kaempferol (400 MHz, CD_3OD)		สาร **4** (400 MHz, DMSO-d_6)	
	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)
2	148.1	-	154.4	-
3	137.1	-	134.5	-
4	177.3	-	180.4	-
5	162.4	-	157.5	-
6	99.3	6.15 (1H, s, H-6)	98.0	6.65 (1H, s)
7	165.5	-	165.0	-
8	94.5	6.35 (1H, s, H-8)	92.4	6.40 (1H, s)
9	158.2	-	161.7	-
10	104.5	-	105.4	-
1′	123.7	-	121.0	-
2′	130.7	8.05 (2H, d, 8.5)	130.1	8.40 (2H, d, 8.8)
3′	116.3	6.88 (2H, d, 8.5)	115.1	6.82 (2H, d, 8.8)
4′	160.5	-		-
5′	116.3	6.88 (2H, d, 8.5)	115.1	6.82 (2H, d, 8.8)
6′	130.7	8.05 (2H, d, 8.5)	130.1	8.40 (2H, d, 8.8)

สำหรับ ^{13}C NMR spectrum (**ภาพที่ ก-11**) พบสัญญาณทั้งหมด 15 ตำแหน่ง โดยมีสัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ_C 180.4 (C-4) ซึ่งเป็นตำแหน่งของหมู่คาร์บอนิล ในโครงสร้างของ flavanol นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ quaternary carbons ของ olefinic carbons ที่ δ_C 154.4 (C-2) และ 134.5 (C-3) ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของกลุ่ม flavanol นอกจากนี้ยังพบสัญญาณคาร์บอนของแอโรมาติกประเภท quaternary และ primary รวมทั้งสิ้น 12 สัญญาณ ดังสรุปใน**ตารางที่ 4-4** จากการเปรียบเทียบข้อมูลของ 1D NMR พบว่าสาร **4** เป็นสารที่มีชื่อว่า Kaempferol ซึ่งมักพบได้จากธรรมชาติและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย (Bangar et al., 2023)

4.1.5 สารที่ 5 (Butein)

สารที่ **5** (Butein) มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอมน้ำตาล มีสูตรโมเลกุล $C_{15}H_{12}O_5$ และจัดอยู่ในกลุ่ม chalcone ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธุ์ของ flavonoid จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR พบว่าใน ^{1}H NMR spectrum (**ภาพที่ ก-12**) มีสัญญาณของ olefinic protons ปรากฏที่ δ_H 7.76 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-**α**) และ 7.67 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-**β**) ซึ่งแสดงถึงลักษณะโครงสร้างแบบ *trans*-coupled **α**,**β**-unsaturated system หรือ chalcone moiety นอกจากนี้ ยังพบสัญญาณโปรตอนของแอโรมาติก ที่ δ_H 8.10 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-6′),6.45 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz, H-5′), 6.36 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3′), 7.35 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5) และ 7.22 (1H, dd, J = 2.0, 8.4 Hz, H-6) รวมถึงสัญญาณ broad singlet ที่ δ_H 13.6 (1H, s, 2′-OH) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซิลที่สร้างพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล



Butein (5)

ภาพที่ 4-6 โครงสร้างสารที่ **5**

สำหรับข้อมูล ^{13}C NMR spectrum (**รูปที่ ก-13** และ**ตารางที่ 4-5**) พบสัญญาณทั้งหมด 15 สัญญาณ โดยพบสัญญาณของ carbonyl carbon ที่ δ_C 192.8 (C-4) ซึ่งยืนยันการมีอยู่ของหมู่คีโตนและพบสัญญาณของ olefinic carbons ที่ δ_C 118.2 (C-**β**) และ 145.5 (C-**α**) พบสัญญาณของวงแอโรมาติก 12 สัญญาณที่ δ_C 128.1 (C-1), 115.9 (C-2), 146.4 (C-3), 149.3 (C-4), 151.50 (C-5), 123.4 (C-6), 114.4 (C-1′), 167.5 (C-2′), 103.7 (C-3′), 165.7 (C-4′), 108.7 (C-5′) และ 133.2 (C-

6′) โดยตำแหน่ง C-3, C-4, , C-4′ และ C-2′ มีค่าสูงกว่าคาร์บอนอื่นๆ เนื่องจากอิทธิพลของกลุ่มไฮดรอกซิล (OH) ที่ต่ออยู่กับวงแหวนแอโรมาติกทำให้เกิดการ deshielded ของคาร์บอนเหล่านี้ ดังสรุปใน**ตารางที่ 4-5** จากการเปรียบเทียบข้อมูลของ 1D NMR พบว่าสาร **5** เป็นสารที่มีชื่อว่า butein ซึ่งพบในพืชชนิดนี้มาก่อนหน้า (Kuo et al., 2007)

ตารางที่ 4-5 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Butein (**5**)

No.	Butein (400 MHz, acetone-d_6)		สาร **5** (400 MHz, acetone-d_6)	
	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)
1	127.3	-	128.1	-
2	115.1	7.34 (1H, d, 2.0)	115.9	7.35 (1H, d, 2.4)
3	145.5	-	146.4	-
4	148.4	-	149.3	-
5	155.5	6.90 (1H, d, 8.0)	151.50	6.90 (1H, d, 8.4)
6	122.6	7.21 (1H, dd, 2.0, 8.0)	123.4	7.22 (1H, dd, 2.0, 8.4)
1′	113.6	-	114.4	-
2′	166.7	13.6 (1H, s)	167.5	13.6 (1H, s)
3′	102.9	6.35 (1H, d, 2.4)	103.7	6.36 (1H, d, 2.4)
4′	164.7	-	165.7	-
5′	107.8	6.46 (1H, dd, 2.4, 8.8)	108.7	6.45 (1H, dd, 2.4, 8.8)
6′	132.4	8.10 (1H, d, 8.8)	133.2	8.10 (1H, d, 8.8)
α	117.4	7.68 (1H, d, 15.2)	118.2	7.67 (1H, d, 15.6)
β	144.7	7.76 (1H, d, 15.2)	145.5	7.76 (1H, d, 15.6)
γ	191.9	-	192.8	-
2′-OH	-	13.6 (1H, s)	-	13.6 (1H, s)

4.1.6 สารที่ 6 (Iso-butrin)

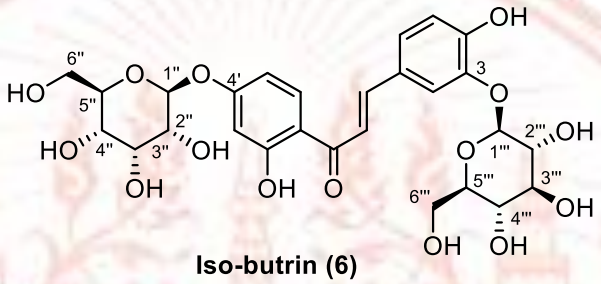
Iso-butrin เป็นสารในกลุ่ม chalcone glycoside ซึ่งจัดเป็นอนุพันธุ์ของ flavonoid โดยมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล และมีสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{32}O_{15}$ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR พบว่าใน ^{1}H NMR spectrum (**ภาพที่ ก-14** และ**ตารางที่ 4-6**) คล้ายกับ Butein (**5**) โดยพบสัญญาณของแอโรมาติกที่ δ_H 7.76 (d, *J* = 15.6 Hz, H-**α**) และ 7.67 (d, *J* = 15.6 Hz, H-

β) บ่งบอกถึงโครงสร้างของ *trans*-coupled **α**,**β**-unsaturated system ซึ่งเป็นคุณลักษณะสำคัญของ chalcone และยังพบสัญญาณของแอโรมาติก ดังเช่นสารที่ **5** chalcone skeleton แต่มีความแตกต่างที่ชัดเจนที่ตำแหน่งโปรตอนที่พบสัญญาณในช่วง δ_H 4.86-3.34 (12H, overlap) ชี้ถึงการมีอยู่ของกลุ่มน้ำตาลที่ต่อที่โครงสร้างหลักของสารกลุ่มนี้

ตารางที่ 4-6 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Iso-butrin (**6**)

No.	Iso-butrin (500 MHz, CD_3OD)		สาร **6** (400 MHz, CD_3OD)	
	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)
1	128.3	-	128.4	-
2	118.1	7.73 (d, 1.95)	118.1	7.71 (d, 4.00)
3	147.3	-	147.2	
4	151.9	-	151.5	
5	117.5	6.91 (d, 8.27)	117.5	6.92 (d, 8.00)
6	127.4	7.33 (dd, 1.84, 8.22)	127.3	7.32 (d, 8.00)
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1′	116.6	-	116.5	-
1″	104.2	-	104.1	-
1‴	101.3	-	101.2	-
2′	165.8	-	165.4	-
3′	105.1	6.71 (dd, 2.44, 9.09)	105.1	6.70 (d, 8.00)
4′	165.1	-	165.1	-
5′	109.4	6.62 (d, 2.41)	109.4	6.62 (s)
6′	133.2	8.11 (d, 9.12)	133.2	8.09 (d, 8.00)
C-**α**	146.3	7.65 (d, 15.35)	146.2	7.64 (d, 16.00)
C-***β***	118.9	7.82 (d, 15.31)	118.9	7.70 (d, 12.00)
C=O	193.9	-	193.9	-

สำหรับ ^{13}C NMR spectrum (**ภาพที่ ก-15**) พบสัญญาณของกลุ่ม chalcone ดังเช่นสาร **5** แต่พบคาร์บอนของกลุ่มน้ำตาลเพิ่มเติม ที่ δ_C 104.1 (C-1˝), 101.2 (C-1˝˝), 78.60 (C-3˝), 78.21 (C-3˝˝), 77.79 (C-2˝), 77.56 (C-2˝˝), 74.88 (C-5˝), 74.68 (C-5˝˝), 71.62 (C-4˝), 71.12 (C-4˝˝), 62.69 (C-6˝), 62.32 (C-6˝˝) ส่วน δ_C 101.23 (C-1˝˝) และ 105.07 (C-2˝) จากการเปรียบเทียบข้อมูลของ 1D NMR พบว่าสาร **6** เป็นสารที่มีชื่อว่า Iso-butrin (Negi et al., 2023; Chokchaisiri et al., 2009)



Iso-butrin (6)

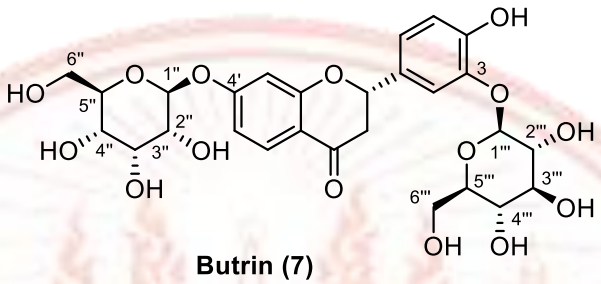
ภาพที่ 4-7 โครงสร้างสารที่ **6**

4.1.7 สารที่ 7 (Butrin)

Butrin เป็นสารในกลุ่ม flavanone glycoside ซึ่งจัดเป็นอนุพันธุ์ของ flavonoid โดยมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง และมีสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{30}O_{14}$ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR พบว่าสัญญาณใน ^{1}H NMR spectrum (**รูปที่ ก-16** และ**ตารางที่ 4-7**) มีความคล้ายคลึงกับ Iso-butrin ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างพื้นฐานแบบ flavanone โดยพบสัญญาณของแอโรมาติกในช่วง δ_H 7.71 (d, *J* = 8.8 Hz) และ 6.71 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz) แสดงถึงการจัดเรียงแบบ ortho และ meta-substituted บนวงเบนซีน นอกจากนี้ยังพบสัญญาณที่ δ_H 6.66 (d, *J* = 2.4 Hz), 6.84 (d, *J* = 8.0 Hz), และ 7.03 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz) ซึ่งสนับสนุนโครงสร้างของ flavanone ที่มีการแทนที่ด้วยหมู่ hydroxyl หรือ methoxyl บนวงฟีนิล บริเวณสัญญาณในช่วง δ_H 4.98 (d, *J* = 7.2 Hz) และ 4.72 (d, *J* = 7.2 Hz) เป็นลักษณะของ proton บนตำแหน่ง anomeric ของหมู่น้ำตาลแบบ **β**-glucoside ซึ่งสัมพันธ์กับสัญญาณคาร์บอนที่ δ_C 99.7 และ 101.9 ตามลำดับ บ่งชี้ถึงการมีอยู่ของหมู่น้ำตาลสองหน่วยในโครงสร้างหลักของสารนี้

ใน ^{13}C NMR spectrum (**รูปที่ ก-17**) พบสัญญาณของคาร์บอนคาร์บอนิลของหมู่ flavanone ที่ δ_C 190.6 ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของโครงสร้าง flavonoid และสัญญาณคาร์บอนแอโรมาติกในช่วง δ_C 103.5–147.1 รวมถึงคาร์บอนของน้ำตาลที่ δ_C 79.3, 47.7, และ 99.7–101.9 ซึ่งเน้นย้ำถึงลักษณะของ glycosylated flavanone จากการเปรียบเทียบข้อมูล 1D NMR พบว่าโครงสร้างของสารนี้มีความคล้ายคลึงกับ Iso-butrin แต่มีความแตกต่างกันที่การจัดเรียงของหมู่น้ำตาล และ

ลำดับของสัญญาณ anomeric proton ซึ่งสนับสนุนว่าสารนี้คือ butrin ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของ Isobutrin ที่พบในพืช *Butea monosperma* (Negi et al., 2023; Chokchaisiri et al., 2009)



Butrin (7)

ภาพที่ 4-8 โครงสร้างสารที่ **7**

ตารางที่ 4-7 ข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR ของสาร Butrin (**7**)

No.	Butrin (500 MHz, DMSO-d_6)		สาร **7** (400 MHz, DMSO-d_6)	
	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)	δ_C	δ_H (mult, *J* in Hz)
1	-		-	
2	79.2	5.45 (dd, 2.2, 12.5)	79.3	5.47 (dd, 3.2, 12.8)
3	42.9	3.2 (m)	47.7	3.3 (m)
4	190.4	-	190.6	-
5	127.9	7.70 (d, 8.6)	127.9	7.71 (d, 8.8)
6	110.9	6.70 (dd, 8.7, 2.2)	111.0	6.71 (dd, 8.8, 2.8)
7	162.8	-	162.9	-
8	103.5	6.66 (d, 2.2)	103.5	6.66 (d, 2.4)
9	163.5	-	163.5	-
10	115.7	-	115.7	-
1′	129.7	-	129.7	-
1″	99.7	4.97 (d, 7.4)	99.7	4.98 (d, 7.2)
1‴	101.3	4.71 (d, 7.1)	101.9	4.72 (d, 7.2)
2′	115.4	7.28 (bs)	115.4	7.27 (bs)
3′	145.1	-	145.1	-
4′	147.1	-	147.1	-
5′	115.3	6.83 (d, 8.3)	115.4	6.84 (d, 8.0)
6′	121.7	7.02 (dd, 8.2, 1.5)	121.7	7.03 (dd, 8.0, 2.0)

สาร medicarpin (**1**) sulfuretin (**2**) liquiritigenin (**3**) kaempferol (**4**) butein (**5**) isobutrin (**6**) และ butrin (**7**) ที่พบใน *B. monosperma* พบว่าสาร **2**–**3, 5**–**7** พบว่ามีการรายงานในส่วนดอกของทองกวาว (Ahmed et al., 2016; Chokchaisiri et al., 2009; Taneja et al., 2015) ส่วนสาร **1** และ **6** พบว่ายังไม่มีการรายงานในดอกแต่พบการรายงานในเปลือกของพืชชนิดนี้ (Taneja et al., 2015) และพบว่าในพืชชนิดอื่นพบการรายงานดังแสดงใน**ตารางที่ 4.8**

ตารางที่ 4-8 การค้นพบสารที่แยกได้กับพืชชนิดอื่น

สาร	พืช	อ้างอิง
Medicarpin (**1**)	*Glycyrrhiza uralensis Fisch*	Gou et al., 2020
	Sophora Japonica	VanEtten et al., 1983
	Glycyrrhiza glabra	Taniguchi et al., 2000
	Medicago sativa L	Sakagami et al., 1974
	Canavalia lineata	Oh JM et al., 2023
Sulfuretin (**2**)	*Toxicodendron vernicifluum*	Lee et al., 2012
	Dahlia variabilis Desf	Pretz et al., 2023
	Cotinus coggygria	Pašić et al., 2025
	Albizzia julibrissin	Jung et al., 2003
Liquiritigenin (**3**)	*Glycyrrhiza glabra*	Taniguchi et al., 2000
	Tetradium ruticarpum	Li et al., 2021
	Bauhinia forficate	Sampaio et al., 2019
	Sinofranchetia chinensis	Kong et al., 2000
Kaempferol (**4**)	*Equisetum myriochaetum*	Olazarán et al., 2021
	Quercus mongolica	Yin et al., 2018
	Convolvulus pilosellifolius	Al-Rifai et al., 2015
	Hippophae Rhamnoides	Parvez et al., 2022
Butein (**5**)	*Dahlia variabilis Desf*	Pretz, D. et al., 2023
	Cotinus coggygria	Pašić, I. et al., 2025
	Vitex agnus-castus	Kavaz, A. et al., 2022
	Sansevieria liberica	Ikewuchi, J. C. et al., 2011

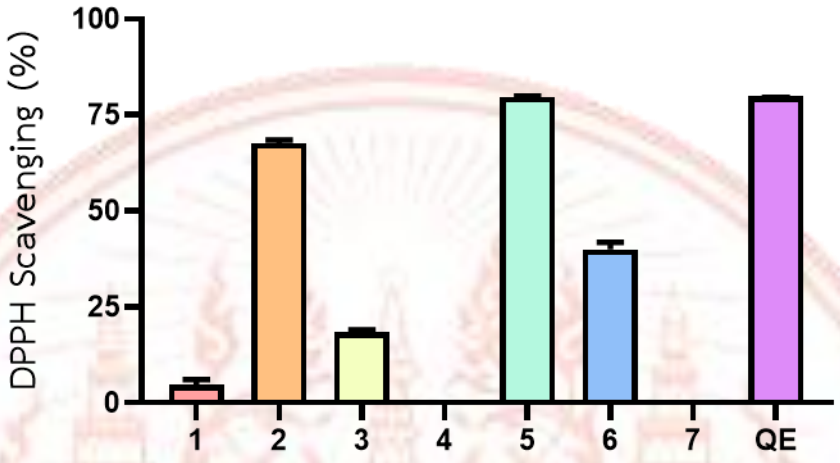
4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การต้านอนุมูลอิสระเป็นกลไกสำคัญที่ช่วยปกป้องเซลล์ในร่างกายจากความเสียหายของอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นโมเลกุลไม่เสถียรที่อาจนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ได้ การศึกษานี้จึงมุ่งประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร 7 ชนิดที่สกัดได้จากดอกทองกวาว ได้แก่ medicarpin (**1**), sulfuretin (**2**), liquiritigenin (**3**), kaempferol (**4**), butein (**5**), iso-butrin (**6**) และ butrin (**7**) ในการประเมินประสิทธิภาพ ได้มีการใช้วิธีทดสอบที่เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง 3 วิธี คือ DPPH, ABTS และ FRAP สำหรับการทดสอบ DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่นิยม โดยจะอาศัยปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลอิสระ DPPH• ที่เดิมมีสีม่วงเข้ม เมื่อสารตัวอย่างทำปฏิกิริยาจะทำให้สีของสารละลายจางลงหรือไม่มีสี ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ส่วนวิธี ABTS จะใช้อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งมีสีเขียวอมฟ้า และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายก็จะจางลงตามความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารนั้น และสุดท้ายคือวิธี FRAP ซึ่งจะประเมินความสามารถของสารในการรีดิวซ์ไอออนของเหล็กจาก Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} ภายใต้สภาวะกรด โดย Fe^{2+} ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับสาร TPTZ เกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งต่างจากสองวิธีแรกตรงที่ยิ่งสีน้ำเงินเข้มมากเท่าใด ก็ยิ่งแสดงว่าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเท่านั้น

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้จากดอกทองกวาวด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 150 µM พบว่าสารส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต่ำ ได้แก่ medicarpin (**1**), liquiritigenin (**3**) และ butrin (**7**) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 4.76%, 18.46% และ 0.07% ตามลำดับ ดัง**ภาพที่ 4-9** ผลนี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า เช่น medicarpin มีค่า IC_{50} สูงกว่า 200 µM (Al-Maharik et al., 2012), liquiritigenin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 72.4 µM (Shi et al., 2019) และ butrin ซึ่งเป็นสารไกลโคไซด์มักมีฤทธิ์ต่ำ (Iwashina et al., 2021) kaempferol (4) และ iso-butrin (**6**) ให้ค่าการยับยั้งติดลบ ซึ่งอาจเกิดจากการรบกวนของสีสาร โดยผลของ iso-butrin สอดคล้องกับรายงานว่ามีฤทธิ์ต่ำมาก อย่างไรก็ตาม ผลของ kaempferol ขัดแย้งกับข้อมูลในวรรณกรรมที่ระบุว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่แรง ($IC_{50} \approx 15.2$ µM) (Liu et al., 2013) ในทางกลับกัน สาร sulfuretin (**2**) และ butein (**5**) แสดงฤทธิ์โดดเด่น โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50% จึงนำมาคำนวณค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 94.50 ± 8.34 µM และ 50.22 ± 6.91 µM ตามลำดับ โดยค่า IC_{50} ของ sulfuretin ต่ำกว่ารายงานก่อนหน้า (17.8 µM) (Zheng et al., 2011) ขณะที่ butein มีฤทธิ์สูงกว่าบางรายงานอย่างชัดเจน ดังนั้น จากผลการ

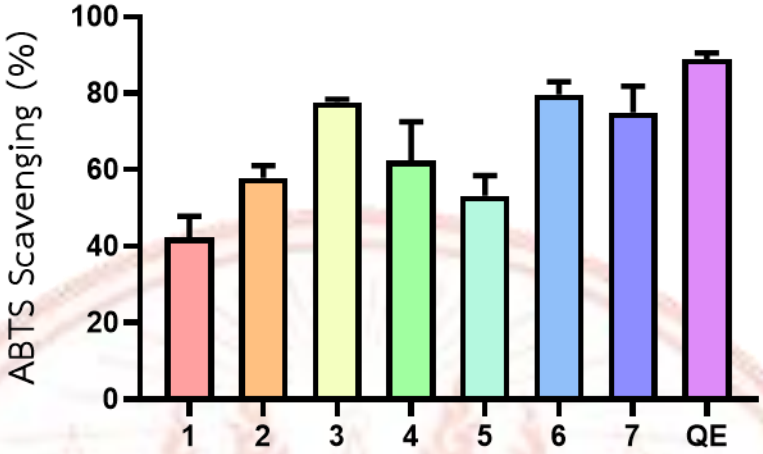
ทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่า butein (**5**) เป็นสารที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในการศึกษานี้



ภาพที่ 4-9 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสาร **1**–**7**

4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าสารที่แยกได้จากดอกทองกวาวส่วนใหญ่แสดงประสิทธิภาพที่สูงกว่าการทดสอบด้วยวิธี DPPH อย่างเห็นได้ชัด โดยมีเพียง medicarpin (**1**) ที่แสดงฤทธิ์ต่ำกว่า 50% ที่ความเข้มข้น 25 µM ในขณะที่สารที่เหลืออีก 6 ชนิด (**2**–**7**) แสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีเกิน 50% ดัง**ภาพที่ 4-10** จึงได้นำไปคำนวณหาค่า IC_{50} ผลการทดลองพบว่า butein (**5**) มีประสิทธิภาพสูงที่สุดอย่างโดดเด่น โดยมีค่า IC_{50} เพียง 1.29 µM ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่าที่เคยมีรายงานในงานวิจัยอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (IC_{50} ≈ 35.6 µM) (Kim et al., 2015) ที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือสารกลุ่มไกลโคไซด์อย่าง iso-butrin (**6**) และ butrin (**7**) ซึ่งแสดงฤทธิ์ต่ำในวิธี DPPH กลับมีประสิทธิภาพสูงมากในการทดสอบนี้ โดยมีค่า IC_{50} ที่ 2.89 µM และ 10.25 µM ตามลำดับ ผลลัพธ์นี้ขัดแย้งกับหลักการทั่วไป แต่สามารถอธิบายได้จากกลไกของ ABTS assay สำหรับสารอื่นๆ เช่น kaempferol (**4**), sulfuretin (**2**), และ liquiritigenin (**3**) ก็แสดงฤทธิ์ในระดับสูงเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} ที่ 7.97, 11.64, และ 13.28 µM ตามลำดับ ซึ่งค่าของ sulfuretin นั้นใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ (13.12 µM) (Dergipark, 2022)

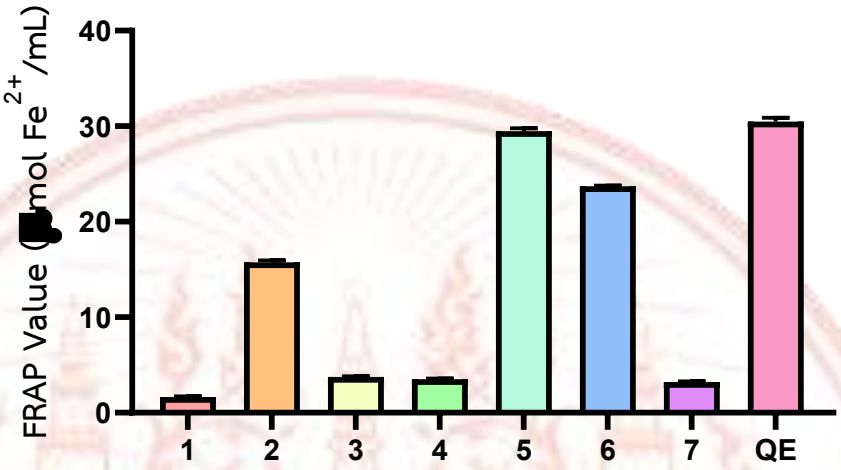


ภาพที่ 4-10 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารที่ **1**–**7**

4.2.3 การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ซึ่งเป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ผ่านกลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอน (Electron Transfer) พบว่าผลการทดลองมีความสอดคล้องกับแนวโน้มที่พบในวิธี ABTS โดยสารที่มีฤทธิ์โดดเด่นคือ butein (**5**), iso-butrin (**6**), และ sulfuretin (**2**) ซึ่งแสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้เท่ากับ 29.48 23.71 และ 15.74 μmol Fe^{2+}/mL ตามลำดับ ตาม**ภาพที่ 4-11** ผลลัพธ์นี้ช่วยยืนยันว่า butein (**5**) คือสารที่มีศักยภาพสูงสุด และที่น่าสนใจคือ butrin (**7**) ซึ่งเป็นสารไกลโคไซด์ก็ยังคงมีฤทธิ์สูงในกลไกที่อาศัยการให้อิเล็กตรอนเช่นกัน ในขณะเดียวกัน สาร medicarpin (**1**) liquiritigenin (**3**) kaempferol (**4**) และ iso-butrin (**6**) ไม่แสดงฤทธิ์ที่สามารถวัดได้ในการทดลองนี้ ผลของ medicarpin และ iso-butrin นั้นสอดคล้องกับการคาดการณ์ตามทฤษฎีที่ว่าสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่น่าประหลาดใจคือการที่ liquiritigenin (**3**) และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง kaempferol (**4**) ไม่แสดงฤทธิ์ในวิธีนี้ ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยจำนวนมาก ที่ยืนยันว่าสารทั้งสองชนิดมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กที่สูง โดยมีรายงานว่า liquiritigenin มีฤทธิ์เทียบเท่ากรดแอสคอร์บิกที่ 42.1 μM (Papoutsis et al., 2018) และ kaempferol มีค่า FRAP สูงถึง 1.71-2.90 mmol TE/g (Sowiński et al., 2021) ความคลาดเคลื่อนนี้อาจเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น ความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างที่ใช้, ความสามารถในการละลายของสารในสภาวะการทดลองที่เป็นกรดของ FRAP assay หรืออาจเป็นปัจจัยทางเทคนิคอื่นๆ ดังนั้น แม้ว่า butein และ iso-butrin จะแสดงศักยภาพที่ชัดเจนในกลไกการ

ให้อิเล็กตรอน แต่การที่สารบางชนิดไม่แสดงฤทธิ์ตามที่คาดการณ์ไว้ ชี้ให้เห็นถึงความซับซ้อนและปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการวัดผลในแต่ละสภาวะการทดลอง



ภาพที่ 4-11 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของสารที่ **1-7**

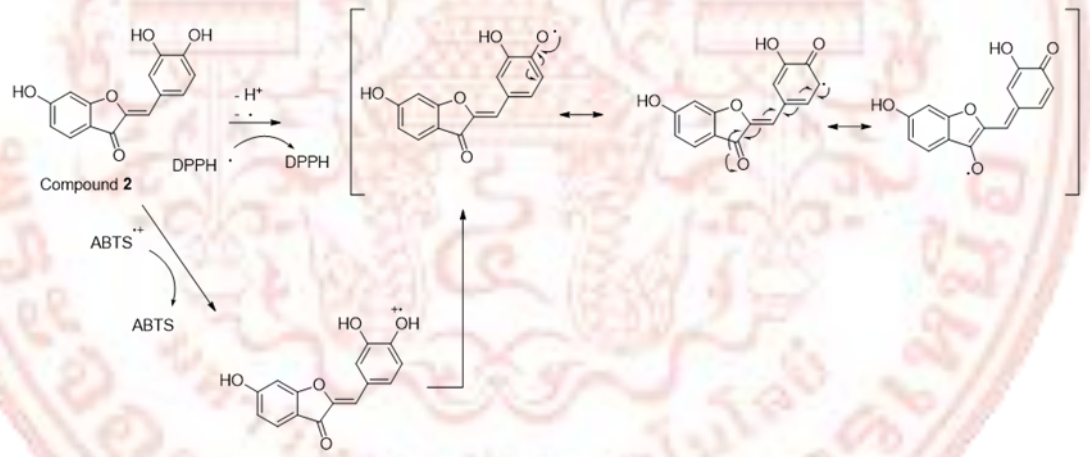
จากข้อมูลการยับยั้งอนุมูลอิสระที่อธิบายข้างต้น โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP สามารถสรุปค่าร้อยละการยับยั้งและ IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ดังแสดงใน**ตารางที่ 4-9**

ตารางที่ 4-9 ตารางสรุปฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

Compound	Antioxidant activity				
	DPPH		ABTS		FRAP
	% scavenging (150 µM)	IC_{50} (µM)	% scavenging (25 µM)	IC_{50} (µM)	µmol Fe^{2+} / mL (1 mM)
1	4.76 ± 1.08	-	42.29 ± 4.56	-	-
2	67.61 ± 0.67	94.50 ± 8.34	57.88 ± 2.67	11.64 ± 1.45	15.74 ± 0.17
3	18.46 ± 0.47	-	77.59 ± 0.68	13.28 ± 7.25	-
4	-5.27 ± 0.64	-	62.46 ± 8.21	7.97 ± 2.95	-
5	79.70 ± 0.20	50.22 ± 6.91	53.22 ± 4.28	1.29 ± 0.41	29.48 ± 0.24
6	0.07 ± 1.45	-	79.73 ± 2.72	2.89 ± 1.10	23.71 ± 0.041
7	-5.56 ± 0.37	-	74.97 ± 5.61	10.25 ± 3.36	-

4.2.4 กลไกการยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสาร sulfuretin (2)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร sulfuretin (**2**) ซึ่งสารนี้โครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่มของสารพอลีฟีนอลิก โดยเฉพาะหมู่ไฮดรอกซิล (–OH) ที่ตำแหน่ง C-3′ และ C-4′ บนวง B (catechol moiety) และที่ตำแหน่ง C-6 บนวง A ซึ่งสามารถให้อะตอมของไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนเพื่อทำให้อนุมูลอิสระ เช่น DPPH• และ $ABTS^{\bullet+}$ มีความเสถียรมากขึ้น ผ่านกลไกการถ่ายโอนอะตอมไฮโดรเจน (HAT) และการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว (SET) ดังแสดงในกลไก**ภาพที่ 4-12** การให้อิเล็กตรอนและโปรตอนเหล่านี้ทำให้เกิดอนุมูลฟีนอกซิล (phenoxyl radical) ซึ่งมีความเสถียรเนื่องจากมีการกระจายอิเล็กตรอนเดี่ยวผ่านการเกิดเรโซแนนซ์ โดยเฉพาะในโครงสร้างของ catechol การเกิดเรโซแนนซ์นี้ช่วยลดความไวในการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่าสาร sulfuretin มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกันกับสาร butein (**5**) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกันกับสาร **2** ดังนั้นการที่ sulfuretin และ butein สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ทั้งในระบบที่มีขั้วในวิธี ABTS และไม่มีขั้วในวิธี DPPH สะท้อนถึงศักยภาพของสารทั้งสองชนิดนี้จะในฐานะที่เป็นสารต้านอนมูลอิสระที่ดี

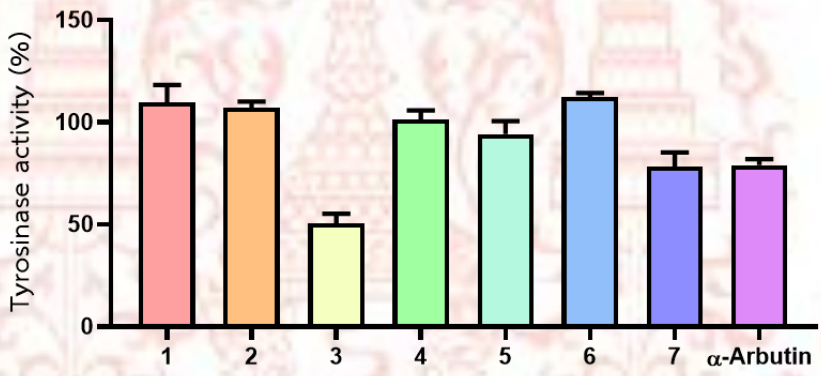


ภาพที่ 4-12 กลไกลการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH• และ $ABTS^{\bullet+}$ ของสาร sulfuretin (**2**)

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร 1–7

ในการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการสร้างเม็ดสีเมลานิน ผ่านวิธี dopachrome assay ผลการทดลองพบว่า liquiritigenin (**3**) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.07 ± 2.58 μM ค่านี้บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพที่สูงมากและสอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่ยืนยันว่า liquiritigenin เป็นสารยับยั้งไทโรซิเนสที่ทรงพลัง โดยมีรายงานค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 8.5 μM ถึง 21.4 μM (Kim et al., 2005; Likhitwitayawuid et al., 2006) ในทางตรงกันข้าม ผลการทดลองของสาร medicarpin (**1**) kaempferol (**4**) และ iso-butrin (**6**) กลับ

แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า 100% ซึ่งอาจเกิดจากการรบกวนการวัดผลเชิงแสง (Assay Interference) (Shoo et al., 2015) โดยสารที่เกิดจากปฏิกิริยาอาจมีสีที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงรวมสูงขึ้นอย่างผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของ kaempferol (**4**) ที่ขัดแย้งกับงานวิจัยอื่นซึ่งระบุว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสได้ สำหรับ sulfuretin (**2**) ผลการทดลองที่แสดงค่ากิจกรรมสูงกว่า 100% นั้น ขัดแย้งโดยตรง กับงานวิจัยของ (Chen et al., 2014) ซึ่งพบว่า sulfuretin สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 13.6 μM ความคลาดเคลื่อนที่ชัดเจนนี้อาจชี้ให้เห็นถึงความซับซ้อนในการทำปฏิกิริยาของ sulfuretin กับส่วนประกอบใน assay หรืออาจเกิดจากความแตกต่างของสภาวะการทดลอง โดยเอนไซม์ที่ใช้มาจากเห็ด ไม่ได้มาจากมนุษย์โดยตรง (Chang et al., 2009)

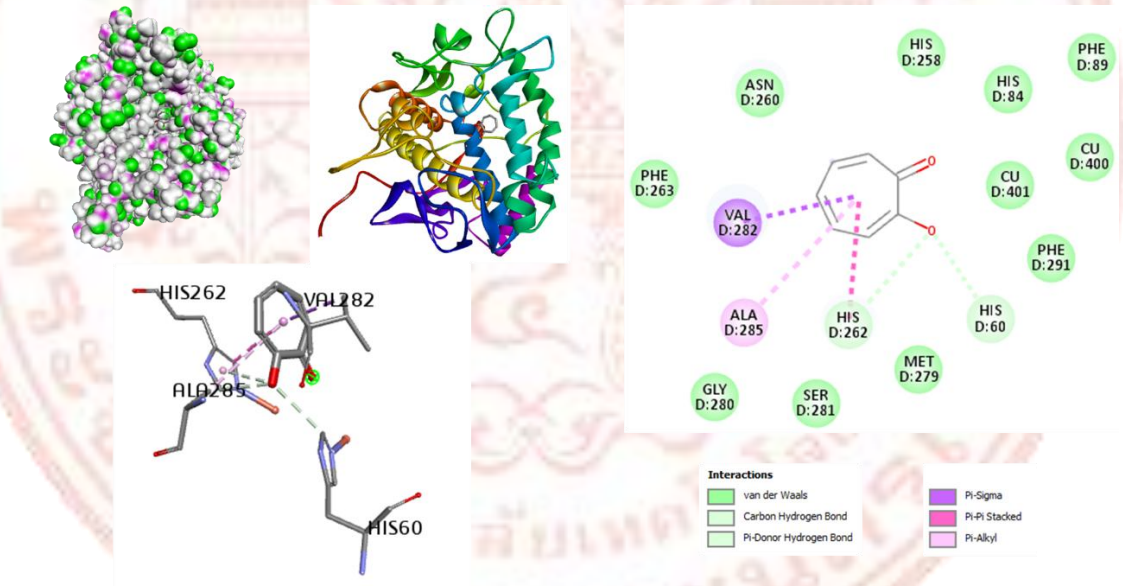


ภาพที่ 4-13 ฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารที่ **1-7**

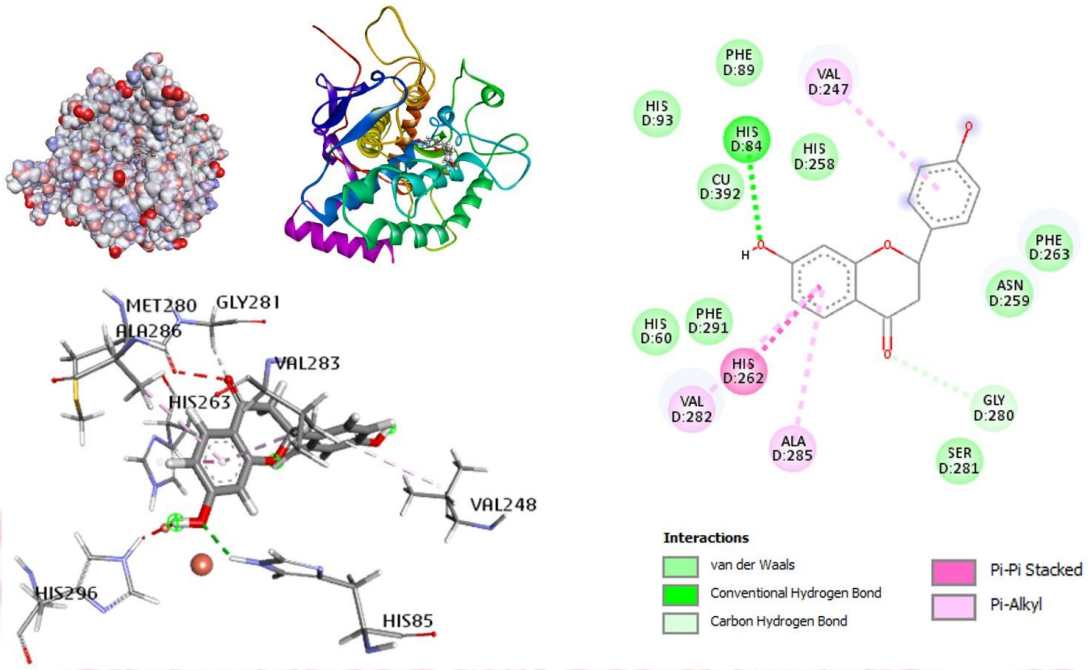
4.4 การจำลองการจับกันของโมเลกุล (Molecular docking simulation) ของสาร 3

เพื่อทำความเข้าใจกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ liquiritigenin (**3**) ในระดับโมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง *in vitro* ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งดีเยี่ยม (IC_{50} = 13.07 μM) จึงได้ทำการศึกษาด้วยเทคนิคการจำลองการจับกันของโมเลกุล (Molecular Docking) ผลการคำนวณค่าพลังงานการจับ (Binding Affinity) ด้วย GOLD fitness score พบว่าสารเชิงซ้อนระหว่าง liquiritigenin และเอนไซม์มีค่าคะแนนสูงถึง 63.08 ซึ่งสูงกว่า tropolone ดัง**ภาพที่ 4-14** ซึ่งเป็นสารยับยั้งมาตรฐาน (45.45) อย่างมีนัยสำคัญ ค่าคะแนนที่สูงนี้บ่งชี้ถึงการเกิดสารเชิงซ้อนที่เสถียรและมีการจับที่จำเพาะเจาะจง ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้การจำลองด้วยคอมพิวเตอร์และยืนยันว่า liquiritigenin สามารถเข้าจับกับบริเวณเร่งของไทโรซิเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อวิเคราะห์อันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์และเอนไซม์ในรายละเอียด พบว่า

liquiritigenin สามารถวางตัวในโพรงของบริเวณเร่ง (Active Site) ได้อย่างเหมาะสม ดัง**ภาพที่ 4-15** โดยอาศัยอันตรกิริยาที่ไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์หลายรูปแบบ โดยมี พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond) เป็นอันตรกิริยาสำคัญระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 4' ของลิแกนด์กับกรดอะมิโน His85 เสริมด้วยอันตรกิริยาแบบพาย-พาย (**π**–**π** Stacking) กับ His263 การมีอันตรกิริยากับกรดอะมิโนฮิสทิดีนซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของบริเวณเร่งนี้ เป็นสิ่งที่พบเห็นได้บ่อยในงานวิจัยการจับของสารยับยั้งไทโรซิเนสอื่น ๆ (Wu et al., 2020) ซึ่งช่วยยืนยันความน่าเชื่อถือของแบบจำลอง นอกจากนี้ยังพบ อันตรกิริยาแบบไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic Interactions) ชนิด **π**-alkyl กับ Val283, Ala286, และ Val248 ซึ่งช่วยยึดเหนี่ยวให้ลิแกนด์อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม ดังนั้น จากการจำลองการจับของโมเลกุลจึงช่วยยืนยันและอธิบายผลจาก *in vitro* ได้ว่า การเกิดอันตรกิริยาที่หลากหลาย ทั้งพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนสำคัญ และแรงยึดเหนี่ยวแบบ **π**–**π** และแบบไม่ชอบน้ำ เป็นกลไกสำคัญที่ทำให้ liquiritigenin เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพสูง



ภาพที่ 4-14 อันตรกิริยาของ Tropolone ภายในบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนส



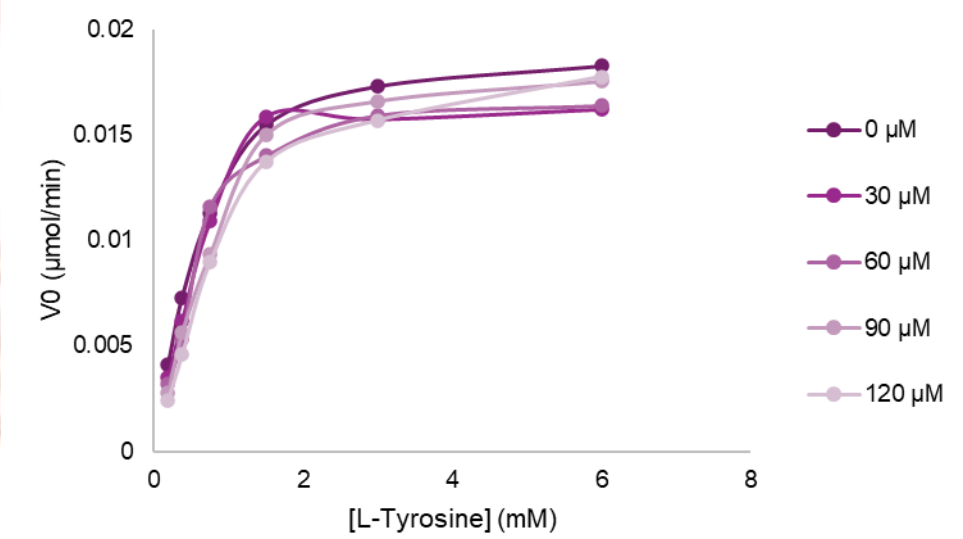
ภาพที่ 4-15 อันตรกิริยาของ liquiritigenin (3) ภายในบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนส

4.5 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของสาร Liquiritigenin (3)

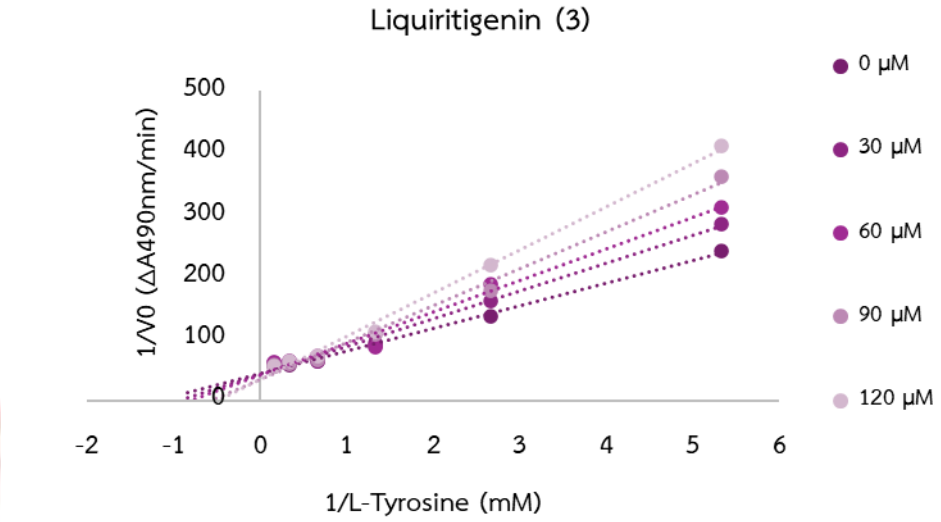
การวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme Kinetics) เป็นกระบวนการที่จำเป็นอย่างยิ่งเพื่อศึกษากลไกการยับยั้ง (Inhibition Mechanism) ของสารออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์เป้าหมาย ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลจลนศาสตร์โดยอาศัยแบบจำลองของ Michaelis-Menten และการพล็อตกราฟแบบ Lineweaver-Burk ซึ่งเป็นเครื่องมือมาตรฐานในการจำแนกประเภทของการยับยั้ง กราฟ Michaelis-Menten แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (V_0) และความเข้มข้นของซับสเตรต ([S]) เพื่อกำหนดค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ ได้แก่ ค่าความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) และค่าคงที่มิคาเอลิส (K_m) ในขณะที่กราฟ Lineweaver-Burk ซึ่งเป็นกราฟส่วนกลับสองส่วน (Double Reciprocal Plot) ของ $1/V_0$ เทียบกับ 1/[S] จะช่วยให้สามารถคำนวณค่า K_m และ V_{max} ได้อย่างแม่นยำ และแสดงผลการยับยั้งในรูปแบบกราฟเส้นตรงที่สามารถจำแนกกลไกได้อย่างชัดเจน โดยประเภทของการยับยั้งที่สำคัญมีดังนี้ 1. การยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive Inhibition) เกิดขึ้นเมื่อสารยับยั้งมีโครงสร้างคล้ายกับซับสเตรตและเข้าแข่งขันเพื่อจับกับบริเวณเร่ง (Active Site) ของเอนไซม์โดยตรง ส่งผลให้ต้องใช้ความเข้มข้นของซับสเตรตสูงขึ้นเพื่อเอาชนะสารยับยั้ง ทำให้ค่า K_m ปรากฏเพิ่มขึ้น แต่จะไม่ส่งผลต่อความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาเมื่อซับสเตรตอิ่มตัว ดังนั้นค่า V_{max} จึงไม่เปลี่ยนแปลง ในทางตรงกันข้าม 2. การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Non-competitive

Inhibition) เกิดจากสารยับยั้งเข้าจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งอื่นซึ่งไม่ใช่บริเวณเร่ง (Allosteric Site) และสามารถจับได้ทั้งกับเอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์ที่จับกับซับสเตรตแล้ว การจับนี้ไม่รบกวนความสามารถในการจับซับสเตรตของเอนไซม์ ค่า K_m จึงคงที่ แต่จะลดประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา ทำให้ค่า V_{max} ลดลง 3. การยับยั้งแบบอันคอมเพทิทีฟ (Uncompetitive Inhibition) ซึ่งเป็นกรณีที่สารยับยั้งจะเข้าจับกับสารเชิงซ้อนเอนไซม์-ซับสเตรต (ES Complex) เท่านั้น การจับนี้ทำให้สารเชิงซ้อนเสถียรขึ้นและเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ยากขึ้น ส่งผลให้ทั้งค่า K_m ปรากฏและค่า V_{max} ลดลง ทั้งคู่

จากการวิเคราะห์กราฟ Michaelis–Menten พบว่าเมื่อมีสาร liquiritigenin (3) ค่า V_{max} คงที่ แต่ K_m เพิ่มขึ้น ดัง**ภาพที่ 4-16** ขณะที่กราฟ Lineweaver–Burk แสดงให้เห็นว่า ความชันของเส้นตรงเพิ่มขึ้นเมื่อมีสาร **3** อยู่ในระบบ ดัง**ภาพที่ 4-17** ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของ competitive inhibition ที่พบในการสร้างกราฟ Lineweaver–Burk ซึ่งค่าต่างๆ ได้สรุปไว้ใน**ตารางที่ 4-10**



ภาพที่ 4-16 กราฟ Michaelis–Menten ของสาร **3**



ภาพที่ 4-17 กราฟ Lineweaver–Burk แสดงการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสาร liquiritigenin ในช่วงความเข้มข้น 30–120 μM โดยใช้ L-tyrosine เป็นซับสเตรตในช่วงความเข้มข้น 0.15–4.8 mM

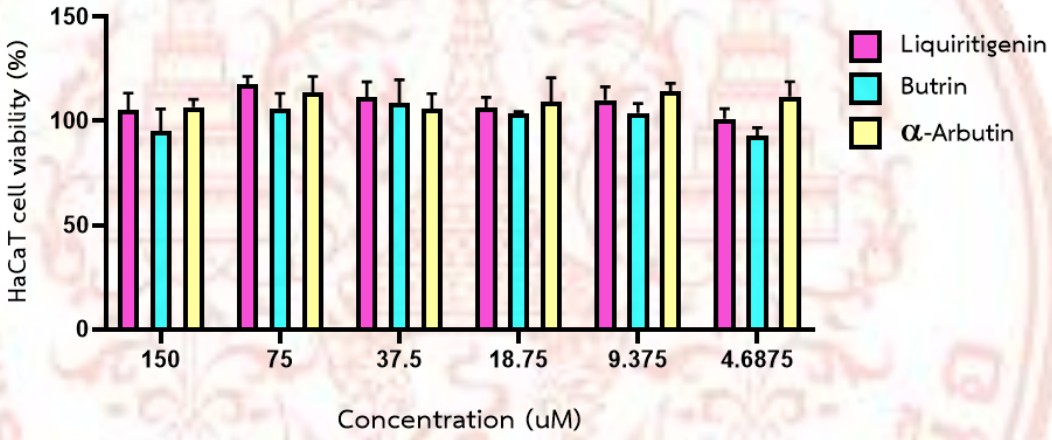
ตารางที่ 4-10 ผลของสาร Liquiritigenin (**3**) ต่อค่าคงที่ทางจลน์ของเอนไซม์ไทโรซิเนส

Compound	Concentration (μM)	K_m (μM)	V_{max} (ΔA490/นาที)	ประเภทการยับยั้ง
Liquiritigenin	0	0.88 ± 0.032	0.0244 ± 0.00088	ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน
	30.00	1.24 ± 0.087	0.0272 ± 0.0011	
	60.00	1.40 ± 0.021	0.0272 ± 0.00064	
	90.00	1.82 ± 0.045	0.0315 ± 0.00045	
	120.00	2.64 ± 0.39	0.0355 ± 0.0038	

4.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (Cytotoxicity on keratinocyte cell) ของสาร 3

การประเมินความปลอดภัยของสารต่อเซลล์ผิวหนังโดยตรงผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เคอราติโนไซต์ (HaCaT) ผลการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า liquiritigenin ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบตั้งแต่ 4.68 ถึง 150 μM ผลลัพธ์นี้มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากความเข้มข้นที่สารแสดงฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสได้อย่างมีนัยสำคัญ (IC_{50} = 13.07 μM) นั้น

ต่ำกว่าช่วงความเข้มข้นที่ไม่แสดงความเป็นพิษอยู่มาก ดัง**ภาพที่ 4-18** ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่ยืนยันถึงความปลอดภัยของ liquiritigenin ต่อเซลล์ผิวหนังหลายชนิด โดยมักไม่พบความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญในระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการออกฤทธิ์ (Kim et al., 2018) ทั้งนี้ การทดลองได้ใช้ α-arbutin เป็นสารเปรียบเทียบ และไม่ได้ทำการทดสอบสารประกอบอื่นเนื่องจากไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสที่น่าสนใจในการทดลองก่อนหน้า ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า liquiritigenin (**3**) ไม่เพียงแต่เป็นสารยับยั้งไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ยังมีความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนัง

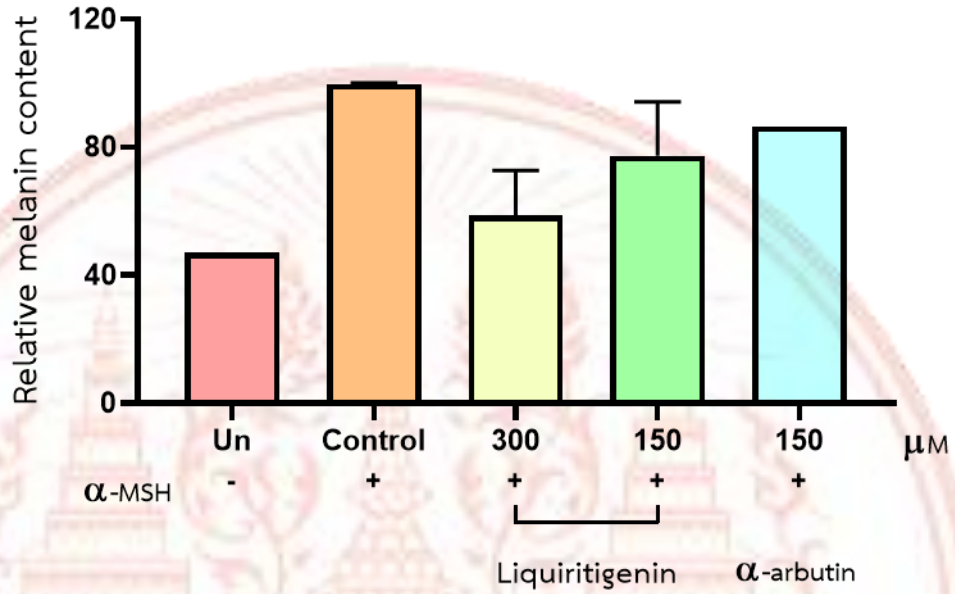


ภาพที่ 4-18 การรอดชีวิตของเซลล์ผิวหนัง (HaCaT cell)

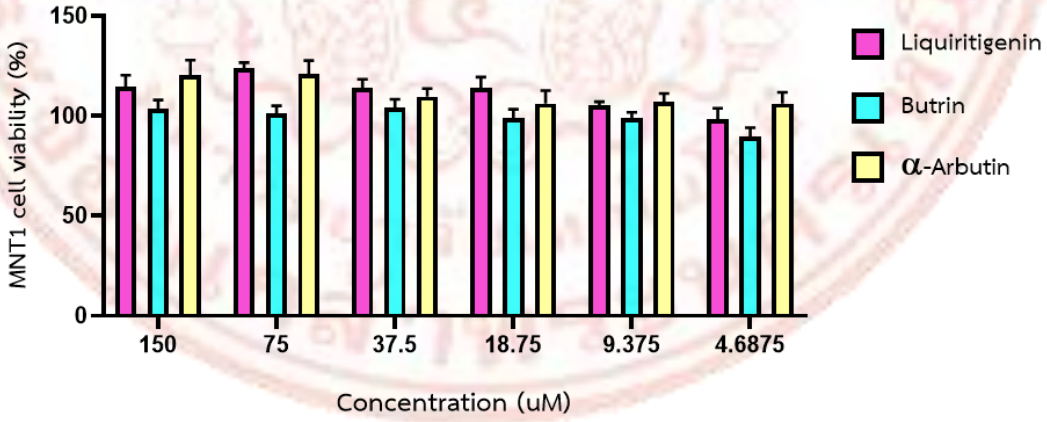
4.8 การทดสอบการยับยั้งการลดเม็ดสีชนิด MNT-1 ของสาร 3

เพื่อประเมินประสิทธิภาพการลดการสร้างเม็ดสีในระดับเซลล์โดยตรง โดยใช้เซลล์ผลิตเม็ดสี (MNT-1) ผลการทดลองพบว่า liquiritigenin สามารถลดปริมาณเม็ดสีเมลานินได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยลดลง 22% ที่ความเข้มข้น 150 μM และลดลงถึง 41% ที่ความเข้มข้น 300 μM ซึ่งประสิทธิภาพในการลดเม็ดสีนี้สูงกว่าสารมาตรฐาน α-Arbutin ผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านการสร้างเม็ดสีของ liquiritigenin ในเซลล์เพาะเลี้ยง (Choi et al., 2017) การศึกษานี้จึงเป็นการยืนยันว่า liquiritigenin (**3**) ที่ความเข้มข้น 150 μM และ 300 μM ซึ่งแสดงฤทธิ์ลดเม็ดสีได้อย่างชัดเจนนั้น **ดังภาพที่ 4-19** ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ MNT-1 **ดังภาพที่ 4-20** จากการทดสอบด้วยวิธี MTT ซึ่งเป็นการตอกย้ำถึงความปลอดภัยของสาร ดังนั้น การศึกษานี้จึงเป็น

การยืนยันว่า liquiritigenin (**3**) มีคุณสมบัติครบถ้วนในการเป็นสารทำให้ผิวขาว (Whitening Agent) ที่มีศักยภาพ



ภาพที่ 4-19 การลดลงของเม็ดสีเมลานินในเซลล์เม็ดสี MNT-1 ของสาร 3



ภาพที่ 4-20 การรอดชีวิตของเซลล์เม็ดสีเมลาโนไซต์ (MNT-1)

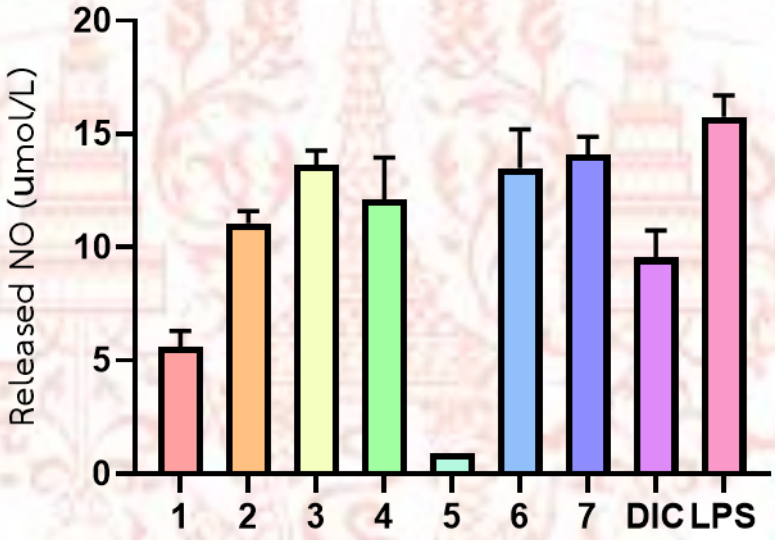
4.8.1 ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ flavonoid จากทองกวาว

การเปรียบเทียบสาร liquiritigenin (**3**) ที่แยกได้จากดอกทองกวาวในการศึกษานี้ กับสาร isoliquiritigenin ที่รายงานโดย (Nerya et al., 2003) ให้ข้อมูลสำคัญเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการออกฤทธิ์ (Structure-Activity Relationship) ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งสองสารมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันและแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับไมโครโมลาร์ที่ใกล้เคียงกัน (liquiritigenin มี IC_{50} = 13.07 μM และ isoliquiritigenin มี IC_{50} = 8.1 μM) อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างที่สำคัญอยู่ที่กลไกการยับยั้ง ซึ่งเชื่อมโยงโดยตรงกับโครงสร้างทางเคมีของแต่ละสาร จากการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่า liquiritigenin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาวาโนน (flavanone) ที่มีวงแหวน C แบบปิด จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) โดยเข้าจับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยตรง ในขณะที่ isoliquiritigenin ซึ่งเป็นชาลโคน (chalcone) ที่มีโครงสร้างวงแหวน C แบบเปิด กลับออกฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งแบบผสม (mixed inhibitor) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแม้จะเป็นความแตกต่างเพียงเล็กน้อยทางโครงสร้าง แต่สามารถส่งผลกระทบต่อกลไกการออกฤทธิ์ได้อย่างชัดเจน

4.9 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation)

เพื่อประเมินศักยภาพในการต้านการอักเสบ ได้มีการทดสอบความสามารถของสารตัวอย่างในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ผลการทดลองพบว่าสารประกอบทั้ง 7 ชนิดสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดยสารที่มีฤทธิ์โดดเด่นที่สุดคือ butein (**5**) ซึ่งแสดงการยับยั้งได้สูงถึง 94.23% ตามมาด้วย medicarpin (**1**) ที่มีร้อยละการยับยั้ง 64.42% ซึ่งสารทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพสูงกว่ายาต้านการอักเสบมาตรฐานอย่าง diclofenac ที่ยับยั้งได้เพียง 39.42% **ดังภาพที่ 4-21** ในสภาวะการทดลองเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ประสิทธิภาพที่โดดเด่นของ butein (**5**) นี้สอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่ยืนยันว่า butein เป็นสารต้านการอักเสบที่ทรงพลัง โดยมีรายงานค่า IC_{50} ในการยับยั้ง NO อยู่ที่ 10.9 μM (Geronikaki et al., 2016) ซึ่งเป็นการยืนยันศักยภาพของสารนี้ได้อย่างชัดเจน สำหรับ medicarpin (**1**) ซึ่งมีฤทธิ์ดีเป็นอันดับสองนั้น ก็มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการผลิต NO ได้เช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} ที่ 24.1 μM (Yin et al., 2015) สำหรับสารอื่น ๆ ที่แสดงฤทธิ์ในระดับปานกลาง เช่น sulfuretin (**2**) liquiritigenin (**3**) และ kaempferol (**4**) ก็มีงานวิจัยที่รายงานค่า IC_{50} อยู่ที่ 17.6 μM 22.4 μM และ 11.5 μM ตามลำดับ (Lee et al., 2014; Kim et al.,

2005; Park et al., 2011) ในขณะที่สารกลุ่มไกลโคไซด์อย่าง iso-butrin (**6**) และ butrin (**7**) แสดงฤทธิ์ต่ำที่สุด ซึ่งเป็นไปตามที่คาดการณ์ได้ กลไกต้านการอักเสบของสารกลุ่มฟีนอลิกเหล่านี้มีความเชื่อมโยงอย่างใกล้ชิดกับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) สามารถกำจัดอนุมูลอิสระและลดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบและการผลิต NO ที่มากเกินไปได้ (Pham-Huy et al., 2008; Yahfoufi et al., 2018) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า butein (**5**) และmedicarpin (**1**) เป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการต้านการอักเสบ



ภาพที่ 4-21 ปริมาณไนตริกออกไซด์ (NO) ที่ถูกปล่อยออกมาโดยใช้สารที่ความเข้มข้น 150 μM

4.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารที่ 1–7

ในการประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดต่อเชื้อที่พบได้บนผิวหนัง 4 สายพันธุ์ด้วยวิธี disc diffusion assay โดยที่ความเข้มข้น 50 μM ไม่พบว่ามีสารประกอบใดเลยในกลุ่ม **1**–**7** ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* ซึ่งได้แก่ *S. aureus* ATCC10832 *S. aureus* ATCC43300 และ *S. epidermidis* ได้ ในทางตรงกันข้าม สารประกอบ 4 ชนิดกลับแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* ซึ่งเป็นเชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดสิวได้อย่างชัดเจน โดยสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ liquiritigenin (**3**) ซึ่งให้ขนาดของบริเวณยับยั้ง (Inhibition Zone) ที่ 1.4 mm ตามมาด้วย medicarpin (**1**) (1.2 mm) และ sulfuretin (**2**) กับ butein (**5**) (1.0 mm) ดัง **ตารางที่ 4-11** ผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่ชี้ว่าสารฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนอยด์

หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *C. acnes* ได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* ซึ่งอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์หรือกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียแต่ละชนิด (Kim et al., 2008) แม้ว่าประสิทธิภาพของสารเหล่านี้จะยังไม่เทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะมาตรฐานอย่าง ampicillin แต่การที่สามารถยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้อย่างจำเพาะโดยไม่ส่งผลกระทบต่อเชื้อประจำถิ่นกลุ่ม *Staphylococcus* ในสภาวะการทดลองนี้ ถือเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่า liquiritigenin (**3**) และ medicarpin (**1**) มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป

ตารางที่ 4-11 ค่าความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (clear zone)

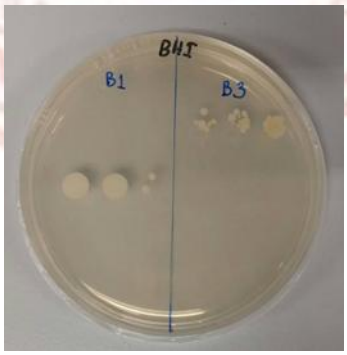
Strains	Antibacterial activity (mm.)							
	1	2	3	4	5	6	7	AMP
	Diameter							
***S. aureus* ATCC 10832**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6.0
***S. aureus* ATCC 43300**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.0
S. epidermidis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.5
C. acnes	1.2	1.0	1.4	ND	1.0	ND	ND	2.5

จากผลการทดสอบเบื้องต้นที่พบว่าสารบางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) จึงได้ดำเนินการประเมินประสิทธิภาพเชิงปริมาณโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) โดยใช้วิธี broth dilution ผลการทดลองพบว่า medicarpin (**1**) แสดงศักยภาพสูงที่สุดในการต้านเชื้อ *C. acnes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 30 µM (ประมาณ 8.1 µg/mL) และค่า MBC เท่ากับ 50 µM ดัง**ภาพที่ 4-22** ขณะที่ sulfuretin (**2**) แสดงฤทธิ์ในระดับปานกลาง โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 µM และไม่สามารถหาค่า MBC ได้ภายในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (MBC > 50 µM) ในทางกลับกัน liquiritigenin (**3**) และ butein (**5**) ซึ่งเคยแสดงผลยับยั้งได้ดีในการทดสอบแบบ disc diffusion กลับไม่สามารถหาค่า MIC ได้ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ (MIC > 50 µM) ความไม่สอดคล้องกันระหว่างผลการทดสอบทั้งสองวิธี อาจมีสาเหตุจากคุณสมบัติทางกายภาพของสาร เช่น ความสามารถในการละลายในอาหารเลี้ยง

เชื้อชนิดเหลว หรือความสามารถในการแพร่กระจายผ่าน medium ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพของสาร (Balouiri et al., 2016) จากผลการทดลองพบว่า medicarpin (**1**) มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้สูงกว่า sulfuretin (**2**) และ butein (**5**) อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงใน**ตารางที่ 4-12** อย่างไรก็ตาม แม้สาร **2 3** และ **5** จะมีฤทธิ์ยับยั้งในระดับหนึ่งจากการทดสอบเบื้องต้น แต่ไม่สามารถกำหนดค่า MIC ได้ จึงไม่มีการดำเนินการทดสอบค่า MBC ต่อไป เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้า พบว่า medicarpin (**1**) เคยแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ได้ดี โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 25–50 µg/mL (Dastidar et al., 2006) สำหรับ liquiritigenin (**3**) งานวิจัยของ (Tsukiyama et al., 2002) รายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง *C. acnes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.13 µg/mL ขณะที่ kaempferol (**4**) สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 62.5 µg/mL (Serrano et al., 2013) และยับยั้ง *C. acnes* ได้ในช่วงค่า MIC 25–50 µg/mL (Batubara et al., 2015) สำหรับ butein (**5**) รายงานโดย (Basri et al., 2012) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.19 µg/mL ทั้งนี้ จากการทบทวนงานวิจัยในปัจจุบัน ยังไม่พบรายงานที่ชัดเจนเกี่ยวกับค่า MIC และ MBC ของ medicarpin (**1**) ต่อเชื้อ *C. acnes*

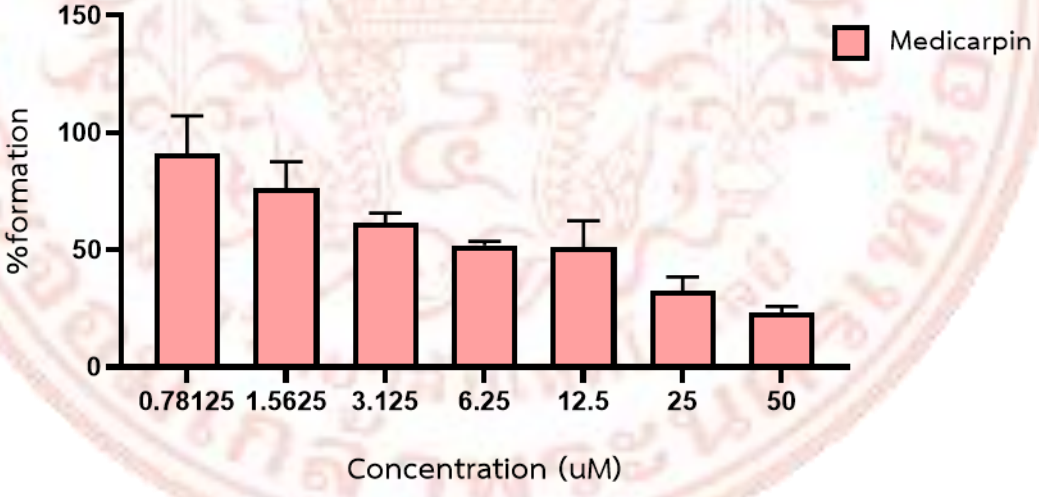
ตารางที่ 4-12 ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและฆ่าแบคทีเรีย

Strain	Antibacterial activity (µM)									
	1		**2**		**3**		**4**		**5**	
C. acnes	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
	30	50	50	>50	>50	-	>50	-	>50	-

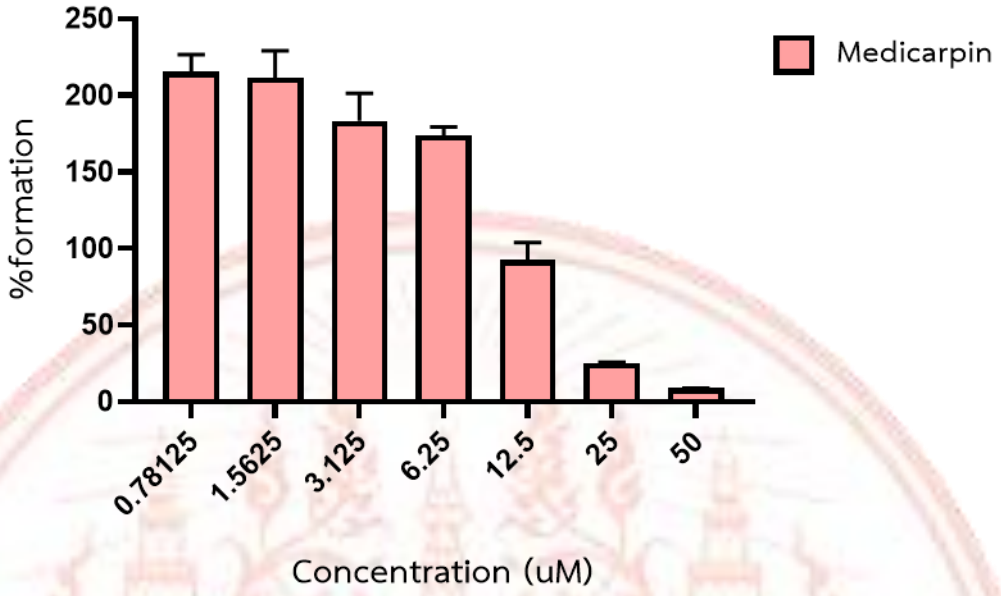


ภาพที่ 4-22 MBC ของสาร 1 และ 3 ต่อเชื้อ C. acnes

การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการก่อโรคของแบคทีเรีย ผลการทดลองที่น่าสนใจที่สุดคือ medicarpin (**1**) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ATCC 10832 ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดยลดการก่อตัวของไบโอฟิล์มได้ถึง 91.15% (เหลือเพียง 8.85%) ที่ความเข้มข้น 50 μM ดัง**ภาพที่ 4-24** แม้ว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้จะไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในรูปแพลงก์ตอน (planktonic cells) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Lee et al., 2018) ที่พบว่า medicarpin สามารถรบกวนระบบ Quorum Sensing ที่ชื่อว่า agr ใน *S. aureus* ได้จริง ส่งผลให้การสร้างไบโอฟิล์มลดลงโดยไม่กระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ นอกจากนี้ medicarpin (**1**) ยังสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *C. acnes* ได้ดีเช่นกัน โดยลดการก่อตัวลง 76.80% (เหลือ 23.20%) ดัง**ภาพที่ 4-23** ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญที่พบก่อนหน้านี้ กลไกในระดับโมเลกุลที่ทำให้ medicarpin (**1**) สามารถรบกวนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเหล่านี้ได้นั้น อธิบายได้จากโครงสร้างที่เหมาะสม ทั้งหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่สร้างพันธะไฮโดรเจน วงแหวนอะโรมาติกที่เกิดอันตรกิริยาแบบ **π–π** stacking และหมู่เมทอกซี (-OCH3) ที่ช่วยปรับคุณสมบัติการละลาย (Xu et al., 2024)



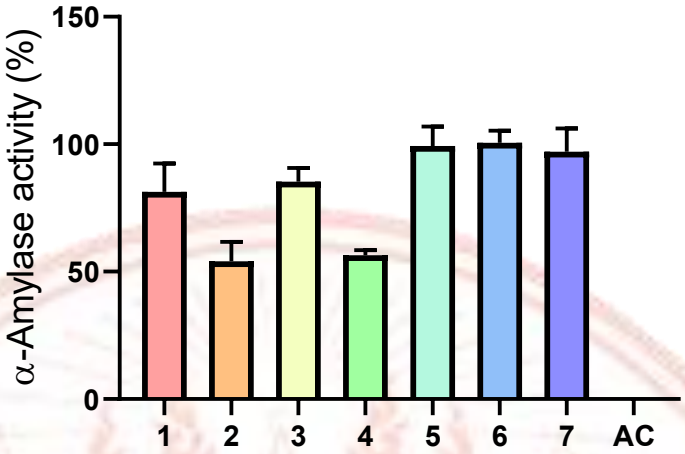
ภาพที่ 4-23 การก่อตัวไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *C. acnes* ของสาร medicarpin (**1**)



ภาพที่ 4-24 การก่อตัวไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 10832 ของสาร medicarpin (**1**)

4.11 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสของสาร 1-7

การประเมินฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายสำคัญในการชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรต ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 100 µM สารประกอบทั้ง 7 ชนิด ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 50% ดัง**ภาพที่ 4-25** ผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่ยืนยันว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เหล่านี้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสในระดับต่ำถึงปานกลาง และมักจะต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงมากในการออกฤทธิ์ ตัวอย่างเช่น kaempferol (**4**) มีรายงานค่า IC_{50} ที่ 295.5 µM และ butein (**5**) มีค่า IC_{50} ที่ 248.2 µM (Naz et al., 2017) ในขณะที่ liquiritigenin (**3**) แสดงฤทธิ์ที่อ่อนมาก โดยมีค่า IC_{50} สูงกว่า 1000 µg/mL (หรือ >3900 µM) (Tadera et al., 2006) สำหรับสารอื่น ๆ เช่น sulfuretin (**2**) และ medicarpin (**1**) มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์นี้อยู่น้อยมาก



ภาพที่ 4-25 ฤทธิ์การต้านเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสของสารที่ **1–7**

4.12 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสาร 6 ชนิดต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ดัง**ตารางที่ 4-13** พบว่า butein แสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเซลล์ HCT116 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.21 µM ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ (Yadav et al., 2011) ที่ระบุค่าประมาณ 25 µM และยังแสดงฤทธิ์ในระดับปานกลางต่อเซลล์ HeLa (IC_{50} = 38.24 µM) สอดคล้องกับแนวโน้มในรายงานก่อนหน้า สำหรับ sulfuretin พบว่ามีฤทธิ์สูงต่อเซลล์ HCT116 (IC_{50} = 27.53 µM) ใกล้เคียงกับค่าที่รายงานโดย (Lee et al., 2014) แต่กลับแสดงฤทธิ์ต่ำมากต่อเซลล์ HeLa (IC_{50} > 50 µM) ซึ่งอาจแสดงถึงความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเซลล์มะเร็ง ขณะที่ butrin ซึ่งเป็นสารกลูโคไซด์ของ butein แสดงฤทธิ์ปานกลางต่อเซลล์ HeLa (IC_{50} = 34.19 µM) แต่มีฤทธิ์ต่ำต่อเซลล์ HCT116 (IC_{50} > 50 µM) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับหลักการทั่วไปที่ aglycone มักมีฤทธิ์สูงกว่ารูปแบบ glycoside (Xiao et al., 2017) สำหรับ kaempferol พบว่าแสดงฤทธิ์ปานกลางต่อเซลล์ HeLa (IC_{50} = 38.47 µM) ใกล้เคียงกับรายงานของ (Luo et al., 2011) ที่ระบุค่า IC_{50} เท่ากับ 35.6 µM แต่กลับไม่มีผลต่อเซลล์ HCT116 (IC_{50} > 50 µM) เช่นเดียวกับ sulfuretin ที่แสดงความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเซลล์ ส่วน liquiritigenin และ medicarpin พบว่าทั้งสองสารมีฤทธิ์ต่ำต่อเซลล์ทั้งสองชนิด โดย IC_{50} ต่อเซลล์ HCT116 มีค่ามากกว่า 50 µM ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า โดย (Jo et al., 2014) รายงานว่า liquiritigenin มีค่า IC_{50} ต่อ HCT116 มากกว่า 100 µM และ (Khan et al., 2017) รายงานว่า medicarpin มีค่า IC_{50} ประมาณ 75 µM ส่วนผลต่อเซลล์

HeLa ของทั้งสองสารก็อยู่ในระดับต่ำเช่นกัน (IC_{50} > 50 μM) แสดงถึงศักยภาพที่จำกัดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งภายใต้สภาวะการทดลองนี้

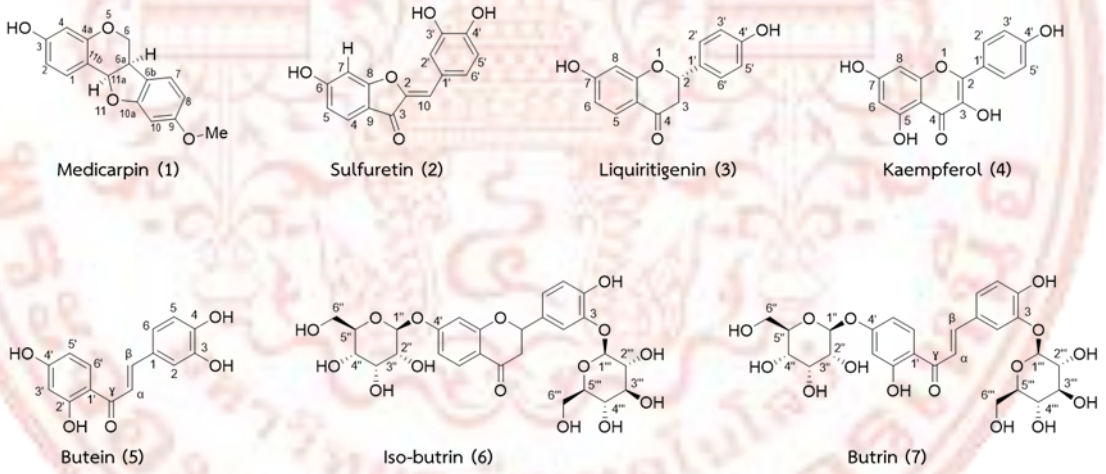
ตารางที่ 4-13 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HCT116) และเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (HeLa) ของสารที่ **1**–**7**

สาร	IC_{50} (μM)	
	HeLa	HCT-116
1	87.58 ± 8.74	81.85 ± 3.91
2	61.72 ± 0.66	27.53 ± 1.94
3	70.23 ± 1.64	81.62 ± 1.13
4	38.47 ± 0.49	87.37 ± 4.25
5	38.24 ± 3.80	21.21 ± 9.48
6	34.19 ± 1.10	70.97 ± 5.95
Doxorubicin	0.12 ± 0.00	0.63 ± 0.27

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาทางพฤกษเคมีของดอกทองกวาว (*Butea monosperma*) สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 7 ชนิด ประกอบด้วย medicarpin (**1**) sulfuretin (**2**) liquiritigenin (**3**) kaempferol (**4**) butein (**5**) iso-butrin (6) และ butrin (**7**) (**ภาพที่ 5.1**) โดยวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี NMR และวิเคราะห์โครงสร้างสามมิติสัมบูรณ์โดยการเปรียบเทียบค่า optical rotation ของสารที่แยกได้กับโครงสร้างที่มีรายงานมาก่อนหน้า สารทั้งหมดพบว่ามีการรายงานในพืชชนิดนี้มาก่อน แต่พบว่าสาร **1** และ **4** รายงานการค้นพบครั้งแรกในดอกดของทองกวาวในงานวิจัยนี้



ภาพที่ 5-1 สารทั้งหมดที่แยกได้จากดอกทองกวาว

ในการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS พบว่าสาร 5 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และสาร **2** และ **6** แสดงฤทธิ์ที่ดีในวิธี FRAP และสารส่วนมากแสดงฤทธิ์ที่ดีมากในการทดสอบด้วยวิธี ABTS ยกเว้นสาร **1** การประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารต่อความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส การลดเม็ดสีดำโดยใช้เซลล์ MNT-1 การยับยั้งการอักเสบโดยทดสอบการลดลงของไนตริกออกไซด์ และการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* พบว่าสาร **3** แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้อย่างมีนัยสำคัญ และพบการยับยั้งในลักษณะ competitive โดยยืนยันด้วยการทดลองทาง

จลนพลศาสตร์ และการทดลองทางคอมพิวเตอร์ (*silico* method) ซึ่งสารนี้ยังแสดงการลดเม็ดสีดำได้ดีใกล้เคียงกับสารมารตฐาน α-arbutin ซึ่งไม่แสดงความเป็นต่อเซลล์ที่ทดสอบ ส่วนสาร **1** พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. acnes* ได้ดี และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของทั้ง *S. aureus* และ *C. acnes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกเหนือจากนั้นยังบพว่าสาร **5** มีการยับยั้งการอักเสบได้ดีตามด้วยสาร **1** ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีกว่ายา diclofenac ซึ่งเป็นยาที่ใช้ลดการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งพบว่าสาร **4–6** มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด HeLa ในระดับปานกลาง ส่วนในเซลล์มะเร็งชนิด HCT116 สาร **2** และ **5** แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในระดับปานกลางเช่นกัน ขณะที่สารอื่นมีค่า IC_{50} > 50 μM จากผลการทดลองของงานวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่าพบสารจากดอกทองกวาวแสดงศักยภาพที่น่าสนใจในหลากหลายด้าน ทั้งการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารลดรอยดำ สารต้านการอักเสบ สารต้านเชื้อแบคทีเรีย และสารต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถต่อยอดและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเภสัชกรรมได้อย่างหลากหลายและมีคุณค่าเชิงเศรษฐกิจในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 สำหรับ biofilm formation ควรศึกษา Scanning electron microscope SEM เพิ่มเติมเพื่อให้แน่ใจว่าแบคทีเรียมีการสร้างไบโอฟิล์มจริง

บรรณานุกรม

Ahmed, F. A., & Kabir, H. (2016). Ethnomedicinal value, phytochemical composition and bioactivity of Butea monosperma (Lam.) Taub. Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences, 4(2), 19–29.

Al-Maharik, N., Al-Rehaily, A. J., & Abdel-Kader, M. S. (2012). Antioxidant pterocarpan analogues from Tephrosia apollinea. Journal of Natural Products, 75(11), 1964–1968.

Al-Rifai, A., Aqel, A., Awaad, A., & ALOthman, Z. A. (2015). Analysis of quercetin and kaempferol in an alcoholic extract of Convolvulus pilosellifolius using HPLC. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 46(11), 1411–1418.

Andrä, J., Lohner, K., Blondelle, S. E., Jerala, R., Moriyon, I., Koch, M. H., Garidel, P., & Brandenburg, K. (2005). Enhancement of endotoxin neutralization by coupling of a C12-alkyl chain to a lactoferricin-derived peptide. The Biochemical Journal, 385(Pt 1), 135–143.

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology Advances, 33(8), 1582–1614.

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. Nature Reviews Drug Discovery, 20(3), 200–216.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2), 71–79.

Bangar, S. P., Chaudhary, V., Sharma, N., Bansal, V., Ozogul, F., & Lorenzo, J. M. (2023). Kaempferol: A flavonoid with wider biological activities and its applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 63(28), 9580–9604.

Basri, D. F., Fan, S. H., & Zin, N. M. (2012). The potential of aqueous and acetone extracts of Vatica pauciflora as antibacterial agents. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4(3), 578-581.

Batubara, I., Wahyuni, W. T., & Firdaus, I. (2015). Anti-acne properties of Cassia fistula L. flowers. Indonesian Journal of Pharmacy, 26(2), 116-121.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, 28(1), 25–30.

Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. International Journal of Molecular Sciences, 10(6), 2440–2475.

Chang, T.-S. (2012). Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. Materials, 5(8), 1661–1685.

Chen, H., Wang, C., Ye, J., Zhou, H., & Tao, R. (2016). Isolation of sulfuretin and butin from Rhus verniciflua Stokes using medium-pressure liquid chromatography and their tyrosinase inhibitory effects. BioResources, 11(1), 759-771.

Chen, Q. X., Zheng, Z. P., & Wang, H. X. (2014). Inhibitory effects of sulfuretin on mushroom tyrosinase. Journal of the American Oil Chemists' Society, 91(7), 1251–1257.

Choi, J. H., Choi, J. N., Lee, S. Y., Lee, S. J., Kim, K., & Kim, Y. K. (2010). Inhibitory activity of diacylglycerol acyltransferase by glabrol isolated from the roots of licorice. Archives of Pharmacal Research, 33(2), 237–242.

Choi, M. Y., Lin, Y. J., & Lee, Y. M. (2017). Liquiritigenin inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells by downregulating the MITF and CREB signaling pathways. Molecules, 22(10), 1640.

Chokchaisiri, R., Suaisom, C., Sriphota, S., Chindaduang, A., Chuprajob, T., & Suksamrarn, A. (2009). Bioactive flavonoids of the flowers of Butea monosperma. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 57(4), 428–432.

Cui, L., Wang, H., & Liu, C. (2009). Inhibition of mushroom tyrosinase by kaempferol. Food Chemistry, 114(1), 130–133.

D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. International Journal of Molecular Sciences, 14(6), 12222–12248.

Dastidar, S. G., Manna, A., Kumar, K. A., Mazumdar, K., Dutta, N. K., & Chakrabarty, A. N. (2006). In vitro and in vivo activity of medicarpin, a phytoalexin, against sensitive and resistant strains of Neisseria gonorrhoeae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(4), 985–988.

Dessinioti, C., & Katsambas, A. D. (2017). The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: facts and controversies. Clinics in Dermatology, 35(2), 127–133.

Geronikaki, A., Gavalas, A., & Eleftheriou, P. (2016). Chalcones and their potential role in inflammation. European Journal of Medicinal Chemistry, 123, 254–271.

Gou, S. H., He, M., Li, B. B., Zhu, N. Y., & Ni, J. M. (2020). Hepatoprotective effect of total flavonoids from Glycyrrhiza uralensis Fisch in liver injury mice. Natural Product Research, 35(24), 6083–6087.

Ikewuchi, J. C., Ikewuchi, C. C., Igboh, N. M., & Mark-Balm, T. (2011). Protective effect of aqueous extract of the rhizomes of Sansevieria liberica Gérôme and Labroy on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. EXCLI Journal, 10, 312–321.

Iwashina, T., Ochiai, Y., & Ootani, S. (2021). Flavonoids in the flowers of Butea monosperma. Natural Product Communications, 16(9).

Jo, E. H., Kim, N. H., & Lee, Y. S. (2014). Liquiritigenin induces apoptosis and inhibits the metastatic potential of human colon cancer cells. Molecular Medicine Reports, 10(2), 787–792.

Jung, M. J., Chung, H. Y., Kang, S. S., Choi, J. H., Bae, K. S., & Choi, J. S. (2003). Antioxidant activity from the stem bark of Albizzia julibrissin. Archives of Pharmacal Research, 26(6), 458–462.

Kavaz, A., Işık, M., Dikici, E., & Yüksel, M. (2022). Anticholinergic, antioxidant, and antibacterial properties of Vitex agnus-castus L. seed extract: Assessment of its phenolic content by LC/MS/MS. Chemistry & Biodiversity, 19(10), e202200143.

Khan, N., Adhami, V. M., & Mukhtar, H. (2017). Medicarpin, a natural pterocarpan, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer cells. Phytomedicine, 33, 15–22.

Khade, S. W., Nandre, V. S., & Jagtap, V. A. (2007). A review on Butea monosperma (Lam.) Taub. Pharmacognosy Reviews, 1(2), 335-340.

Kim, D. H., Kim, B. G., & Park, K. M. (2005). Liquiritigenin, a flavonoid from Glycyrrhiza uralensis, inhibits melanogenesis in B16 melanoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 335(2), 546–553.

Kim, H., Kim, S. Y., & Lee, J. W. (2008). Flavonoids from the roots of Glycyrrhiza uralensis with inhibitory effects on acne-inducing bacteria. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 51(4), 336-340.

Kim, H., Lee, M. H., & Kim, Y. J. (2018). Liquiritigenin, a flavonoid from Glycyrrhiza uralensis, protects human keratinocytes against ultraviolet B-induced photoaging. Biomolecules & Therapeutics, 26(3), 297–304.

Kim, S. J., Park, S. N., & Kim, D. H. (2015). Antioxidant and skin-whitening effects of butein isolated from Rhus verniciflua. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 58(3), 429-436.

Kong, L., Zhang, Y., Pan, X., Tan, R., & Cheng, C. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from Sinofranchetia chinensis. Cellular and Molecular Life Sciences, 57, 500–505.

Kumar, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011). Enzymes inhibition and antidiabetic effect of some medicinal plants. Journal of Pharmacy Research, 4(8), 2469-2472.

Kuo, W. L., Chen, C. C., Chang, P. H., Cheng, L. Y., Shien, B. J., & Huang, Y. L. (2007). Flavonoids from Guizotia abyssinica. Journal of Chinese Medicine, 18(2), 121–128.

Lee, J., & Hyun, C. G. (2023). Natural products for cosmetic applications. Molecules, 28(2), 734.

Lee, J. H., Park, J. H., & Kim, Y. S. (2018). Medicarpin, a natural pterocarpan, inhibits virulence of Staphylococcus aureus by targeting the agr system. Applied and Environmental Microbiology, 84(22), e01635-18.

Lee, S. H., Kim, H. J., & Lee, Y. S. (2014). Sulfuretin induces apoptosis in human cancer cells through a p53-dependent pathway. International Journal of Oncology, 44(6), 2029–2035.

Lee, Y. R., Hwang, J. K., Koh, H. W., Jang, K. Y., Lee, J. H., Park, J. W., & Park, B. H. (2012). Sulfuretin, a major flavonoid isolated from Rhus verniciflua, ameliorates experimental arthritis in mice. Life Sciences, 90(19-20), 799-807.

Li, M., Wang, H., Huan, X., Chen, Y., Mao, C., Guo, T., Zhang, L., & Yang, L. (2021). Simultaneous LC-MS/MS bioanalysis of alkaloids, terpenoids, and flavonoids in rat plasma through salting-out-assisted liquid-liquid extraction after oral administration of extract from Tetradium ruticarpum and Glycyrrhiza

uralensis: A sample preparation strategy to broaden analyte coverage of herbal medicines. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 413, 5871–5884.

Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., & De-Eknamkul, W. (2006). Flavonoids from Artocarpus gomezianus with tyrosinase inhibitory activity. Natural Product Research, 20(12), 1069–1074.

Liu, P., Gao, Y. T., & Yu, J. J. (2013). DPPH radical scavenging activity of kaempferol. Advanced Materials Research, 781-784, 1294–1297.

Luo, H., Daddysman, M. K., & Rankin, G. O. (2011). Kaempferol induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through the PI3K/Akt and NO-mediated MAPK pathways. Biochemical and Biophysical Research Communications, 412(4), 679–684.

Mansoor, K., Aburjai, T., Al-Mamoori, F., & Schmidt, M. (2023). Plants with cosmetic uses. Phytotherapy Research, 37(12), 5755–5768.

McLaughlin, J., Watterson, S., Layton, A. M., Bjourson, A. J., Barnard, E., & McDowell, A. (2019). Propionibacterium acnes and acne vulgaris: New insights from the integration of population genetic, multi-omic, biochemical and host-microbe studies. Microorganisms, 7(5), 128.

Naz, S., Andleeb, S., & Shamim, U. (2017). In vitro **α**-amylase and **α**-glucosidase inhibitory potential of flavonoids isolated from Sophora interrupta Bedd. Biomedicine & Pharmacotherapy, 93, 923–928.

Negi, P., Pandey, N., Jyoti, Mishra, T., Ahluwalia, V., Singh, U., & Mishra, B. B. (2023). Isolation of food grade dye from flower petals of Butea monosperma and determination of marker compounds for its quantitative analysis. ACS Omega, 8(20), 17740–17747.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly 40 years from 01/1981 to 09/2019. Journal of Natural Products, 83(3), 770–803.

Oh, J. M., Jang, H.-J., Kang, M.-G., Mun, S.-K., Park, D., Hong, S.-J., Kim, M. H., Kim, S.-Y., Yee, S.-T., & Kim, H. (2023). Medicarpin and homopterocarpin isolated from Canavalia lineata as potent and competitive reversible inhibitors of human monoamine oxidase-B. Molecules, 28(1), 258.

Olazarán-Santibañez, F., Rivera, G., Vanoye-Eligio, V., Mora-Olivo, A., Aguirre-Guzmán, G., Ramírez-Cabrera, M., & Arredondo-Espinoza, E. (2021). Antioxidant and antiproliferative activity of the ethanolic extract of Equisetum myriochaetum and molecular docking of its main metabolites (apigenin, kaempferol, and quercetin) on β-tubulin. Molecules, 26(2), 443.

Panchal, V. (2014). Formulation and evaluation of sunscreen cream containing herbal ingredients. Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, 3(4), 334-339.

Papoutsis, K., Pristijono, P., & Golding, J. B. (2018). Plant-derived chalcones and their current role in the discovery and development of anticancer agents. Expert Opinion on Drug Discovery, 13(8), 735–748.

Park, S. J., Lee, J. R., & Kim, K. S. (2011). Anti-inflammatory effects of kaempferol and its glycosides, kaempferitrin and kaempferol-3-O-rutinoside, in carrageenan-induced edema in mice. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 54(4), 546–551.

Parvez, M. K., Al dosari, M. S., Basudan, O. A., & Herqash, R. N. (2022). The anti hepatitis B virus activity of sea buckthorn is attributed to quercetin, kaempferol and isorhamnetin. Biomedical Reports, 17, 89.

Pašić, I., Novaković, M., Tešević, V., et al. (2025). Exploring the anticancer potential of extracts and compounds from the heartwood of Cotinus coggygria Scop. wild growing in Serbia. BMC Complementary Medicine and Therapies, 25, 36.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. International Journal of Biomedical Science, 4(2), 89–96.

Pretz, D., Heyward, P. M., Krebs, J., Gruchot, J., Barter, C., Silcock, P.,... & Tups, A. (2023). A dahlia flower extract has antidiabetic properties by improving insulin function in the brain. Life Metabolism, 2(4), load026.

Rasheed, Z., Akhtar, N., & Khan, A. (2017). Potential of Butea monosperma Lam. flower extract against skin aging: A study on its anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities. Journal of Applied Botany and Food Quality, 90, 14-20.

Rusmana, D., Wahyudianingsih, R., & Elisabeth, M. (2017). The effect of steric hindrance on antioxidant activity of flavonoids. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7(10), 195-199.

Sakagami, Y., Kumai, S., & Suzuki, A. (1974). Isolation and structure of medicarpin-β-D-glucoside in alfalfa. Agricultural and Biological Chemistry, 38(5), 1031-1034.

Sampaio, C. F., Lucchetta, N. R., Punhagui, A. P. F., et al. (2019). Alcohol extract of Bauhinia forficata link reduces lipid peroxidation in the testis and epididymis of adult Wistar rats. Microscopy Research and Technique, 82, 345–351.

Serrano, R., Silva, O., & Pinto, M. (2013). The antimicrobial activity of kaempferol and its glycosides. InTech.

Sharma, N., & Kalia, A. N. (2021). Antidiabetic potential of Butea monosperma (Lam.) Taub.: A comprehensive review. Journal of Ethnopharmacology, 270, 113797.

Shi, Y., Wang, C., & Wang, X. (2019). Comparison of the antioxidant and antiproliferative activities of seven common phenolic compounds in vitro. Molecules, 24(7), 1422.

Shoo, B. A., & Shah, V. (2015). A Review of Analytical Methods for the Determination of Tyrosinase Inhibitors. Journal of Chromatographic Science, 53(5), 677–684.

Sowiński, M., & Wesołowska, A. (2021). Antioxidant and antidiabetic activity of kaempferol—A review. International Journal of Molecular Sciences, 22(22), 12454.

Sutar, N. (2019). Formulation and evaluation of herbal lip jelly containing Butea monosperma flower extract. International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4(3), 39-42.

Tadera, K., Minami, Y., & Takamatsu, K. (2006). Inhibitory effect of C-glycosylflavones on α-glucosidase. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70(5), 1231–1233.

Taneja, I., Raju, K. S., Challagundla, M., Raghuvanshi, A., Goel, A., & Wahajuddin, M. (2015). LC-ESI-MS/MS method for bioanalytical determination of osteogenic phytoalexin, medicarpin, and its application to preliminary pharmacokinetic studies. Journal of Chromatography B, 988, 129-136.

Taniguchi, C., Homma, M., Takano, O., Hirano, T., Oka, K., Aoyagi, Y.,... & Hayashi, T. (2000). Pharmacological effects of urinary products obtained after treatment with saiboku-to, a herbal medicine for bronchial asthma, on type IV allergic reaction. Planta Medica, 66(07), 607-611.

Theeraraksakul, K., Jaengwang, K., Choowongkomon, K., & Tabtimmai, L. (2023). Exploring the biological functions and anti-melanogenesis of Phallus indusiatus for mushroom-based cosmetic applications. Cosmetics, 10(5), 121.

Tsai, T. H., Wang, G. J., & Lin, L. C. (2012). Pterocarpans from Dalbergia odorifera and their inhibitory effects on Propionibacterium acnes. Journal of Natural Products, 75(7), 1256–1260.

Tsukiyama, R., Katsura, H., & Tokuriki, N. (2002). Antibacterial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Biological & Pharmaceutical Bulletin, 25(10), 1287–1290.

Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as α-amylase and α-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 10(4), 315–331.

VanEtten, H. D., Matthews, P. S., & Mercer, E. H. (1983). (+)-Maackiain and (+)-medicarpin as phytoalexins in Sophora Japonica and identification of the (–) isomers by biotransformation. Phytochemistry, 22(10), 2291-2295.

Vierkötter, A., & Krutmann, J. (2012). Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations. Dermato-Endocrinology, 4(3), 227–231.

World Health Organization. (2022). Global report on diabetes.

Wu, M., Chen, F., & Wang, M. (2020). Mushroom tyrosinase inhibitors: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(13), 3827–3845.

Xiao, J. (2017). Phytochemicals in medicine and food. Phytochemicals in Medicine and Food, 1-10.

Xu, S., Kang, A., Tian, Y., Li, X., Qin, S., Yang, R., & Guo, Y. (2024). Plant flavonoids with antimicrobial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). ACS Infectious Diseases, 10(9), 3086-3097.

Yadav, V. R., Prasad, S., & Sung, B. (2011). Butein, a novel dual inhibitor of Wnt/β-catenin and PI3K/Akt signaling, shows anticancer activity in HCT116 colon cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics, 10(10), 1963–1974.

Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. Nutrients, 10(11), 1618.

Yadava, R. N., & Tiwari, L. (2005). A new isoflavone glycoside from the stem of Butea monosperma. Journal of Asian Natural Products Research, 7(2), 111–115.

Yin, H., Zhang, S., & Wu, J. (2015). Medicarpin, a natural pterocarpan, inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. International Journal of Molecular Medicine, 36(3), 817–824.

Yin, P., Wang, Y., Yang, L., Sui, J., & Liu, Y. (2018). Hypoglycemic effects in alloxan-induced diabetic rats of the phenolic extract from Mongolian oak cups enriched in ellagic acid, kaempferol and their derivatives. Molecules, 23(5), 1046.

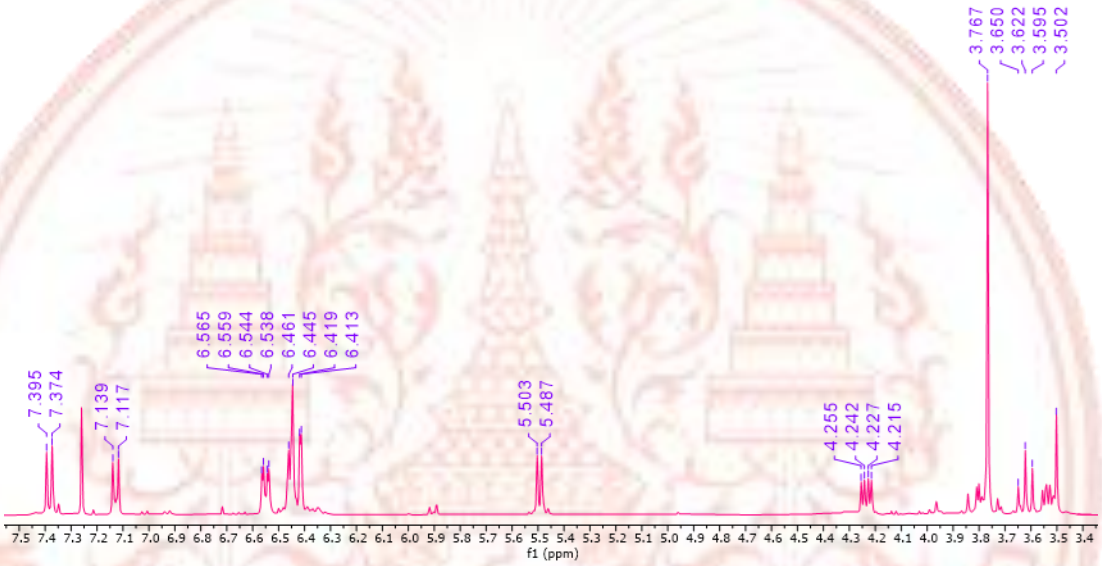
Zheng, X., Wang, W., & Ma, C. (2011). Antioxidant chalcones and flavonols from the flower of Carthamus tinctorius. Natural Product Communications, 6(11), 1653–1656.

Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 34(1), 279–309.

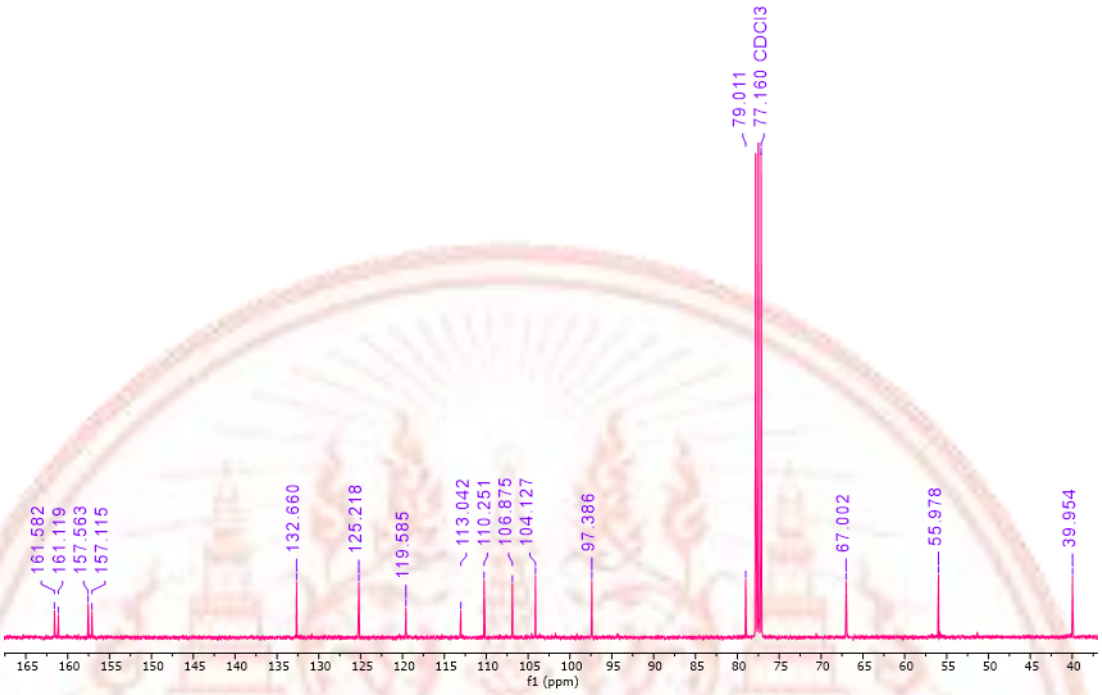
ฐานข้อมูลพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับ. (2560). ทองกวาว. กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก ก

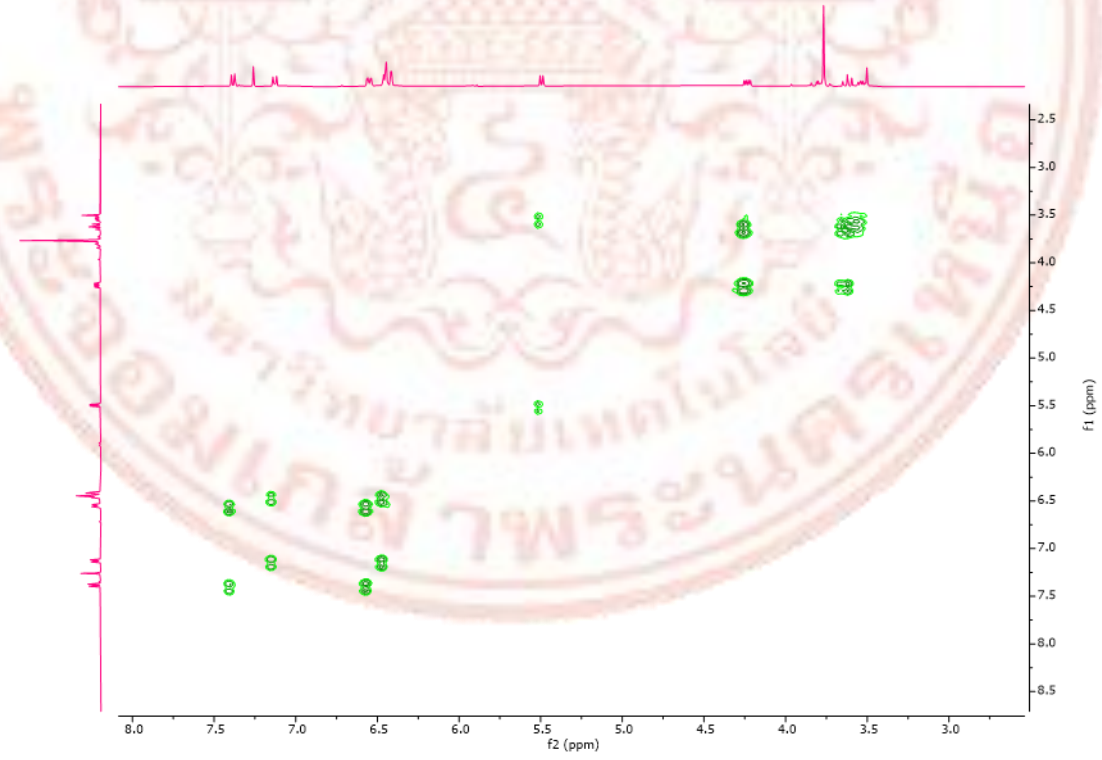
รูปภาพ



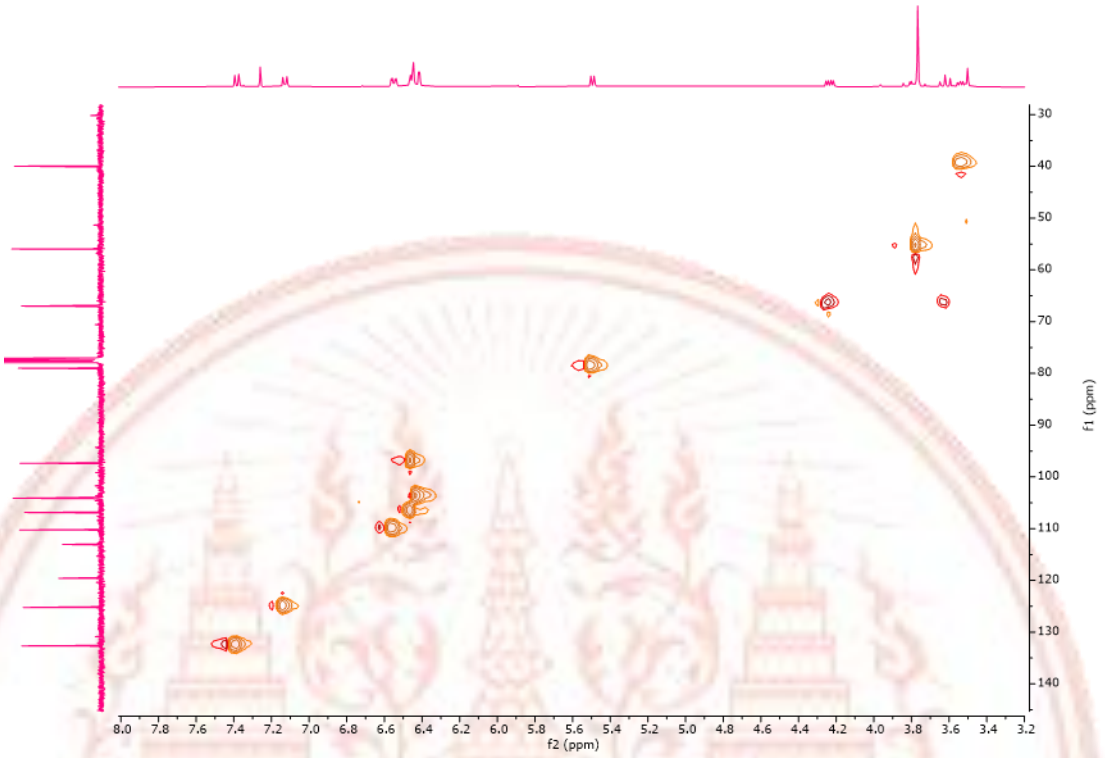
ภาพที่ ก-1 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, $CDCl_3$) ของสาร Medicarpin (**1**)



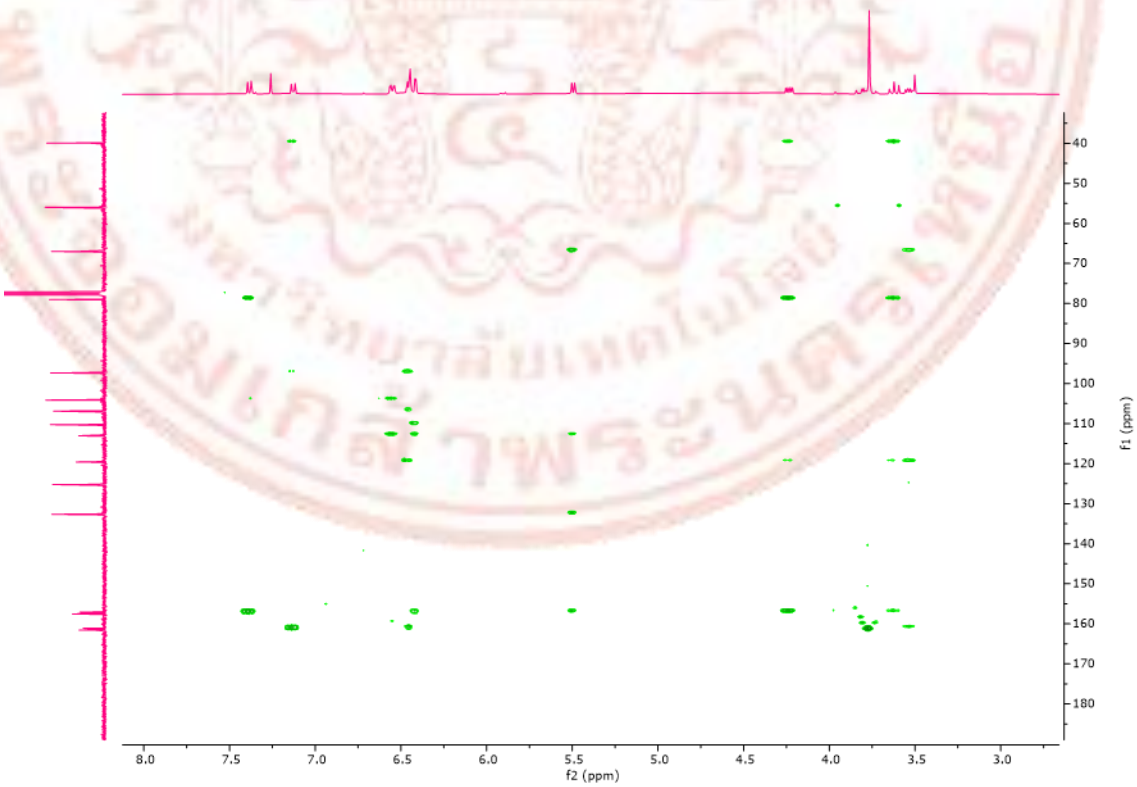
ภาพที่ ก-2 ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum ของสาร Medicarpin (1)



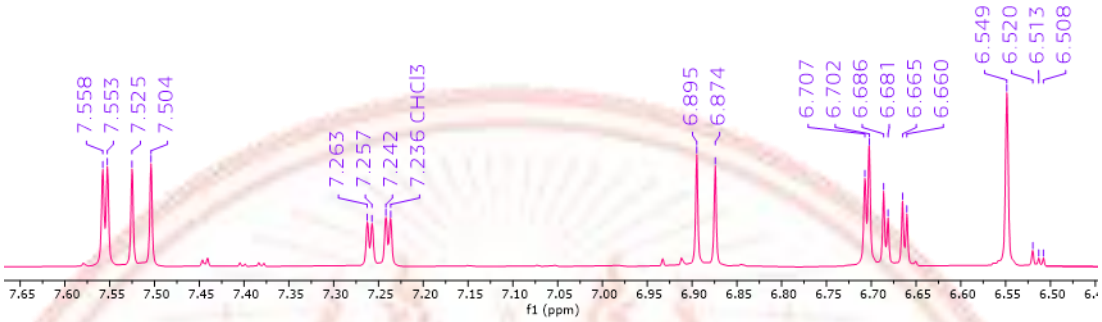
ภาพที่ ก-3 COSY spectrum ของสาร Medicarpin (**1**)



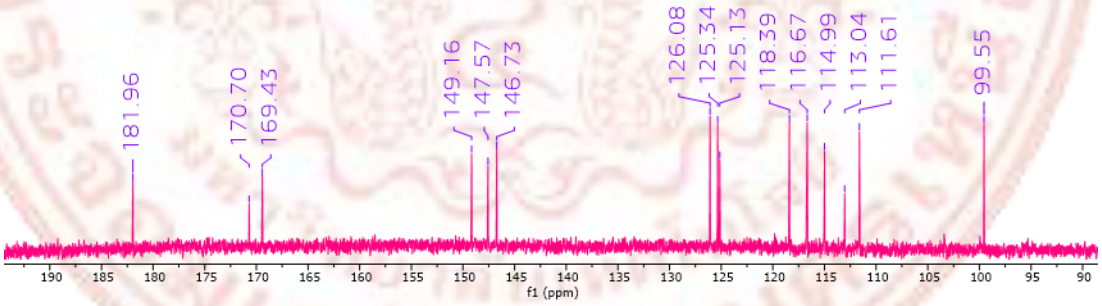
ภาพที่ ก-4 HSQC spectrum ของสาร Medicarpin (**1**)



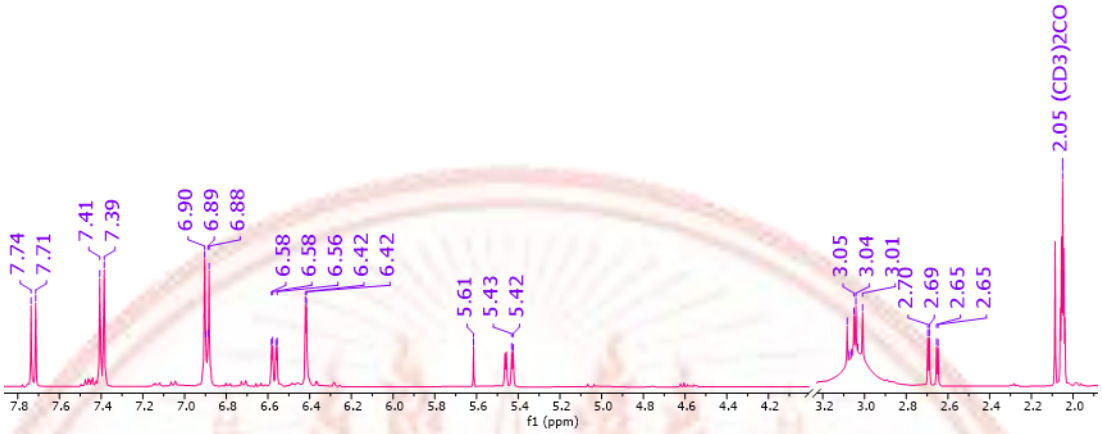
ภาพที่ ก-5 HMBC spectrum ของสาร Medicarpin (**1**)



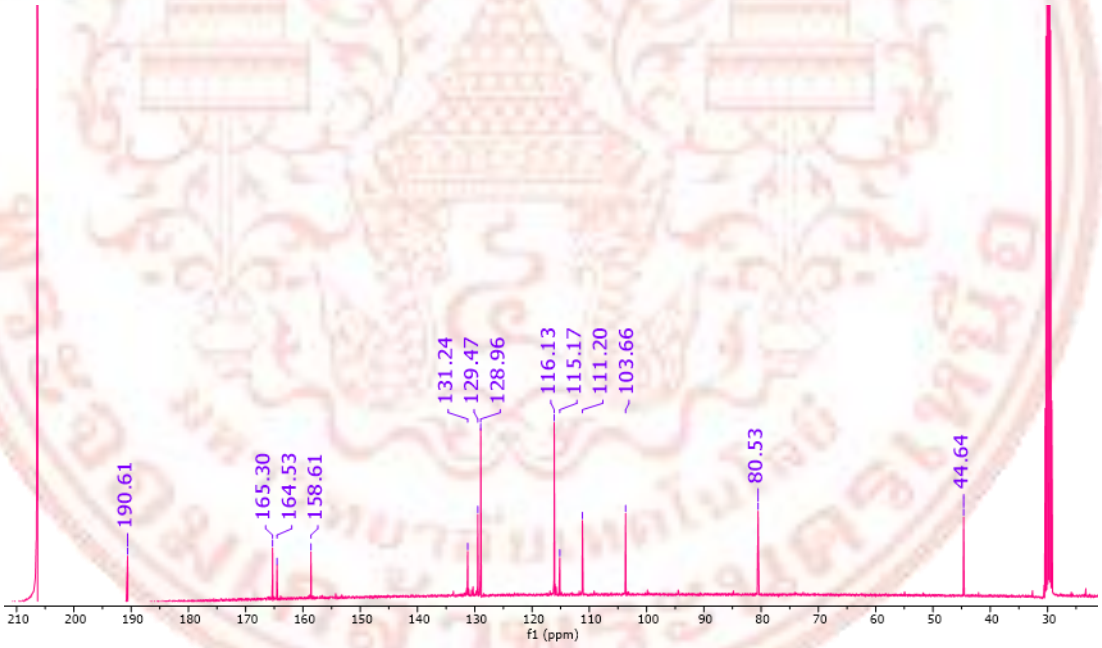
ภาพที่ ก-6 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, $CDCl_3$) ของสาร Sulfuretin (**2**)



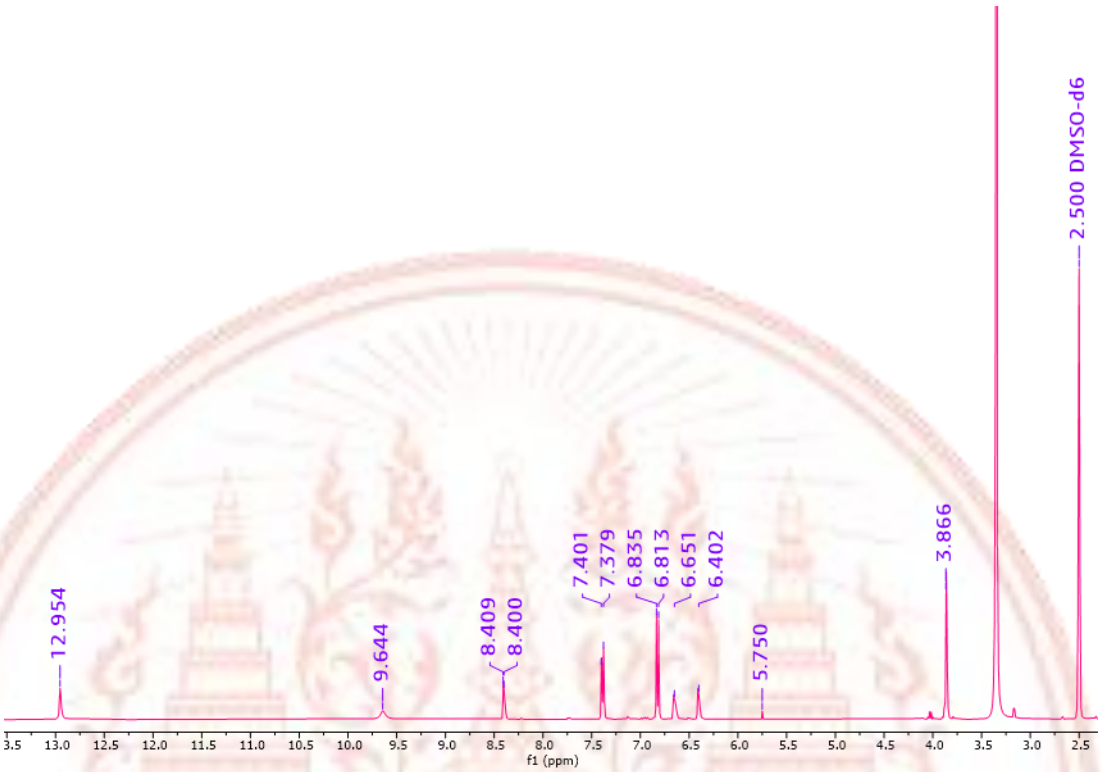
ภาพที่ ก-7 ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) spectrum ของสาร Sulfuretin (**2**)



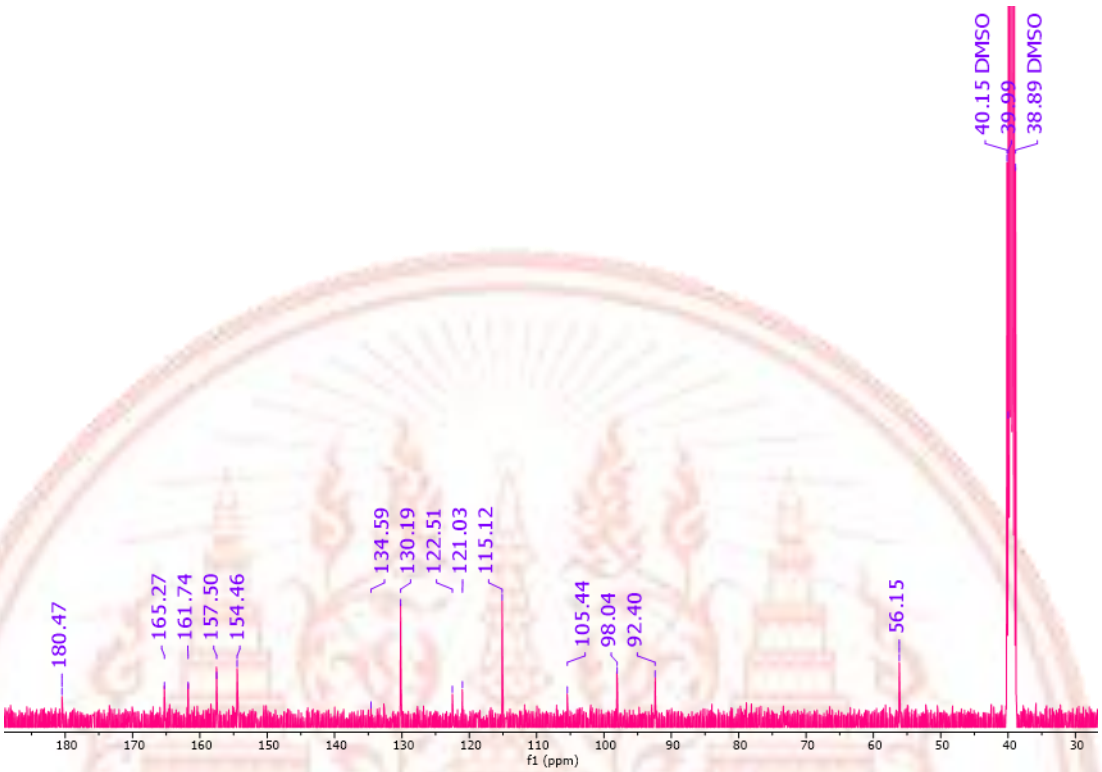
ภาพที่ ก-8 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, Acetone-d_6) ของสาร Liquiritigenin (**3**)



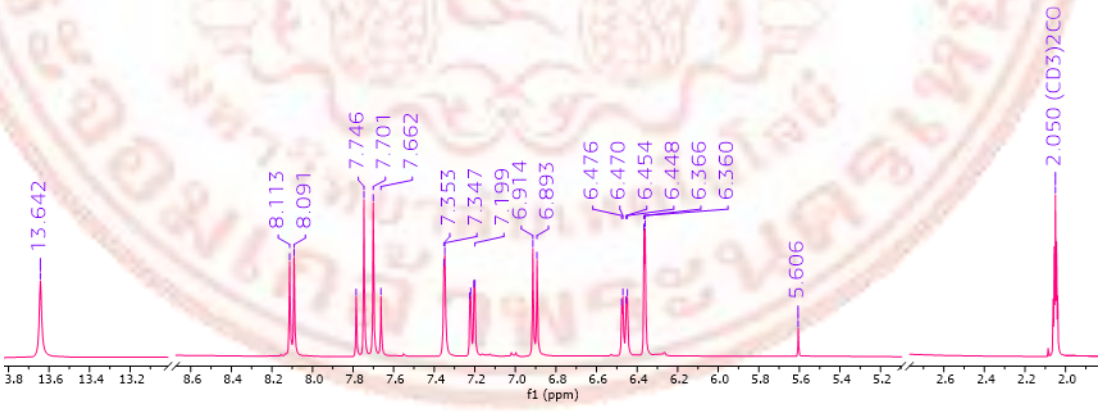
ภาพที่ ก-9 ^{13}C-NMR (100 MHz, Acetone-d_6) spectrum ของสาร Liquiritigenin (**3**)



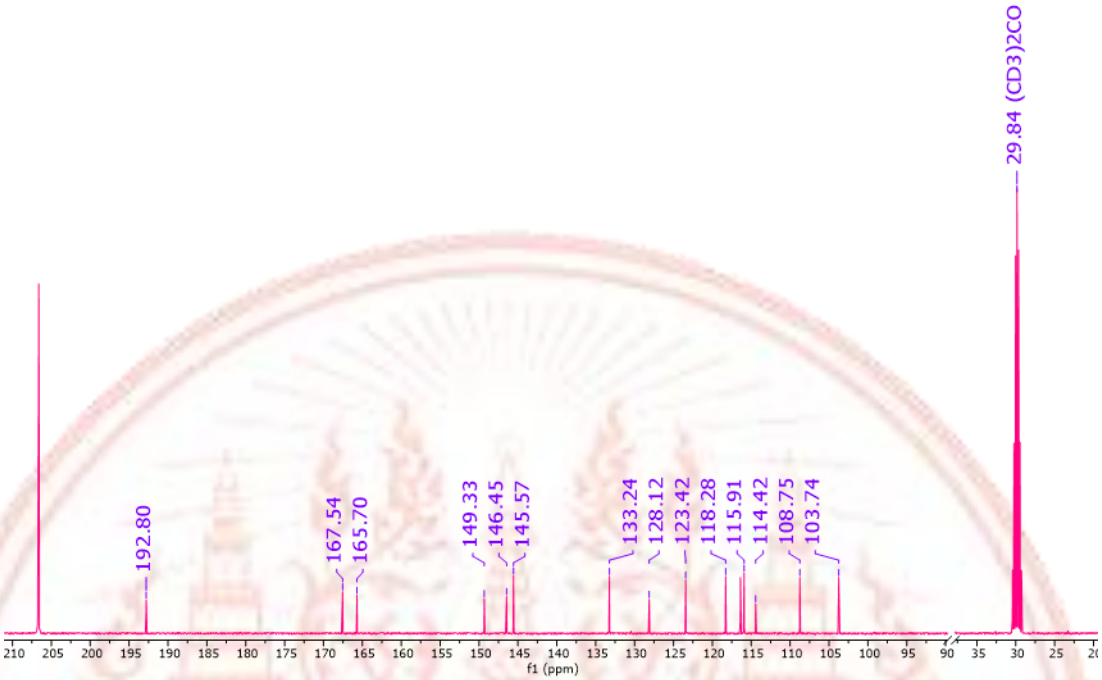
ภาพที่ ก-10 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, DMSO-d_6) ของสาร Kaempferol (**4**)



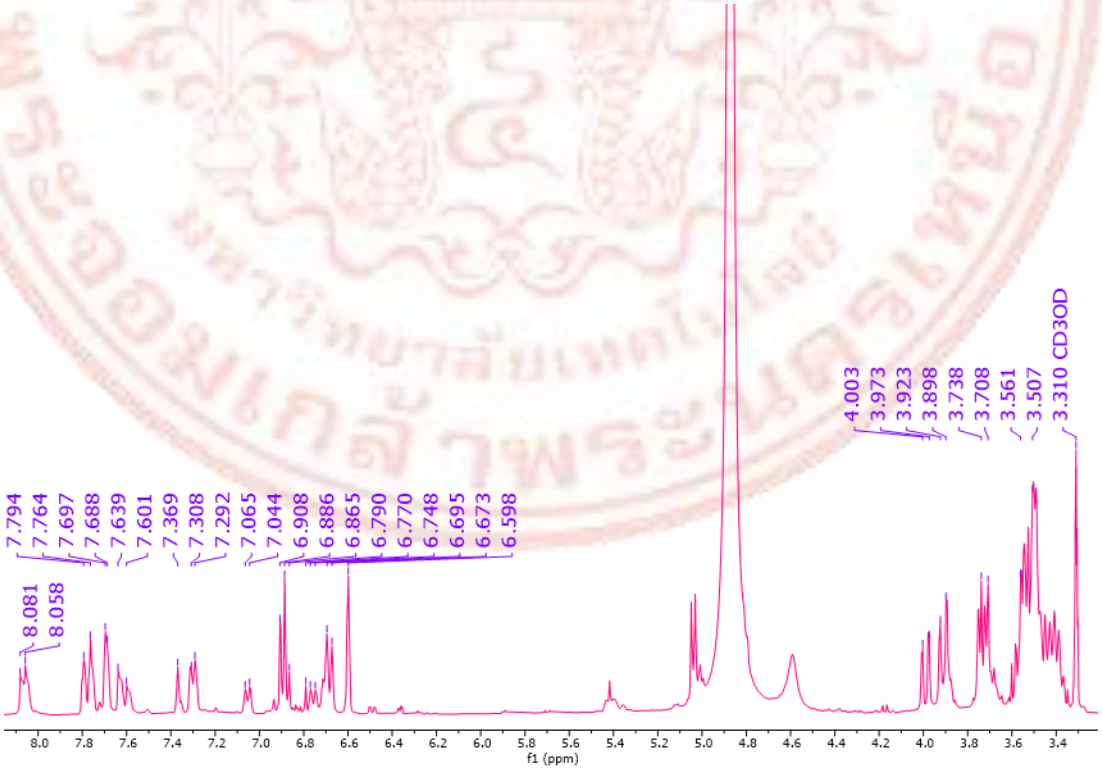
ภาพที่ ก-11 ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) spectrum ของสาร Kaempferol (**4**)



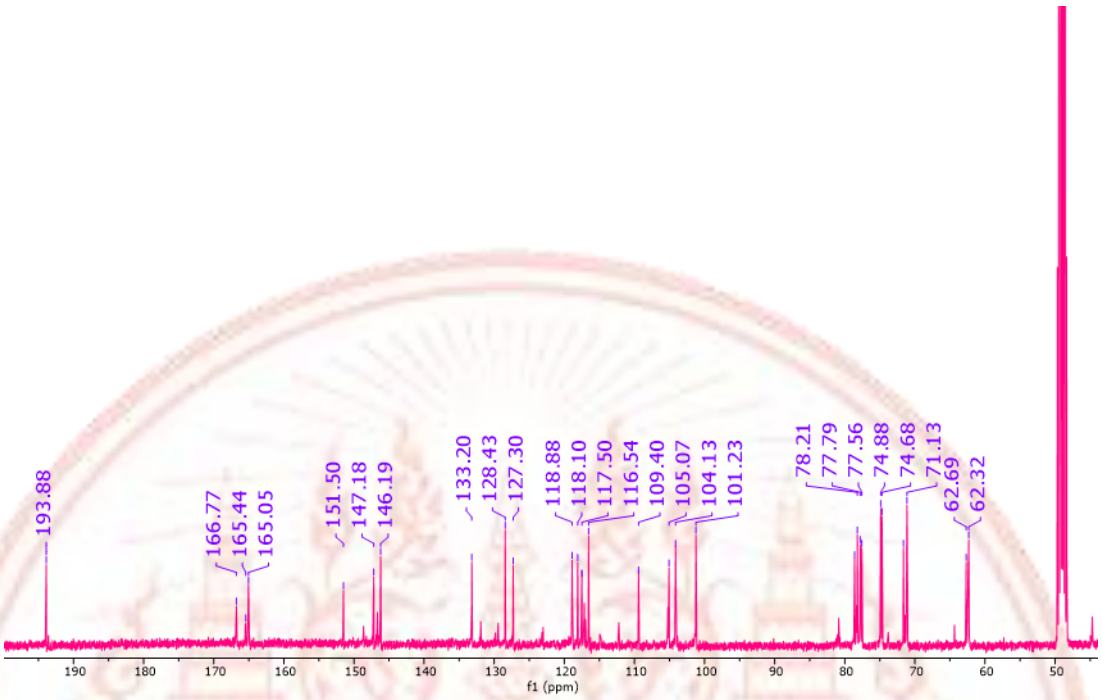
ภาพที่ ก-12 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, Acetone-d_6) ของสาร Butein (**5**)



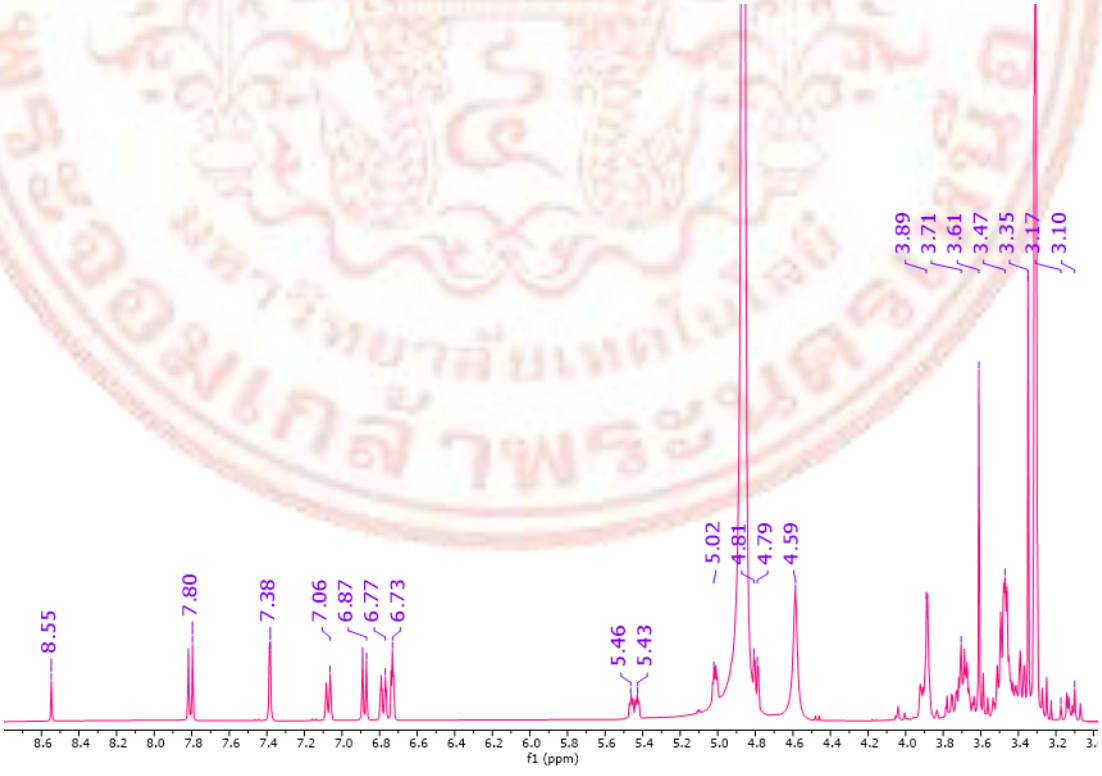
ภาพที่ ก-13 ^{13}C-NMR (100 MHz, Acetone-d_6) spectrum ของสาร Butein (**5**)



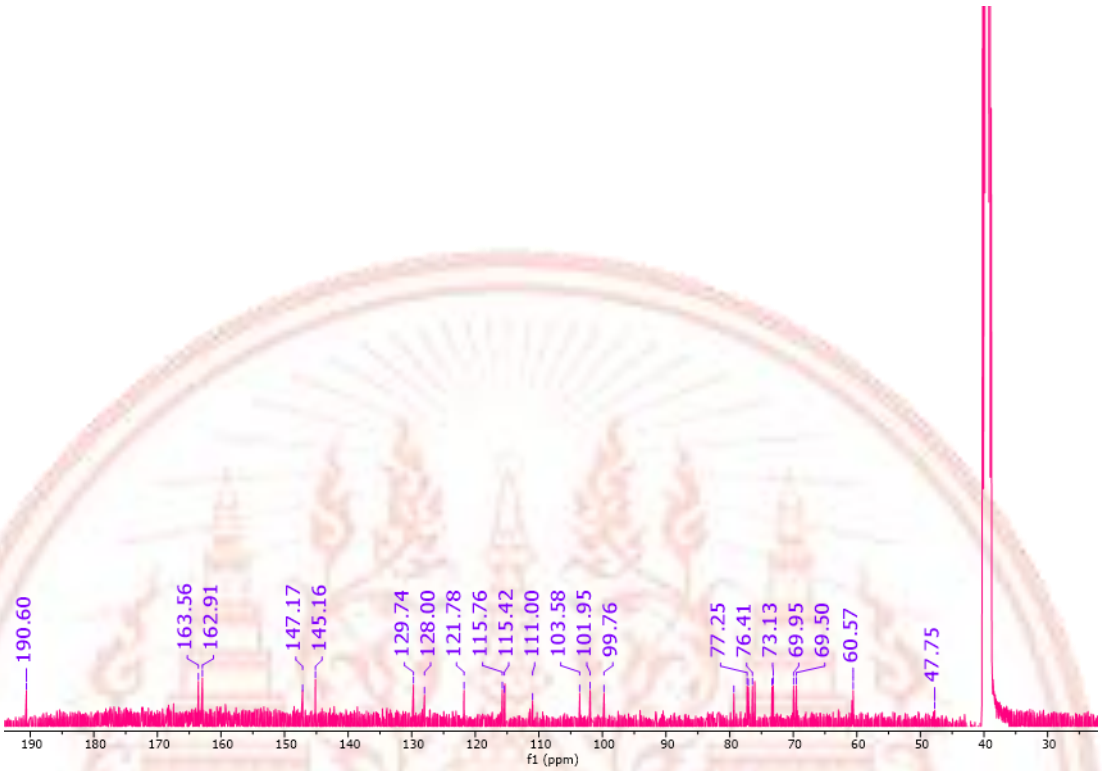
ภาพที่ ก-14 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสาร Iso-butrin (6)



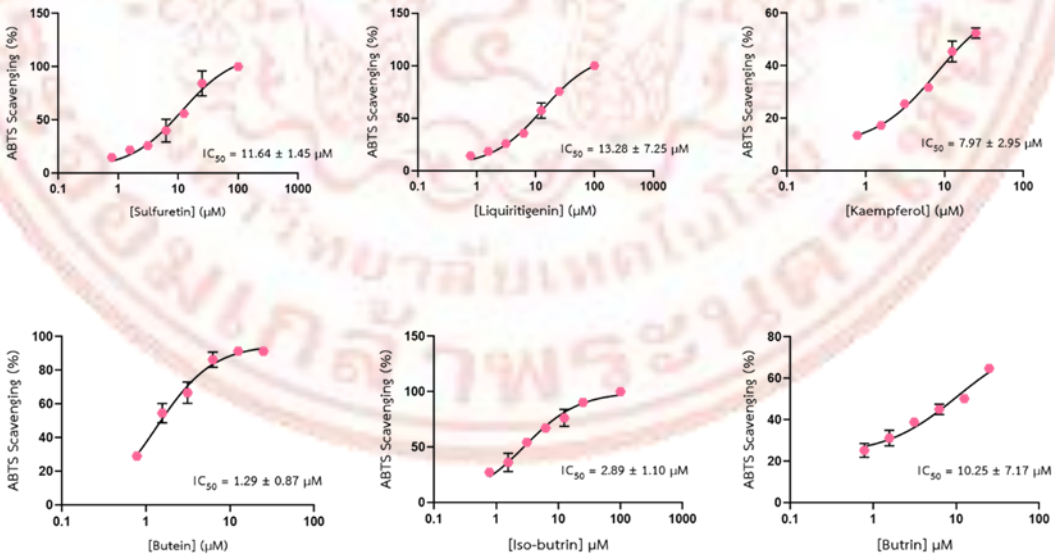
ภาพที่ ก-15 ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD) spectrum ของ Iso-butrin (**6**)



ภาพที่ ก-16 รูปที่ ก-16 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสาร Butrin (7)



ภาพที่ ก-17 ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6) spectrum ของสาร Butrin (**7**)



ภาพที่ ก-18 IC_{50} ของสารประกอบ **2**–**7** ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลาย

ตารางที่ ข-1 การเตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH stock solution ปริมาตร 100 mL

– 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	0.0039 g
– 99.8% Ethanol	100 mL

ตารางที่ ข-2 การเตรียมสารละลาย 7 mM ABTS stock solution ปริมาตร 50 mL

– 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid	192.0 mg
– DI water	50 mL

ตารางที่ ข-3 การเตรียมสารละลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ stock solution ปริมาตร 25 mL

– Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)	16.5 mg
– DI water	25 mL

ผสมทั้งสองสารละลายเข้าด้วยกัน โดยจะมีอัตราส่วนเป็น 2:1 บ่มที่อุณหภูมิห้องในความมืด 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วย ethanol แล้ววัดค่า OD ที่ 734 nm ให้ค่า absorbance มีค่าประมาณ 0.7

ตารางที่ ข-4 การเตรียมสารละลาย 0.3 M acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 50 mL

– Acetic acid (CH_3COOH)	0.81 mL
– Sodium acetate (CH_3COONa)	80 mg
– DI water	45 mL

ปรับ pH ให้ได้ 3.6 แล้วปรับปริมาตรจนมีปริมาตรสุดท้าย 50 mL

ตารางที่ ข-5 การเตรียมสารละลาย 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl ปริมาตร 10 mL

– TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)	31.2 mg

– HCl 40 mM	10 mL

ตารางที่ ข-6 การเตรียมสารละลาย mM $FeCl_3$ 20 ปริมาตร 10 mL

– $FeCl_3$	0.0324 g
– DI water	10 mL

ผสมสารละลายทั้ง 3 เข้าด้วยกันคือ 0.3 M acetate buffet 10 mM TPTZ และ 20 mM $FeCl_3$ ในอัตราส่วน 5:1:1

ตารางที่ ข-7 การเตรียม Potassium phosphate buffer saline (pH 6.8) ปริมาตร 100 mL

– Potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4	0.34 g
– Potassium hydrogen phosphate K_2HPO_4	0.11 g
– DI water	100 mL

นำสารทั้งหมดละลายเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 80 mL แล้วปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย 0.1 mM HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 mL

ตารางที่ ข-8 การเตรียม 6 mM L-Tyrosine (pH 6.8) ปริมาตร 30 mL

– L-Tyrosine	32.6 mg
– Potassium phosphate buffer	30 mL

นำ L-Tyrosine ที่ชั่งได้ผสมกับ Potassium phosphate buffer 25 mL คนและอุ่นไฟเบาๆ ถ้ายังไม่ละลาย ให้เติม 0.1 M NaOH จนละลายดี แล้วค่อยปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8

ตารางที่ ข-9 การเตรียม 1XPBS (pH 7.4) ปริมาตร 50 mL

– Sodium chloride (NaCl)	8 g

– Potassium chloride (KCl)	0.2 g
– Sodium phosphate dibasic dihydrate ($Na_2HPO_4•2H_2O$)	1.44 g
– Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.24 g

นำสารทั้งหมดละลายเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น 40 mL และปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วย 0.1 M NaOH หรือ 20% HCl เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 ℃ ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 50-60 ℃ ก่อนนำไปใช้

ตารางที่ ข-10 การเตรียม 0.5 mg/mL MTT reagent ปริมาตร 20 mL

– 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	10 mg
– 1xPBS (claved)	20 mL

ละลาย MTT 10 mg ลงใน PBS ลงไป 18 mL คนให้ละลายเข้ากัน แล้วเติมให้ครบ 20 mL

ตารางที่ ข-11 การเตรียมสารละลาย Resazurin 10X ปริมาตร 1 mL

– Resazurin	10 g
– PBS (claved)	1 mL

ละลาย Resazurin 10 g ลงใน PBS 1 mL จากนั้นเก็บในขวดเก็บสารสีชา เพื่อรอการใช้งานต่อไป

ตารางที่ ข-12 การเตรียมสารละลาย 1% Crystal violet

– Crystal violet	1 g

ละลาย Crystal violet 1 g น้ำกลั่น ปริมาตร 100 mLก่อนนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4

ภาคผนวก ค
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ ค-1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (Tryptone Soya Broth)

Tryptone Soya Broth	6 g.

ละลายสารทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 200 mL แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50-60°C ก่อนนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB Agar (Tryptone Soya Broth Agar)

Tryptone Soya Broth	9 g.
1.5% Agar	4.5 g.

ละลายสารทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 300 mL แล้วนำไปนึ่งด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50-60°C ก่อนนำไปใช้ ๆ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายสุธารินทร์ ปรีเปรม
ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสารทุติยภูมิและฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกทองกวาว
สาขาวิชา	เคมีอุตสาหกรรม
ประวัติ	มัธยมศึกษาตอนต้น-ปลาย โรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย สุพรรณบุรี
	ปริญญาตรี ภาควิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

พระจอมเกล้าพระนครเหนือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี