รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกไทย

Study on Free Radical Scavenging Activity of *Piper nigrum*

ผศ.ดร. นิวัติ แก้วประดับ

นศภ.นิธิกาญจน์ ขันติวรพงศ์

ศนอ
เลขหมู่ RB170 ก15 2543
Order Key
Bib Key 20130
11 ส.ค. 2543

ได้รับทุนสนับสนุนโครงการนักศึกษา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปี 2543

บทคัดย่อ

เมื่อนำสารสกัด acetone สารสกัด 95% ethanol และสารสกัดน้ำ ของพริกไทย (*Piper nigrum*) 2 ชนิด คือพริกไทยดำ (Black pepper) และพริกไทยล่อน (White pepper) มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay พบว่า สารสกัดน้ำของพริกไทยดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่า EC_{50}=32.56 µg/ml รองลงมาคือสารสกัด 95% ethanol ของพริกไทยดำมีค่า EC_{50}=61.20 µg/ml ในขณะที่สารสกัด acetone ของพริกไทยดำ และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดของพริกไทยล่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก (EC_{50}>100 µg/ml) จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด 95% ethanol ของพริกไทยดำ สามารถแยกได้แอลคาลอยด์ 2 ชนิด คือ piperine และ piperylin ซึ่งมีค่า scavenging activity ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ประมาณ 6% และ 30% ตามลำดับ (มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างต่ำ) อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนสกัด (fraction) ที่มีความเป็นขั้วสูงซึ่งปราศจาก piperine และ piperylin กลับแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีโดยมีค่า EC_{50}=26.31 µg/ml สำหรับองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดนี้ และสารสกัดน้ำ (water extract) ของพริกไทยดำ พบว่าเป็นสารที่มี hydroxyl group เป็นองค์ประกอบซึ่งน่าจะเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณคดีที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือ	17
บทที่ 4 วิธีการวิจัย	19
การสกัดสาร	19
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	20
การสกัดแยกสาร	22
บทที่ 5 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	55
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	58

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ	27
ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพริกไทยดำ และพริกไทยล่อนซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆที่ความเข้มข้น100 µl/ml	28
ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 95% ethanol และสารสกัดน้ำของพริกไทยดำ	29
ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ fraction ต่างๆจากพริกไทยดำซึ่งสกัดด้วย 95% ethanol	30
ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้จาก fraction 17	31
ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้จาก fraction 117-118	32
ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้จากการทำ partition สารสกัดชั้นน้ำจากพริกไทยดำ กับ ethylacetate	33
ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้จาก fraction 1-58	33
ตารางที่ 9 แสดง functional group ใน IR spectrum (KBr) ของ PN_2 (piperine)	45
ตารางที่ 10 แสดง ^{1}H-NMR assignments ของ PN_2 (piperine)	45
ตารางที่ 11 แสดง ^{13}C-NMR assignments ของ PN_2 (piperine)	46
ตารางที่ 12 แสดง ^{1}H-NMR assignments ของ PN_4 (piperylin)	53
ตารางที่ 13 แสดง ^{13}C-NMR assignments ของ PN_4 (piperylin)	54

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	พริกไทย (*Piper nigrum* Linn.)	16
รูปที่ 2	IR spectrum ของ PN_2 (piperine)	36
รูปที่ 3	Mass spectrum ของ PN_2 (piperine)	37
รูปที่ 4	^{1}H-NMR spectrum ของ PN_2 (piperine)	38
รูปที่ 5	ลักษณะการ coupling ของโปรตรอนใน Aromatic ring ของ PN_2 (piperine)	39
รูปที่ 6	^{1}H - ^{1}H COSY ของ PN_2 (piperine)	40
รูปที่ 7	^{1}H - ^{1}H COSY ของ PN_2 (piperine) : ขยายในส่วนของ downfield region	41
รูปที่ 8	^{13}C-NMR spectrum ของ PN_2 (piperine)	42
รูปที่ 9	ภาพขยายของ ^{13}C-NMR ของ piperidine ring ของ PN_2(piperine)	43
รูปที่ 10	DEPT spectrum ของ PN_2 (piperine)	44
รูปที่ 11	Mass spectrum ของ PN_4 (piperylin)	48
รูปที่ 12	^{1}H-NMR spectrum ของ PN_4 (piperylin)	49
รูปที่ 13	^{1}H - ^{1}H Cosy ของ PN_4 (piperylin) : ขยายในส่วนของ downfield region	50
รูปที่ 14	^{13}C-NMR spectrum ของ PN_4 (piperylin)	51
รูปที่ 15	DEPT spectrum ของ PN_4 (piperylin)	52

บทที่ 1
บทนำ

อนุมูลอิสระ(free radical) เช่น hydroxy radical ($HO^{\cdot}$), peroxyl radical ($ROO^{\cdot}$), nitric oxide ($NO^{\cdot}$) และ nitrogen dioxide ($NO_2^{\cdot}$) ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการทางชีวเคมีพื้นฐานของร่างกายสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของ DNA และเยื่อหุ้มเซลล์ (โปรตีนและไขมัน) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคบางชนิด เช่น มะเร็ง โรคเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด และก่อให้เกิดความเสื่อมของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Ames *et al.*,1993) ถึงแม้ร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ แต่ก็กำจัดได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น การได้รับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงน่าจะเป็นผลดีต่อร่างกายมนุษย์ จากการตรวจสอบเอกสารทางวิชาการพบว่าเครื่องเทศหลายชนิดรวมทั้งพริกไทย (*Piper nigrum*) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Tewtrakul,1998) แต่ยังไม่มีรายงานถึงสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งในพริกไทยดำ (Black pepper : เป็นผลแก่จัดที่ยังไม่สุกนำมาตากแห้งทั้งเปลือก) และพริกไทยล่อน (White pepper : เป็นผลสุกที่ลอกเปลือกผลชั้นนอกออกแล้วตากแห้ง) ทางผู้วิจัยเห็นว่าถ้าหากได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเปรียบเทียบฤทธิ์ของพริกไทยดำและพริกไทยล่อนจะนำมาซึ่งหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจนมากขึ้นในกำหนดมาตรฐานคุณภาพของพริกไทยเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและประยุกต์ใช้ทางยาต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกไทยดำ (Black pepper) และพริกไทยล่อน (White pepper)
2. เพื่อสกัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญจากส่วนสกัดของพริกไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อสนับสนุนการใช้พริกไทยในการรักษาโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ
2. ทราบข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับสารสำคัญที่พบในพริกไทยเพื่อใช้ในการกำหนดมาตรฐานคุณภาพของพริกไทย

บทที่ 2
วรรณคดีที่เกี่ยวข้อง

ชื่อสามัญ พริกไทย

ชื่ออื่น พริกน้อย (ภาคเหนือ); โฮ่วเจีย ; pepper

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper nigrum* Linn. วงศ์ Piperaceae

ลักษณะทั่วไป เป็นพืชเถาเลื้อย เขียวตลอดปี สูงประมาณ 5 เมตร ลำต้นเป็นเถา มีข้อพองเห็นได้ชัด ใบออกสลับกัน ก้านใบยาว 1.5-3 ซม. ตัวใบรีใหญ่ ยาว 8-16 ซม. กว้าง 4-7 ซม. ปลายใบแหลม ฐานใบมน อาจเบี้ยวไม่เท่ากัน ขอบใบเรียบ หลังใบสีเขียวเข้ม ท้องใบสีเขียวออกเทา มีเส้นใบ 5-6 เส้นนูนออกมาเห็นได้ชัด ดอกออกเป็นช่อจากข้อ ก้านดอกร่วมยาวพอๆกับก้านใบ ช่อดอกสีขาว ยาวประมาณ 10 ซม. ผลกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 มม. อยู่ติดกันเป็นช่อทรงกระบอกกลมยาว ช่อผลอ่อนสีเขียว เมื่อแก่เป็นสีเหลืองและแดง เมล็ดกลมสีขาวนวล ปลูกกันมากที่จันทบุรีและที่มีความชุ่มชื้นมาก (ชัยโย ชัยหาญทิพยุทธ, 2524)

ส่วนที่ใช้ ผล และเมล็ด ใช้เป็นยา

ผล เก็บเมื่อผลที่โคนช่อเริ่มเป็นสีแดง เด็ดทั้งช่อ ตากหรืออบให้แห้ง จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ แยกเก็บผลออกมา เรียกว่า พริกไทยดำ

พริกไทยดำ (Black pepper) ลักษณะกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-6 มม. เปลือกนอกสีน้ำตาลเข้มออกดำ มีรอยย่นคล้ายร่างแห ที่ขั้วมีรอยก้านผล เปลือกผลชั้นนอกและชั้นกลางลอกออกได้ง่าย เปลือกชั้นในบางและค่อนข้างแข็งเมื่อผ่าครึ่ง เนื้อในมีสีเหลืองอ่อนออกน้ำตาลหรือสีเหลืองขาว เนื้อในแข็งสีขาวนวล มีกลิ่นหอมฉุน รสเผ็ด ร้อน พริกไทยดำที่ดีควรมีขนาดใหญ่ สีดำ เปลือกย่น มีกลิ่นแรงมาก

เมล็ด เก็บเมื่อผลแก่เป็นสีแดง นำมาแช่น้ำไว้หลายวัน ขยี้ลอกเปลือกผลออก ล้างให้สะอาด ตากแห้ง จะได้เมล็ดกลมสีขาวออกเทา เรียกว่า พริกไทยล่อน

พริกไทยล่อน (White pepper) ลักษณะกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-6 มม. เปลือกนอกสีขาวออกเทา เรียบ มีรอยเส้นตามยาว 10-14 เส้น ที่ขั้วมักแบนหรือบุ๋มลงไปเล็กน้อย ที่ปลายมีจุดสีน้ำตาลออกดำนูนขึ้นมาเล็กน้อย พริกไทยล่อนที่ดีควรมีขนาดใหญ่ แข็ง สีขาว กลิ่นฉุนแรง

ก่อนนำไปทำยา ให้เก็บสิ่งเจือปนออก ร่อนให้สะอาด ก่อนใช้ทุบให้แตก หรือบดเป็นผงละเอียด

สรรพคุณ (ชัยโย ชัยหาญทิพยุทธ, 2524 ; นิจศิริ เรืองรังษี, 2534)

ผลและเมล็ด รสร้อน ฉุน ทำให้ร่างกายอบอุ่น ขับลม เสมหะ แก้ท้องอืดแน่น อาหารไม่ย่อย ปวดท้อง เรอหรืออาเจียนเป็นน้ำ ท้องเสีย บิด อาหารเป็นพิษ ปวดฟัน และบวมอักเสบ

วิธีและปริมาณที่ใช้

ผลและเมล็ด แห้ง 0.6-1.5 กรัม ต้มน้ำกิน อาจทำเป็นยาเม็ดหรือยาผงกิน ใช้ภายนอก บดเป็นผงผสมหรือทำเป็นครีมทาหรือพอก

ข้อห้ามใช้ (ชัยโย ชัยหาญทิพยุทธ, 2524)

1. ไม่ควรกินครั้งละมากๆ ติดต่อกันนานๆ อาจมีผลเสียต่อปอดหรือทำให้เป็นริดสีดวงทวาร
2. สตรีมีครรภ์ไม่ควรกินมากเกินไป

ตำรับยา (ชัยโย ชัยหาญทิพยุทธ, 2524)

1. ปวดบริเวณหัวใจ ปวดท้อง และอาเจียนเป็นน้ำ ใช้พริกไทยดำ ดองเหล้า จิบกิน หรือต้มเป็นน้ำแกงกิน
2. ปวด จุกใต้หน้าอก ใช้พริกไทยดำ 49 เม็ด ยูเฮียง (*Boswellia carterii* Birdw.) แห้ง 3 กรัม ผสมบดเป็นผง ผู้ชายให้กินขิงสด ผู้หญิงให้ใช้โกฐเชียง ต้มเอาน้ำผสมเหล้าและผงยาที่บดไว้นั้นกิน
3. ปวดกระเพาะอาหาร ใช้ลูกพุทราจีน 7 ผล (เอาเมล็ดออก) แต่ละลูกใส่พริกไทยล่อน 7 เม็ด ใช้ด้ายพันให้ดี ป้องกันเมล็ดพริกไทยหลุดออกมา นำไปนึ่งด้วยไอน้ำ 7 ครั้ง บดเป็นผง ปั้นเป็นเม็ด ขนาดเมล็ดถั่วเขียว กินครั้งละ 7 เม็ดกับน้ำอุ่น ในคนที่ร่างกายแข็งแรงกินครั้งละ 10 เม็ด หลังจากกินยานี้แล้ว อาการปวดจะลดลง กระเพาะอาหารจะร้อนและรู้สึกหิว แก้โดยกินข้าวหรือข้าวต้มหลังจากกินยานี้
4. มีลมในกระเพาะอาหาร มีอาการอาเจียนและเรอ อาจเป็นติดต่อกันหลายวัน ใช้ผงพริกไทยล่อน 1 กรัม ขิงสด 30 กรัม (ปิ้งไฟอ่อนๆ พอหอม) ใส่น้ำ 2 ชาม ต้มให้เหลือ 1 ชาม เอากากทิ้ง อุ่นแล้วแบ่งกินเป็น 3 ครั้ง
5. กระเพาะอาหารผิดปกติ มีอาการคลื่นไส้เบื่ออาหาร ใช้พริกไทย และปั้วแห่ (*Pinellia ternata* Breit) (ล้างปั้วแห่ให้สะอาดประมาณ 10 ครั้ง) ใช้อย่างละเท่าๆกัน บดเป็นผง เอาน้ำขิงผสม ปั้นเป็นเม็ด ขนาดเมล็ดถั่วเขียว กินครั้งละ 30-50 เม็ด กับน้ำขิง

6. ท้องอืด อาหารไม่ย่อย ใช้พริกไทย แช่ในน้ำส้มสายชูให้ดูดซับน้ำส้มให้มากที่สุด ตาก แห้ง บดเป็นผง ผสมน้ำส้มสายชูที่แช่นั้น ปั้นเป็นเม็ด กินครั้งละ 10 เม็ด กับน้ำส้มสายชูที่เจือจาง (อาจกินได้ครั้งละ 30-40 เม็ด)
7. ท้องเสีย และอหิวาตกโรคในฤดูร้อน ใช้พริกไทยบดเป็นผง ปั้นเป็นเม็ด ขนาดเม็ดถั่วเขียว กินครั้งละ 40 เม็ด หลังอาหาร
8. ชัก เนื่องจากร่างกายขาดแคลเซียม ใช้พริกไทยล่อน 20 เม็ด เปลือกไข่ไก่ 2 ฟอง ผิงไฟให้เหลือง ผสมบดเป็นผง แบ่งห่อไว้เป็น 14 ห่อ ผสมน้ำสุกกินวันละ 1 ห่อ
9. ถุงอัณฑะอักเสบ เป็นผื่นคัน มีน้ำเหลือง ใช้พริกไทย 10 เม็ด บดเป็นผง ผสมน้ำ 2 ลิตร ต้มให้เดือด ชะล้างแผลวันละ 2 ครั้ง
10. ปวดฟันใช้พริกไทย พริกหาง อย่างละเท่าๆกัน บดเป็นผง ผสมเป็นยาขี้ผึ้ง ปั้นเป็นก้อนเล็กๆ อุดรูฟันที่ปวด หรือใช้พริกไทย 9 เม็ด ถั่วเขียว 11 เม็ด ห่อผ้าทุบให้แตก ใช้สำลีห่อเป็นก้อนกัดไว้ตรงฟันซี่ที่ปวด น้ำลายจะไหลออกเรื่อยๆ อาการปวดก็จะลดลง
11. แผลจากถูกความเย็นจัด ใช้พริกไทย 10 กรัม แช่ในเหล้าขาว 90 มล. นาน 7 วัน แล้วนำกากมาถูทาที่แผล
12. ตะขาบกัด ใช้พริกไทยบดเป็นผงทา
13. ขับลมและแก้หวัด ใช้พริกไทยดำ 2-5 กรัม (หรือใช้ผงพริกไทยล่อน) ใส่แกงจืดกินร้อนๆ
14. แก้เมื่อยขบ เป็นเหน็บชาง่ายในฤดูหนาวหรือฤดูฝน ใช้ไข่ไก่ 1 ฟอง กระเทาะด้านหนึ่งเทเนื้อในออก แล้วใช้เปลือกไข่นั้นตวงพริกไทยให้เต็ม 1 เปลือกไข่ กะทิ 1 เปลือกไข่ นำเนื้อในไข่ไก่ พริกไทย และกะทิรวมกัน บดให้ละเอียด อุ่นพอไข่สุก แบ่งกินให้หมด

องค์ประกอบทางเคมี (Chemical Constituents)

สารเคมีที่พบในพริกไทย (*Piper nigrum*) ที่มีรายงานรวบรวมไว้ใน Dictionary of Natural Products (CD-ROM, 1998) ได้แก่

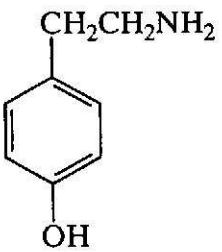
1. 4-(2-Aminoethyl)phenol

   เป็นสารในกลุ่ม aminophenolic compound พบในส่วน เมล็ด

   สูตรโมเลกุล $C_8H_{11}NO$

   น้ำหนักโมเลกุล 137.181

สูตรโครงสร้าง



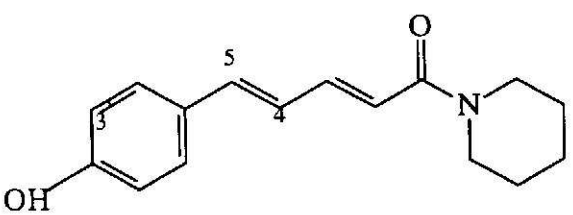
2. Coumaperine

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ผล

สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{19}NO_2$

น้ำหนักโมเลกุล 257.332

สูตรโครงสร้าง



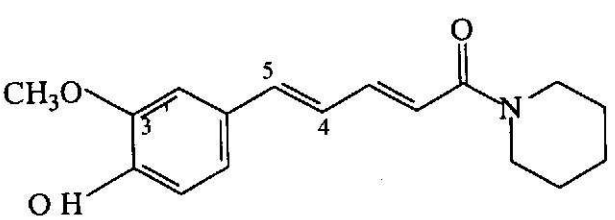
3. 3′-Methoxycoumaperine

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน เมล็ด

สูตรโมเลกุล $C_{17}H_{21}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 287.358

สูตรโครงสร้าง



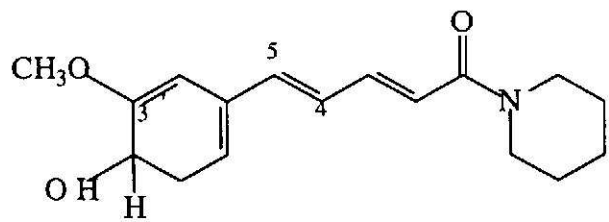
4. 3′-Methoxy, 4′,5′-dihydrocoumaperine

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน เมล็ด

สูตรโมเลกุล $C_{17}H_{23}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 289.374

สูตรโครงสร้าง



5. 2,4-Decadienoic acid; (*E,E*)-form

เป็นสารในกลุ่ม organic acids พบในส่วน ผล

สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{16}O_2$

น้ำหนักโมเลกุล 168.235

สูตรโครงสร้าง

$$H_3C(CH_2)_4CH{=}CHCH{=}CHCOOH$$

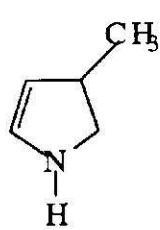
6. 2,3-Dihydro-3-methyl-1H-pyrrole

เป็นสารในกลุ่ม alkaloid พบในส่วน ผล

สูตรโมเลกุล C_5H_9N

น้ำหนักโมเลกุล 83.133

สูตรโครงสร้าง



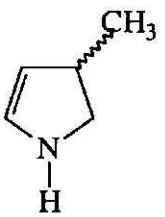
7. 2,3-Dihydro-3-methylpyrrole; (+)-form

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ผล

สูตรโมเลกุล C_5H_9N

น้ำหนักโมเลกุล 83.133

สูตรโครงสร้าง



8. 2,4-Dodecadienoic acid; (*2E,4E*)-form

เป็นสารในกลุ่ม organic acids พบในส่วน ผล

สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{27}NO$

น้ำหนักโมเลกุล 249.395

สูตรโครงสร้าง

$$H_3C(CH_2)_6CH{=}CHCH{=}CHCOOH$$

9. 16-Hentriacontanone

เป็นสารในกลุ่ม ketones พบในส่วน เมล็ด

สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{62}O$

น้ำหนักโมเลกุล 450.83

สูตรโครงสร้าง

$$H_3C(CH_2)_{14}CO(CH_2)_{14}CH_3$$

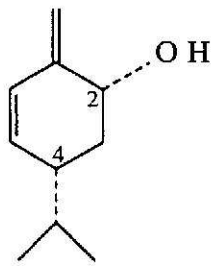
10. *p*-Mentha-1(7),5-dien-2-ol; (*2S,4R*)-form

เป็นสารในกลุ่ม monoterpenoids พบในส่วน เมล็ด

สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{16}O_6$

น้ำหนักโมเลกุล 152.236

สูตรโครงสร้าง



(*2R,4R*)-form

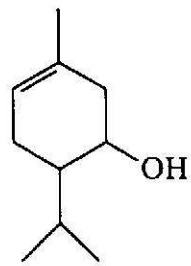
11. *p*-Mentha-1-en-5-ol

เป็นสารในกลุ่ม monoterpenoids พบในส่วน เมล็ด

สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{18}O$

น้ำหนักโมเลกุล 154.252

สูตรโครงสร้าง



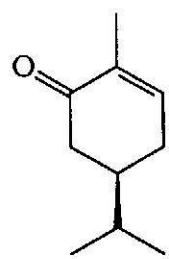
12. *p*-Mentha-1-en-6-one; (*R*)-form

เป็นสารในกลุ่ม monoterpenoids พบในส่วน เมล็ด

สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{16}O$

น้ำหนักโมเลกุล 152.236

สูตรโครงสร้าง



(*R*)-form

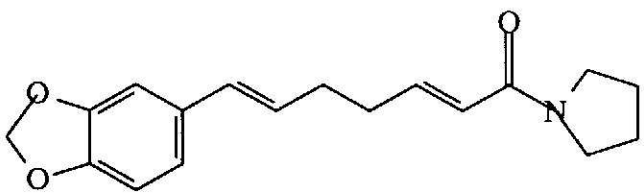
13. 1-[7-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,6-heptadienoyl]pyrrolidine;(*2E,6E*)-form

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ผล

สูตรโมเลกุล $C_{18}H_{21}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 299.369

สูตรโครงสร้าง



(*2E,6E*)-form

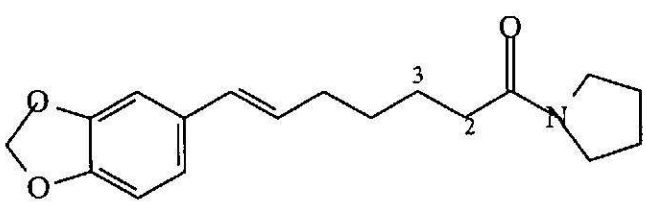
14. 1-[7-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,6-heptadienoyl]pyrrolidine;(*2E,6E*)-form, 2,3-Dihydro

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{18}H_{23}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 301.385

สูตรโครงสร้าง



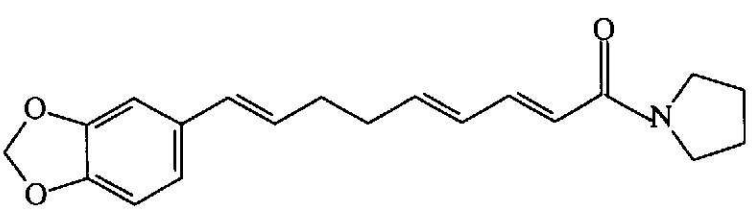
15. 1-[9-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4,8-nonatrienoyl]pyrrolidine;(*2E,4E,8E*)-form

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{20}H_{23}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 325.407

สูตรโครงสร้าง



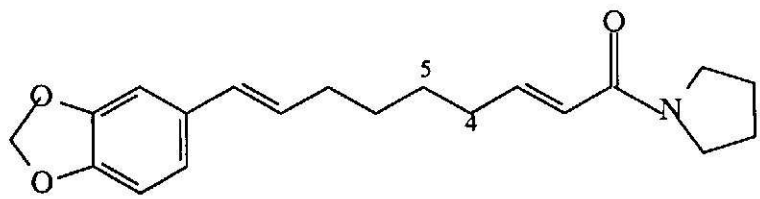
16. 1-[9-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4,8-nonatrienoyl]pyrrolidine;(*2E,4E,8E*)-form, 4,5-Dihydro

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{20}H_{25}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 327.422

สูตรโครงสร้าง



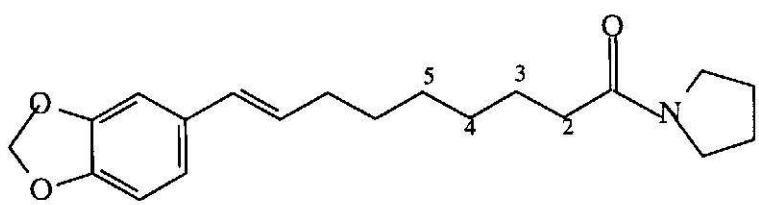
17. 1-[9-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4,8-nonatrienoyl]pyrrolidine;(*2E,4E,8E*)-form, 2,3,4,5-Tetrahydro

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{20}H_{27}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 329.438

สูตรโครงสร้าง



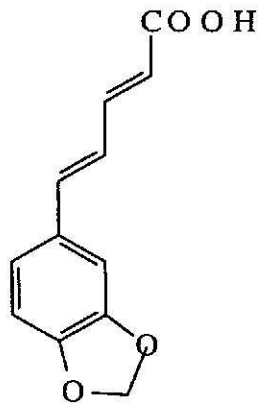
18. 5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadienoic acid

เป็นสารในกลุ่ม organic acids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{12}H_{10}O_4$

น้ำหนักโมเลกุล 218.209

สูตรโครงสร้าง



(*E*,*E*)-form

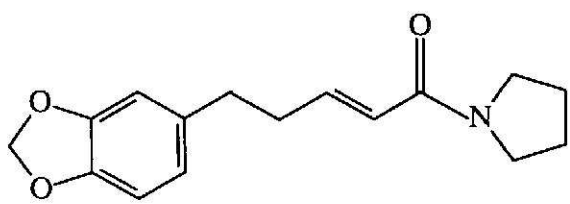
19. 1-[5-3,4- Methylenedioxyphenyl)-2-pentenoyl]pyrrolidine;(*E*)-form

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{19}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 273.331

สูตรโครงสร้าง



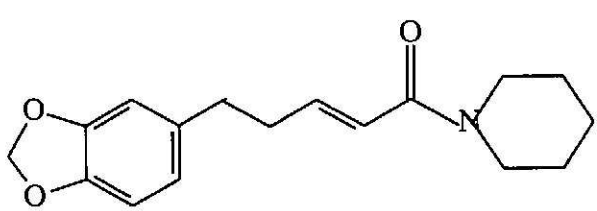
20. Piperanine;(*E*)-form

เป็นสารในกลุ่ม พบในส่วน

สูตรโมเลกุล $C_{17}H_{21}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 287.358

สูตรโครงสร้าง



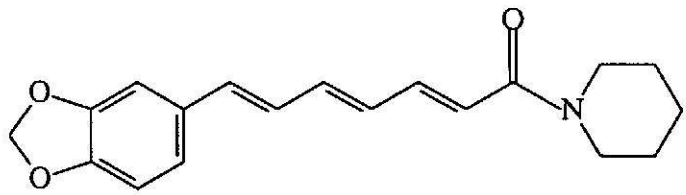
21. Piperettine

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{19}H_{21}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 311.38

สูตรโครงสร้าง



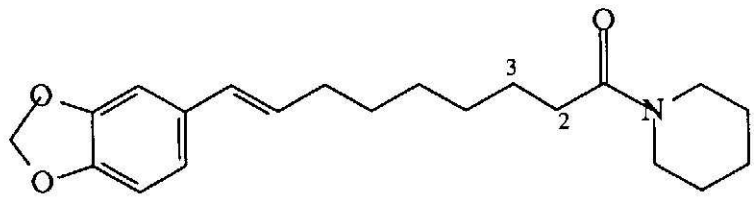
22. Pipernonaline; 2,3-Dihydro

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{21}H_{29}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 343.465

สูตรโครงสร้าง



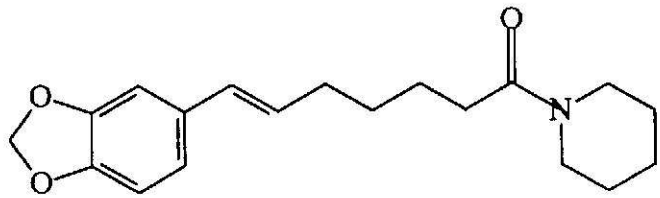
23. Piperolein A;(*E*)-form

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{19}H_{25}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 315.411

สูตรโครงสร้าง



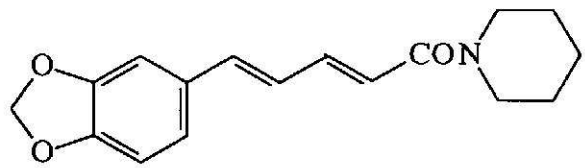
24. 1-Piperoylpiperidine

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{17}H_{19}NO_3$

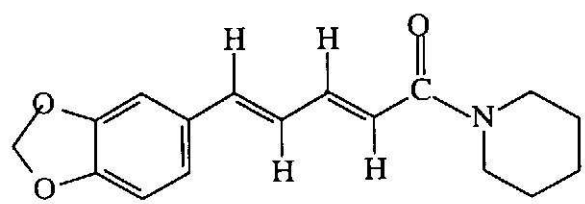
น้ำหนักโมเลกุล 285.342

สูตรโครงสร้าง



มี Stereoisomers ได้หลายชนิดดังนี้

- (*E,E*)-form เรียกว่า piperine เป็น Stereoisomer หลักที่พบมากที่สุดใน *Piper nigrum* มีสูตรโครงสร้างดังนี้



นอกจากนี้ยังมี Stereoisomers ของ piperineที่ยังสามารถพบได้อีก เช่น

- 1-Piperoylpiperidine;(*Z,Z*)-form
- 1-Piperoylpiperidine;(*E,Z*)-form
- 1-Piperoylpiperidine;(*Z,E*)-form

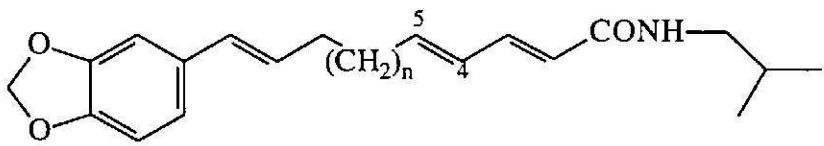
25. Retrofractamides; Retrofractamide B

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{29}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 355.476

สูตรโครงสร้าง



Retrofractamide A : n = 1
B : n = 3
C : n = 2

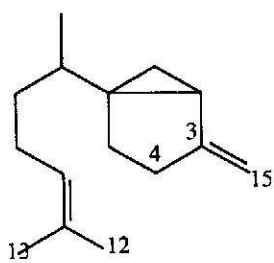
26. Sesquisabinene

เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpenoids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{15}H_{24}$

น้ำหนักโมเลกุล 204.355

สูตรโครงสร้าง



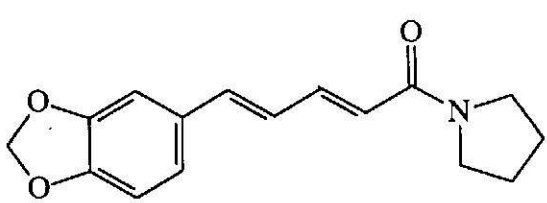
27. Trichostachine; (*E,E*)-form (= Piperylin)

เป็นสารในกลุ่ม alkaloids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{16}H_{17}NO_3$

น้ำหนักโมเลกุล 271.315

สูตรโครงสร้าง



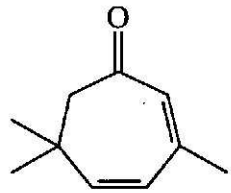
28. 3,6,6-Trimethyl-2,4-cycloheptadien-1-one

เป็นสารในกลุ่ม monoterpenoids พบในส่วน ไม่ระบุส่วนที่ใช้

สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{14}O$

น้ำหนักโมเลกุล 150.22

สูตรโครงสร้าง



ฤทธิ์ทางชีวภาพของพริกไทย (*Piper nigrum*)

1. Antimalarial (Upston *et al.*,1995)
2. Antimicrobial (Pradhan *et al.*,1999)
3. Antibacterial (Perez *et al.*,1994)
4. Antiepileptic (นิจศิริ เรืองรังษี, 2534)
5. Lavicidal (Kiuchi *et al.*,1988)
6. Antioxidant activity (Tewtrakul,1998)
7. Stimulation of mouse melanocyte proliferation (Lin *et al.*, 1999)

รูปที่ 1 พริกไทย (*Piper nigrum* Linn.)

1. Twig
2. Fruit

(ที่มา : Thai Herbal Pharmacopoeia vol. 1, 1995, P.58)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือ

1. วัสดุ อุปกรณ์

- Beaker ขนาด 10, 100, 250, 500, 1000 ml
- Erlenmayer flask ขนาด 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ml
- Vial ขนาด 2, 4 dram
- Stirring rod
- Pipette ขนาด 0.5, 1, 2, 5, 10 ml
- Micropipette ขนาด 500 µl
- Pipette tip
- Eppendorf tube
- Forcep
- Separatory funnel
- Sintered-glass funnel ขนาด 500 ml
- กระดาษกรองวัตต์แมนเบอร์ 4
- สำลี
- ผ้าขาวบาง
- แผ่น TLC สำเร็จรูป(Silica gel GF_{254})
- Column เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 cm และ 5 cm ความยาว 35 cm และ 50 cm ตามลำดับ
- Glass mortar

2. สารเคมี

- 95% Ethanol (Merck)
- Acetone
- Absolute ethanol (Merck)
- Chloroform (Merck)
- Methanol (Merck)
- n-Hexane
- Toluene
- Ethylacetate
- DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Sigma)
- Butylated hydroxytoluene (BHT)

- Silica gel 60 for column chromatography ขนาด particle size 0.040-0.063 mm
- น้ำกลั่น

3. เครื่องมือ

- UV spectrophotometer (Spectronic)
- Infrared spectrophotometer (Jas.co IR-810)
- GC/Mass spectrometer (Hewlett Packard 5890 series II plus)
- Nuclear Magnetic Resonance spectrometer (500 MHz)
- Sonicator (Crest)
- Water bath (Memmert)
- Lyophilizer (SF-1 Shell Freezer)
- Rota vapor (Eyela)
- Vertex (Vortex genie-2)
- Dryer (National)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Shimadzu)
- ตู้อบ (Heraeus)

บทที่ 4
วิธีการวิจัย

การเก็บตัวอย่างสมุนไพร

พริกไทยดำ และพริกไทยล่อนซื้อมาจากร้านขายยาสมุนไพรใน อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา เมื่อวันที่ 10 มิถุนายน 2542 และได้นำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ตามที่กำหนดไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoeia (vol.1, 1995 หน้า 57-64)

วิธีการทดลอง

1. การสกัดสาร

1.1 การเตรียมผงยาของสมุนไพร

<u>วิธีทำ</u>

1. นำพริกไทยดำและพริกไทยล่อนอย่างละ 900 กรัม มาอบที่ 50 °C นาน 24 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นนำไปบดให้เป็นผงละเอียด จะได้ผงยาของสมุนไพรตามต้องการ

1.2 การเตรียมสารสกัดของสมุนไพร

เตรียมผงยาของตัวอย่างพืชที่จะนำไปสกัด ได้แก่ พริกไทยดำ และพริกไทยล่อน โดยชั่งน้ำหนักของผงยาแต่ละชนิดอย่างละ 900 กรัม และจะสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ Acetone, 95% ethanol และน้ำ

1.2.1 การสกัดด้วย Acetone

1. ชั่งผงยาของตัวอย่างพืชแต่ละชนิดใส่ erlenmayer flask ขนาด 2 L
2. เติม Acetone 1.5 L ลงไปให้ท่วมผงยา
3. หมักทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน
4. กรองผ่านกรวยกรองโดยใช้กระดาษกรอง
5. นำส่วนที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออก เพื่อให้ได้สารละลายเข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบลดความดันภายใต้สุญญากาศ (Rota vapor)
6. เมื่อได้สารละลายเข้มข้น ให้ถ่ายใส่ evaporating dish ซึ่งชั่งน้ำหนักไว้แล้ว
7. นำ evaporating dish ไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยไป
8. นำ evaporating dish ไปชั่งหาน้ำหนักสารสกัดหลังจากตัวทำละลายระเหยไป
9. ตัวทำละลายที่ได้จากการทำให้เข้มข้น (recovered solvent) ให้นำกลับมาแช่ผงยาหมักซ้ำอีกครั้ง

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

1.2.2 การสกัดด้วย 95% ethanol

1. นำกากผงยาที่สกัดด้วย acetone แล้วมาเติม 95% ethanol 1.5 L ลงไปให้ท่วมผงยา
2. หมักทิ้งไว้ประมาณ 2 วัน
3. กรองผ่านกรวยกรองโดยใช้กระดาษกรอง
4. นำส่วนที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออก เพื่อให้ได้สารละลายเข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบลดความดันภายใต้สุญญากาศ (Rota vapor)
5. เมื่อได้สารละลายเข้มข้น ให้ถ่ายใส่ evaporating dish ซึ่งชั่งน้ำหนักไว้แล้ว
6. นำ evaporating dish ไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยไป
7. นำ evaporating dish ไปชั่งหาน้ำหนักสารสกัดหลังจากตัวทำละลายระเหยไป
8. ตัวทำละลายที่ได้จากการทำให้เข้มข้น (recovered solvent) ให้นำกลับมาแช่ผงยาหมักซ้ำอีกครั้ง

1.2.3 การสกัดด้วยน้ำ

1. นำกากผงยาที่ผ่านการสกัดด้วย acetone และ 95% ethanol แล้วมาเติมน้ำ 1.5 L ให้ท่วมผงยา นำไปต้มบน hot plate จนเดือด แล้วลดอุณหภูมิให้คงที่ไว้ที่ 60 °C นาน 30 นาที
2. นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บส่วนของเหลวที่กรองได้ ส่วนของกากที่เหลือให้เติมน้ำให้ท่วมและต้มต่อไปอีกเช่นเดิมแล้วจึงกรองและนำส่วนของเหลวที่กรองได้มารวมกัน
3. นำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง lyophilizer
4. เก็บผงยาใส่ขวดซึ่งชั่งน้ำหนักไว้แล้ว

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

หลักการ (Yamasaki *et al.*,1994)

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เป็นอนุมูลอิสระ(free radical)เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายใน ethanol จะมีสีม่วงซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm.และเมื่อ DPPH รับElectron หรือ hydrogen radical จะทำให้มีสีจางลงดังนั้น ถ้าสารที่นำมาทดสอบทำให้สีของ DPPHจางลง แสดงว่าสารนั้น มี antioxidative effect โดยกลไกของการต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity)

การเตรียมสารละลายของ DPPH ใน ethanol

เตรียม DPPH ให้มีความเข้มข้น 6×10^{-5} M. จำนวน 150 ml. โดยชั่งน้ำหนัก DPPH ตามปริมาณที่คำนวณได้ (ดูในภาคผนวก) ละลายและปรับปริมาตรให้ครบด้วย absolute ethanol แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

<u>หมายเหตุ</u> ควรเตรียมทันทีก่อนใช้

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้คือ BHT เตรียมให้มีความเข้มข้น 50, 25 และ 12.5 µg/ml ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 5 ml โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

การเตรียมสารตัวอย่าง

เตรียมสารละลายของสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 200, 100, 50, 25 และ 12.5 µg/ml ตามลำดับ ความเข้มข้นละ 5 ml

สำหรับ acetone extract และ alcohol extract จะใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย ส่วนสารตัวอย่างที่เป็นwater extract จะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

วิธีการทดสอบ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 500 µl ใส่ใน eppendorf tube
2. เติมสารละลายของ DPPH ใน absolute ethanol 500 µl (final concentration คือ 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 µg/ml)
3. นำไป vertex ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm โดยใช้สารละลายตัวอย่าง 500 µl ผสมกับ absolute ethanol 500 µl เป็น blank
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและ controlที่ 520 nm โดยที่ control ethanol ประกอบด้วย ethanol 500 µl และ DPPH 500 µl และใช้ ethanol 1000 µl เป็น blank ส่วน control water ประกอบด้วย น้ำกลั่น 500 µl และ DPPH 500 µl และใช้น้ำกลั่น 500 µl ผสมกับ ethanol 500 µl เป็น blank

<u>หมายเหตุ</u> ในแต่ละความเข้มข้นจะทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

การคำนวณ

คำนวณหา % inhibition

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{\text{ODcontrol} - \text{ODsample}}{\text{ODcontrol}}\right] \times 100$$

คำนวณค่าเฉลี่ยของ % inhibition ในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำไปทำ linear regression เพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิด oxidation ได้ 50 % (EC_{50})

3. การสกัดแยกสาร

นำสารสกัดของสมุนไพรซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไปแยกสารแบบหยาบเพื่อแยกสารเป็น fraction หยาบๆ ตาม polarity ด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography โดยใช้ตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ n-hexane ใน chloroform , chloroform , chloroform ใน methanol และ methanol ในอัตราส่วนต่างๆกัน ตามลำดับ แล้วนำส่วนสกัดต่างๆที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตามข้อ 2 อีกครั้งเพื่อดูว่าส่วนใดเป็นส่วนที่ออกฤทธิ์จะได้แยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.1 การสกัดแยกสารด้วย Vacuum Liquid Chromatography

<u>วิธีทำ</u>

1. ชั่งสารสกัด 95% ethanol ของพริกไทยดำ จำนวน 10 g
2. ชั่ง silica gel G 9385 for column chromatography จำนวน 250 g
3. pack แบบแห้ง โดยใส่ silica gel ลงไปใน Sintered-glass funnel ขนาด 500 mlให้สูง ประมาณ 6-7 cm
4. เคาะเบาๆ เพื่อปรับผิวหน้าของ silica gel ให้เรียบ
5. ล้างด้วย n-hexane 2 ครั้ง แล้วดูดอากาศออก
6. เตรียม sample แบบแห้งโดยละลายสารสกัด (Ethanol extract ของ Black pepper) ใน methanol เล็กน้อย จนได้ของเหลวข้นหนืด
7. บดผสมกับ silica gel เล็กน้อยจนได้สารลักษณะผงแห้ง
8. โปรยสารสกัดที่เตรียมได้ลงบนผิวหน้าของ silica gel ปรับผิวหน้าให้เรียบเสมอกัน
9. แล้วชะสารด้วย solvent ชนิดต่างๆ แล้วเก็บ fraction ไว้ดังนี้

fraction I solvent ที่ใช้ n-hexane : chloroform = 3 : 1 ปริมาตร 800 ml (0.0010 g)

fraction II solvent ที่ใช้ chloroform ปริมาตร 400 ml (7.2850 g)

fraction III solvent ที่ใช้ chloroform : methanol = 1 : 1 ปริมาตร 400 ml (1.1632 g)

fraction IV solvent ที่ใช้ methanol ปริมาตร 400 ml (0.2063 g)

3.2 การสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์จาก fraction II

การสกัดแยกสาร fraction II ซึ่งได้จาก Ethanol extract ของ Black pepper เนื่องจาก fraction II แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารมาก จึงนำมาแยกต่อเป็นลำดับแรก (ดูจากตาราง 4)

3.2.1 การทำ column chromatography จาก fraction II

วิธีทำ

1. ชั่งสารสกัดของ Black pepper fraction II จำนวน 5 g
2. ชั่ง silica gel 60 (9385) for column chromatography ที่มี particle size ขนาด 0.040-0.063 mm จำนวน 150 g
3. pack column แบบเปียก โดยคน silica gel กับ n-hexane จนได้ slurry แล้วบรรจุใน column (5×50 cm)
4. load sample แบบเปียก
5. ปล่อยให้ solvent ชนิดต่างๆไหลผ่าน column แล้วเก็บ fraction fraction ละ 50 ml โดย solvent ที่ใช้ ได้แก่

n-hexane : chloroform = 4 : 1	ปริมาตร 500 ml	(fraction ที่ 1-12)
n-hexane : chloroform = 2 : 1	ปริมาตร 300 ml	(fraction ที่ 13-19)
n-hexane : chloroform = 1 : 1	ปริมาตร 400 ml	(fraction ที่ 20-27)
chloroform	ปริมาตร 400 ml	(fraction ที่ 28-36)
chloroform : methanol = 2 : 1	ปริมาตร 300 ml	(fraction ที่ 37)

6. รับเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยออกให้หมด
7. Fraction 17 ตกผลึกใน chloroform-methanol ได้ผลึก PN_2 0.396 g (piperine)

3.2.2 การทำ column chromatography จาก fraction 18-20

วิธีทำ

1. รวม fraction 18-20 ชั่งน้ำหนักได้ 1.2 g ตรวจสอบบน TLC และ detect ด้วย UV detector ความยาวคลื่น 254 nm
2. run โดยใช้ n-hexane : chloroform 4:1 โดยรับ fraction ละ 20 ml (fraction 1-68)

3.2.3 การทำ column chromatography จาก fraction 39-46 (จาก 3.2.2)

วิธีทำ

1. ชั่งสารfraction 39-46 ที่ได้จากการ run column (จาก 3.2.2)จำนวน 0.8978 g
2. ชั่ง silica gel 60 (9385) for column chromatography ที่มี particle size ขนาด 0.040-0.063 mm จำนวน 40 g
3. pack column แบบเปียก โดยคน silica gel 60 กับ hexane จนได้ slurry แล้วบรรจุใน column

4. load sample แบบเปียก
5. ปล่อยให้ solvent ชนิดต่างๆไหลผ่าน column แล้วเก็บ fraction fraction ละ 20 ml โดย solvent ที่ใช้ ได้แก่

hexane : chloroform = 2 : 1 ปริมาตร 900 ml

hexane : chloroform = 1: 1 ปริมาตร 1200 ml

chloroform ปริมาตร 300 ml

chloroform : methanol = 1: 1ปริมาตร 300 ml

6. รับเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยออกให้หมด (รวม 135 fractions)

3.2.4 การสกัดแยกโดยใช้ preparative TLC plate จาก fraction ที่ 117-118 (จาก 3.2.3)

<u>วิธีทำ</u>

1. รวม fraction ที่ 117-118 จากการ run column (จาก 3.2.3)ชั่งน้ำหนักได้ 0.3558 กรัม
2. run โดยใช้ hexane : chloroform : methanol = 10:10:0.5
3. ขูด plate และใช้ chloroform : methanol = 1:1 เป็นตัวชะ แบ่งได้เป็น 4 fraction คือ P_1-P_4

3.2.5 การสกัดแยกสารจาก fraction P_2 และ P_3 โดยใช้ preparative TLC

<u>วิธีทำ</u>

1. สารที่ใช้คือ P_2 (0.0371 g)

1.1 run โดยใช้ hexane : chloroform : methanol = 10:10:0.5

1.2 ขูด plate และใช้ chloroform : methanol = 1:1 เป็นตัวชะ ได้สาร PN_3

2. สารที่ใช้คือ P_3 (0.0399 g)

2.1 run โดยใช้ hexane : chloroform : methanol = 10:10:0.5

2.2 ขูด plate และใช้ chloroform : methanol = 1:1 เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ PN_4 (piperylin)

3.3 การทำ partition ของ water extract ของพริกไทยดำ

วิธีทำ

1. ใช้น้ำจำนวน 40 ml ละลายลงใน water extract ของ Black pepper
2. ผสม methanol ลงไป 10 ml จากนั้นเติม ethylacetate ลงไป(เพื่อสกัดสารพวก phenolic compounds หรือ flavonoids ออกมา) โดยเติมครั้งละ 100 ml ทำซ้ำ 7 ครั้ง
3. ดูดส่วนที่เป็นชั้น ethylacetate ใส่ flask แล้วเติม anhydrous sodium sulphate ลงไป แล้วกรอง
4. นำชั้น ethylacetate ไประเหยตัวทำละลายออก
5. จากนั้นดูดใส่ evaporating dish เก็บไว้ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ระเหยจนแห้ง

3.3.1 การทำ Column Chromatography ของสารสกัดที่ได้จากการทำ partition

วิธีทำ

1. ชั่งสารสกัดที่ได้จากการทำ partition ของ water extract ของพริกไทยดำกับ ethylacetate จำนวน 0.898 g
2. ชั่ง Silica gel 60 (9385) for column chromatography ที่มี particle size 0.040-0.063 mm จำนวน 50 g
3. pack column แบบเปียก โดยคน Silica gel 60 กับ chloroform จนได้ slurry แล้วจึงบรรจุใน column
4. load sample แบบแห้ง
5. ปล่อยให้ solvent ชนิดต่างๆ ไหลผ่าน column แล้วเก็บ fraction fraction ละ 20 ml โดย solvent ที่ใช้ ได้แก่

toluene : etylacetate = 3:1	ปริมาตร 800 ml
toluene : etylacetate : methanol = 3:1:2 ml	ปริมาตร 800 ml
toluene : etylacetate : methanol = 3:1:5 ml	ปริมาตร 400 ml
toluene : etylacetate : methanol = 3:1:10 ml	ปริมาตร 800 ml
toluene : etylacetate : methanol = 3:1:20 ml	ปริมาตร 800 ml

6. รวม fraction เข้าด้วยกันโดยรวม fraction 1-58, 59-123, 124-144 จะได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ
7. ได้ผลึกใน fraction 1-58 และชั่งน้ำหนักผลึกได้ 0.053 g (piperylin)

3.3.2 การสกัดแยกโดยใช้ Preparative TLC plate จาก fraction 1-58

<u>วิธีทำ</u>

1. รวม fraction 1-58 (supernatant) ชั่งน้ำหนักแห้งได้ 0.234 g
2. run โดยใช้ Toluene : ethylacetate = 3:1
3. ขูด plate และใช้ methanol : ethyacetate = 1:1 เป็นตัวชะ
4. เมื่อขูดสาร main ได้ชั่งน้ำหนักสารได้ 30 mg (PN_5) เก็บไว้ใน desiccator

บทที่5

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสกัดสาร

จากการสกัดพริกไทยดำ (900 กรัม) และพริกไทยล่อน (900 กรัม) ด้วย acetone, 95%ethanol และน้ำ จะได้ผลของการสกัดดังตารางที่ 1 พบว่า น้ำหนักของสารสกัดของพริกไทยดำด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระดีที่สุด

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละชนิดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

สารตัวอย่าง	น้ำหนักสารสกัด (g)
Black pepper : acetone extract	59.3
ethanol extract	21.6
water extract	20.9
White pepper : acetone extract	48.2
ethanol extract	14.3
water extract	6.8

หมายเหตุ : Acetone extract ของ white pepper เกิดการตกผลึกให้สารบริสุทธิ์ PN_1 หนัก 19.97 g (จากการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีในภายหลังพบว่าเป็น piperine ซึ่งเป็นสารตัวเดียวกับ PN_2)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพริกไทยดำและพริกไทยล่อน ซึ่งสกัดด้วย acetone, 95%ethanol และน้ำ ดังในตารางที่ 2

พบว่า สารสกัดจากพริกไทยดำด้วย น้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยมีค่า EC_{50}= 32.56 µg/ml รองลงมาคือ สารสกัดจากพริกไทยดำด้วย 95% ethanol มีค่า EC_{50} = 61.20 µg/ml ในขณะที่สารสกัดจากพริกไทยล่อนทั้งที่สกัดด้วย acetone, 95 % ethanol และน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำมาก โดยมีค่า EC_{50} > 100 µg/ml

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพริกไทยดำและพริกไทยล่อนซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆที่ความเข้มข้น 100 µg/ml

สารตัวอย่าง		ODเฉลี่ย (Mean ± SD)	%Scavenging (Mean ± SD)
พริกไทยดำ	: acetone extract	0.216 ± 0.007	26.30 ± 2.59
	ethanol extract	0.142 ± 0.002	71.78 ± 0.89
	water extract	0.053 ± 0.002	82.10 ± 0.84
พริกไทยล่อน	: acetone extract	0.237 ± 0.017	19.11 ± 6.06
	ethanol extract	0.216 ± 0.018	26.50 ± 6.30
	water extract	0.204 ± 0.007	31.70 ± 1.92
BHT (Positive control)		0.044 ± 0.001	85.00 ± 0.58

Note : BHT = Butylated hydroxytoluene

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 95% ethanol และสารสกัดน้ำของพริกไทยดำ

สารตัวอย่าง	Concentration (µg/ml)	ODเฉลี่ย (Mean ± SD)	%Scavenging (Mean ± SD)
สารมาตรฐาน (BHT)	12.5	0.231 ± 0.005	37.55 ± 1.53
	25	0.127 ± 0.002	65.67 ± 0.62
	50	0.059 ± 0.000	83.91 ± 0.15
	100	0.031 ± 0.001	91.64 ± 0.46
	EC_{50} , r	18.48 µg/ml,	0.9500
พริกไทยดำสกัดด้วยน้ำ	12.5	0.178 ± 0.002	21.92 ± 0.88
	25	0.118 ± 0.005	48.24 ± 2.28
	50	0.041 ± 0.001	82.01 ± 0.44
	100	0.030 ± 0.000	86.84 ± 0.00
	EC_{50} , r	32.56 µg/ml,	0.8641
พริกไทยดำสกัดด้วย 95% ethanol	12.5	0.212 ± 0.002	9.11 ± 089
	25	0.186 ± 0.011	20.22 ± 4.77
	50	0.125 ± 0.001	46.57 ± 0.73
	100	0.050 ± 0.001	78.62 ± 0.43
	EC_{50} , r	61.20 µg/ml,	0.9929

หลังจากที่นำสารสกัดของพริกไทยดำไปสกัดแยกสารอย่างหยาบ จะได้สารสกัด fraction ต่างๆ และได้นำสารสกัด fraction ต่างๆ ดังกล่าวกลับไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกครั้งหนึ่ง ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4

จากตารางที่ 4 พบว่า สารสกัดของพริกไทยดำ fraction IV มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า EC_{50} = 26.31 µg/ml ซึ่งดีกว่า crude extract (EC_{50} = 61.20 µg/ml)และสารสกัดใน fraction II และ III (EC_{50} = 98.96 µg/ml และ 89.64 µg/ml ตามลำดับ) แต่เนื่องจาก fraction III และ IV มีปริมาณสารน้อยจึงไม่ได้ทำการแยกต่อให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดหยาบ fraction ต่างๆจากพริกไทยดำซึ่งสกัดด้วย 95% ethanol

สารตัวอย่าง	Concentration (µg/ml)	ODเฉลี่ย (Mean ± SD)	%Scavenging (Mean ± SD)
Crude extract	12.5	0.212 ± 0.002	9.11 ± 089
	25	0.186 ± 0.011	20.22 ± 4.77
	50	0.125 ± 0.001	46.57 ± 0.73
	100	0.050 ± 0.001	78.62 ± 0.43
	EC_{50} , r	61.20 µg/ml,	0.9929
Fraction II	12.5	0.310 ± 0.000	4.90 ± 0.00
	25	0.293 ± 0.000	10.12 ± 0.44
	50	0.260 ± 0.003	20.09 ± 1.00
	100	0.156 ± 0.001	51.99 ± 0.20
	EC_{50} , r	98.96 µg/ml,	0.9937
Fraction III	12.5	0.343 ± 0.002	7.36 ± 0.56
	25	0.320 ± 0.002	13.65 ± 0.41
	50	0.251 ± 0.001	32.25 ± 0.16
	100	0.165 ± 0.001	55.61± 0.16
	EC_{50} , r	89.64 µg/ml,	0.9988
Fraction IV	12.5	0.254 ± 0.001	31.78 ± 0.39
	25	0.185 ± 0.002	49.40 ± 0.42
	50	0.063 ± 0.04	82.96 ± 0.97
	100	0.040 ± 0.001	89.19 ± 0.16
	EC_{50} , r	26.31 µg/ml,	0.8962

<u>หมายเหตุ</u> Fraction I ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากมีปริมาณน้อยมาก (ประมาณ 1 mg)

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้จาก fraction 17

สารตัวอย่าง	Concentration (µg/ml)	ODเฉลี่ย (Mean ± SD)	%Scavenging (Mean ± SD)
Fraction 17 (PN_2) (piperine)	12.5	0.328 ± 0.007	0.20 ± 0.17
	25	0.325 ± 0.004	1.51 ± 1.32
	50	0.305 ± 0.003	7.67 ± 0.92
	100	0.299 ± 0.001	9.18 ± 0.46
	EC_{50} , r	>100 µg/ml, 0.9083	

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้จาก fraction 117-118

สารตัวอย่าง	Concentration (µg/ml)	ODเฉลี่ย (Mean ± SD)	%Scavenging (Mean ± SD)
Fraction P_1 (alkaloid mixture)	12.5	0.365 ± 0.002	1.38 ± 1.01
	25	0.350 ± 0.004	5.71 ± 1.23
	50	0.343 ± 0.000	7.54 ± 0.00
	100	0.301 ± 0.007	18.68 ± 2.04
	EC_{50} , r	>100 µg/ml,	0.9861
PN_3 (alkaloid mixture)	12.5	0.370 ± 0.001	0.16 ± 0.29
	25	0.350 ± 0.004	5.47 ± 1.02
	50	0.321 ± 0.003	13.38 ± 0.87
	100	0.300 ± 0.009	19.04 ± 2.44
	EC_{50} , r	>100 µg/ml,	0.9567
PN_4 (piperylin)	12.5	0.351 ± 0.009	5.20 ± 2.55
	25	0.333 ± 0.002	10.15 ± 0.57
	50	0.293 ± 0.003	21.84 ± 0.82
	100	0.259 ± 0.003	30.09± 0.86
	EC_{50} , r	>100 µg/ml,	0.9679
Fraction P_4 (alkaloid mixture)	12.5	0.332 ± 0.004	10.51 ± 0.97
	25	0.312 ± 0.004	15.72 ± 1.02
	50	0.263 ± 0.003	28.92 ± 0.86
	100	0.180± 0.002	51.48 ± 0.47
	EC_{50} , r	96.33 µg/ml,	0.9994

หมายเหตุ : รายละเอียดของ fraction ดูได้จากขั้นตอนการทดลอง

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากการทำ partition สารสกัดชั้นน้ำจากพริกไทยดำกับ ethylacetate

สารตัวอย่าง	Concentration (µg/ml)	ODเฉลี่ย (Mean ± SD)	%Scavenging (Mean ± SD)
สารที่ได้จากการ partition สารสกัดชั้นน้ำจาก พริกไทยดำด้วยethylacetate (ดูข้อ 3.3)	12.5	0.150 ± 0.001	52.97 ± 0.36
	25	0.104 ± 0.002	67.18 ± 0.72
	50	0.045 ± 0.001	85.88 ± 0.31
	100	0.030 ± 0.000	90.59 ± 0.00
	EC_{50} , r	7.427 µg/ml, 0.9937	

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้จากการทำ preparative TLC จาก fraction 1-58

สารตัวอย่าง	Concentration (µg/ml)	ODเฉลี่ย (Mean ± SD)	%Scavenging (Mean ± SD)
PN_5 (alkaloid mixture)	12.5	0.220 ± 0.009	5.69 ± 3.88
	25	0.213 ± 0.002	8.83 ± 0.66
	50	0.191 ± 0.004	18.37 ± 1.54
	100	0.165 ± 0.005	29.48 ± 1.96
	EC_{50} , r	>100 µg/ml, 0.9927	

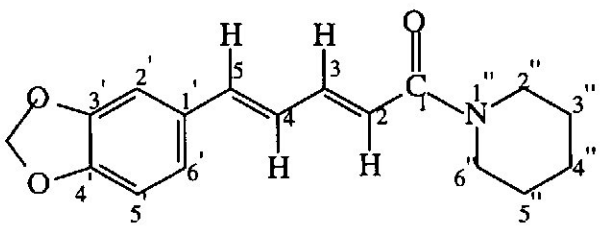
3. การพิสูจน์เอกลักษณ์สูตรโครงสร้างทางเคมี

จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของสารสกัด 95% ethanol และสารสกัดชั้นน้ำของพริกไทยดำ สามารถแยกสาร PN_1-PN_5 ออกมาได้ โดยสารเหล่านี้ให้ผล positive เมื่อทดสอบด้วย Dragendorff 's reagent จึงสันนิษฐานได้ว่าสาร PN_1-PN_5 น่าจะเป็นสารในกลุ่ม alkaloids เมื่อนำสารเหล่านี้มาศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้ ^{1}H-NMR spectrometry พบว่าสาร PN_1 และ PN_2 เป็นสารชนิดเดียวกันคือ piperine ซึ่งเป็น main alkaloid ของผลและเมล็ดพริกไทย ส่วน PN_3 และ PN_5 เป็น alkaloid mixture ซึ่งไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากสารเหล่านี้สลายตัวได้ง่าย ส่วน PN_4 พบว่าเป็นสาร piperylin (หรือ trichostachine)

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดคือ piperine (PN_1 และ PN_2) และ piperylin (PN_4) ทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า chemical shift ของ ^{1}H-NMR ที่มีรายงานมาแล้ว (Kiuchi *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตามพบว่า ^{1}H - และ ^{13}C-assignments ที่รายงานมาก่อนหน้านี้ยังไม่มีความสมบูรณ์ กล่าวคือเพียงแต่รายงานค่า chemical shift โดยไม่ได้ระบุให้แน่ชัดว่าเป็นของ proton หรือ carbon ตำแหน่งใด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของ piperylin นั้นพบว่ามีรายงานแต่เพียง ^{1}H-NMR เท่านั้น ส่วนค่า chemical shift ของ ^{13}C-NMR ยังไม่มีรายงาน

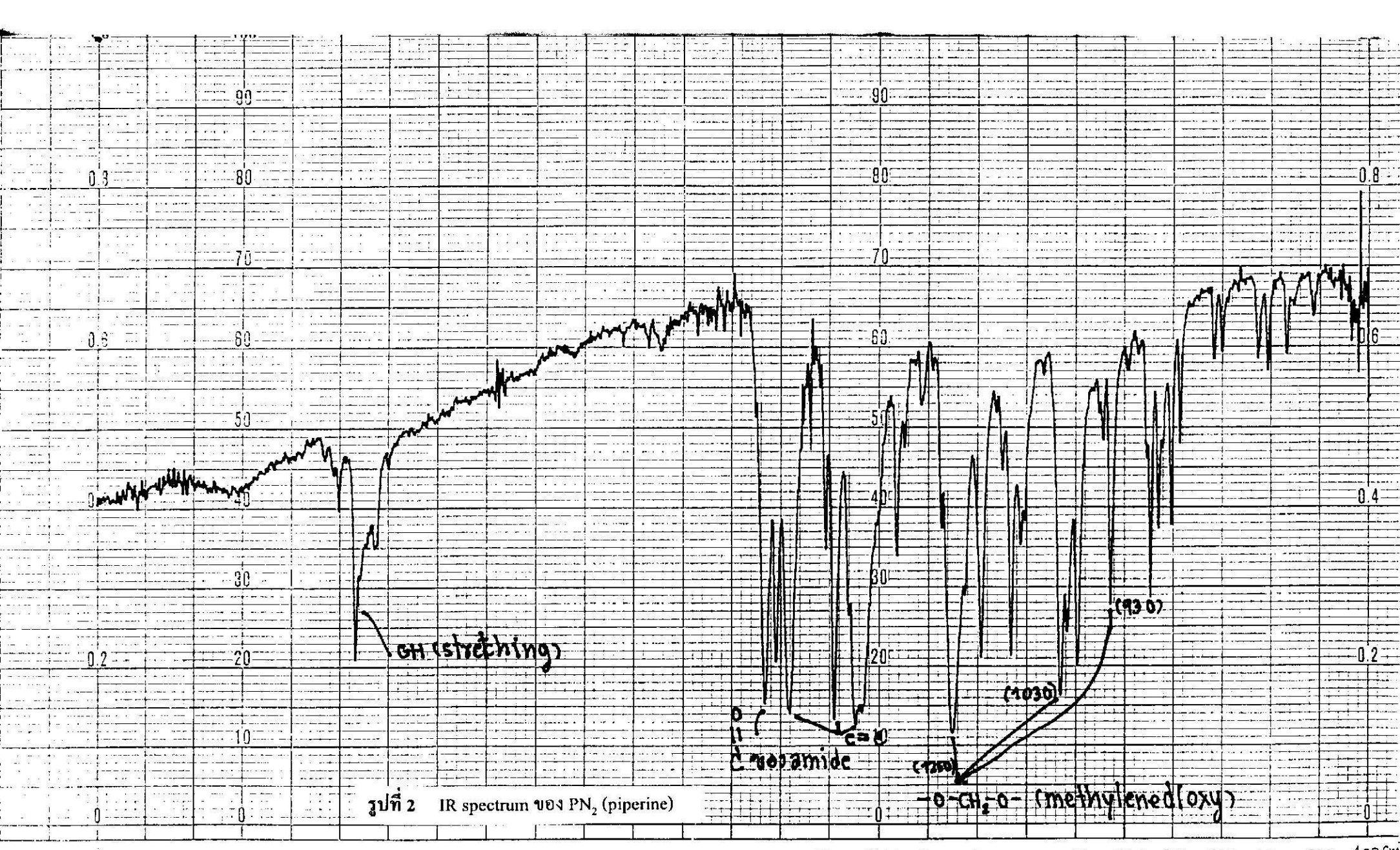
ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พยายามใช้เทคนิคทาง spectroscopy โดยเฉพาะอย่างยิ่ง electron impact mass spectrometry (EI-MS), ^{1}H - ^{1}H COSY และ DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer) เข้ามาช่วยเพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการระบุตำแหน่งของ proton และ carbon ได้อย่างถูกต้อง ส่วนการกำหนดตำแหน่งของ quaternary carbon จะอาศัยการเปรียบเทียบกับสารที่มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกันที่แยกได้จาก *Piper retrofractum* (Banerji *et al.*, 1985)

ค่า chemical shift ของ proton และ carbon ของสาร piperine (PN_1 และ PN_2) และ piperylin (PN_4) ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 10-13



สูตรโมเลกุล	$C_{17}H_{19}NO_3$
น้ำหนักโมเลกุล	285

โครงสร้างของ piperine และหมายเลขตำแหน่งต่างๆ

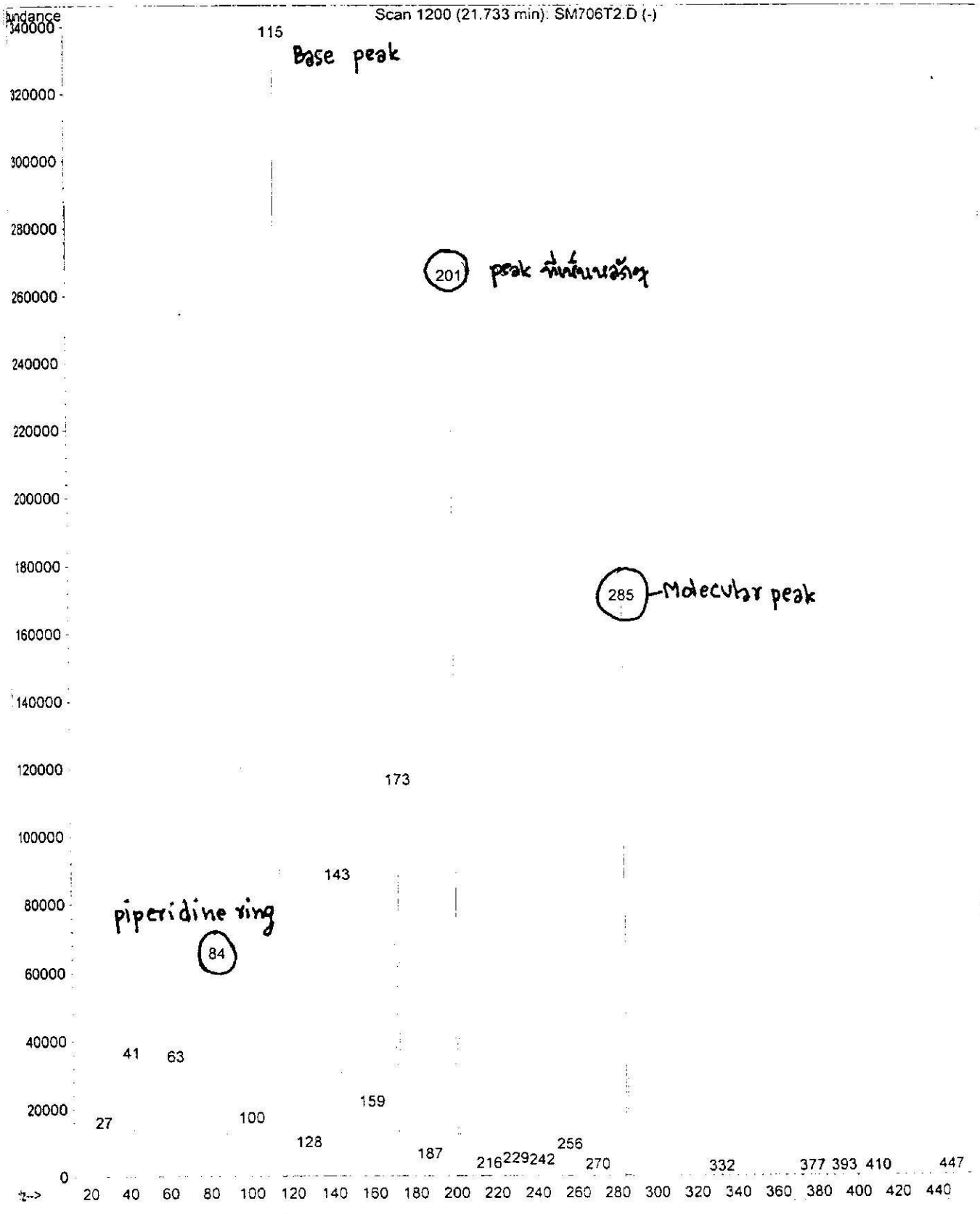


รูปที่ 2 IR spectrum ของ PN_2 (piperine)

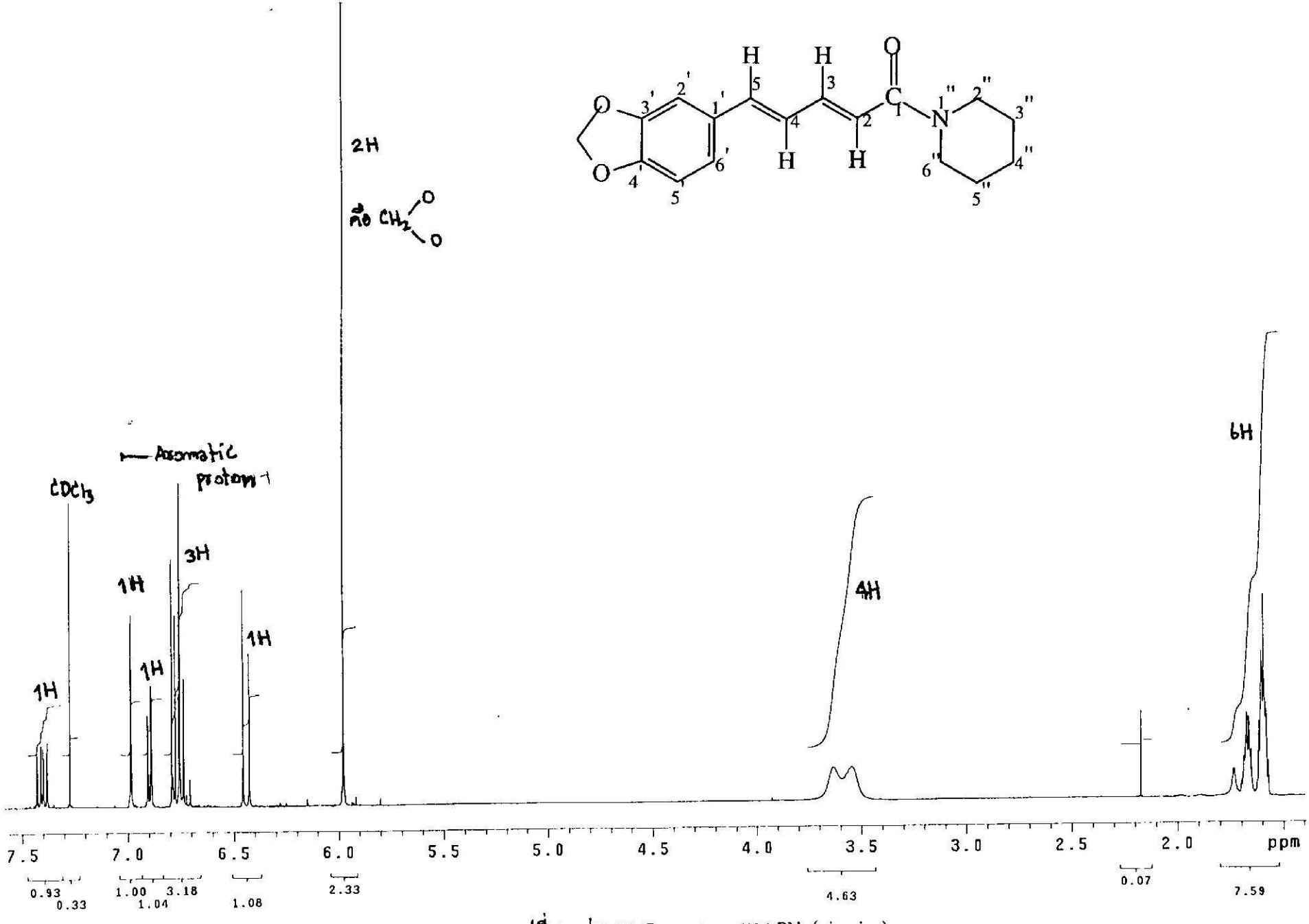
KBr disk Wavenumber 4000 - 400 cm^{-1} ตัวอย่าง White pepper + Acetone

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

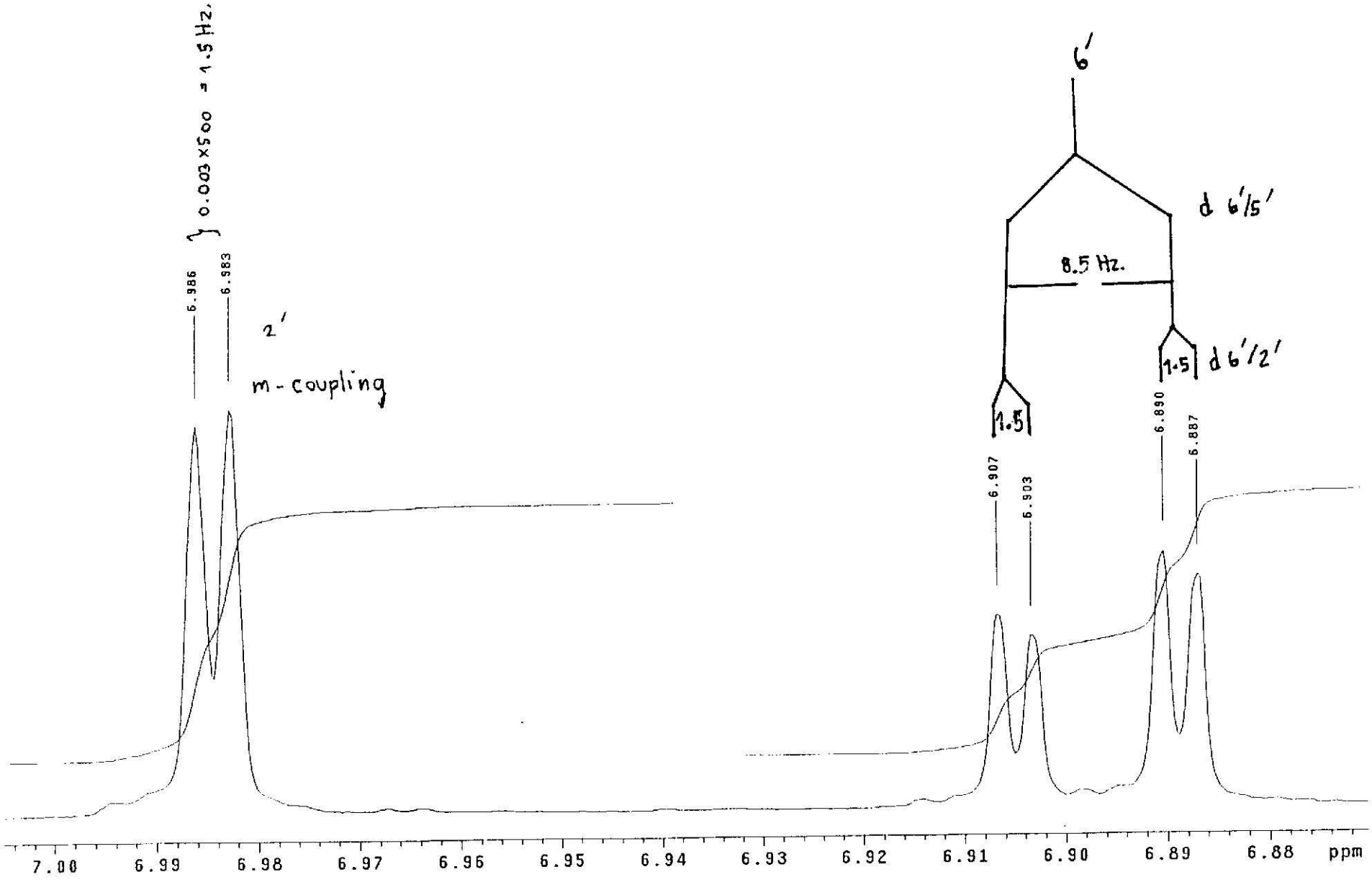
ile : C:\HPCHEM\1\DATA\SM706T2.D
perator :
cquired : 11 Nov 99 1:10 am using AcqMethod HP-1
nstrument : GC/MS Ins
ample Name: sample PN2 (MODE EI+)
sc Info :
ial Number: 1



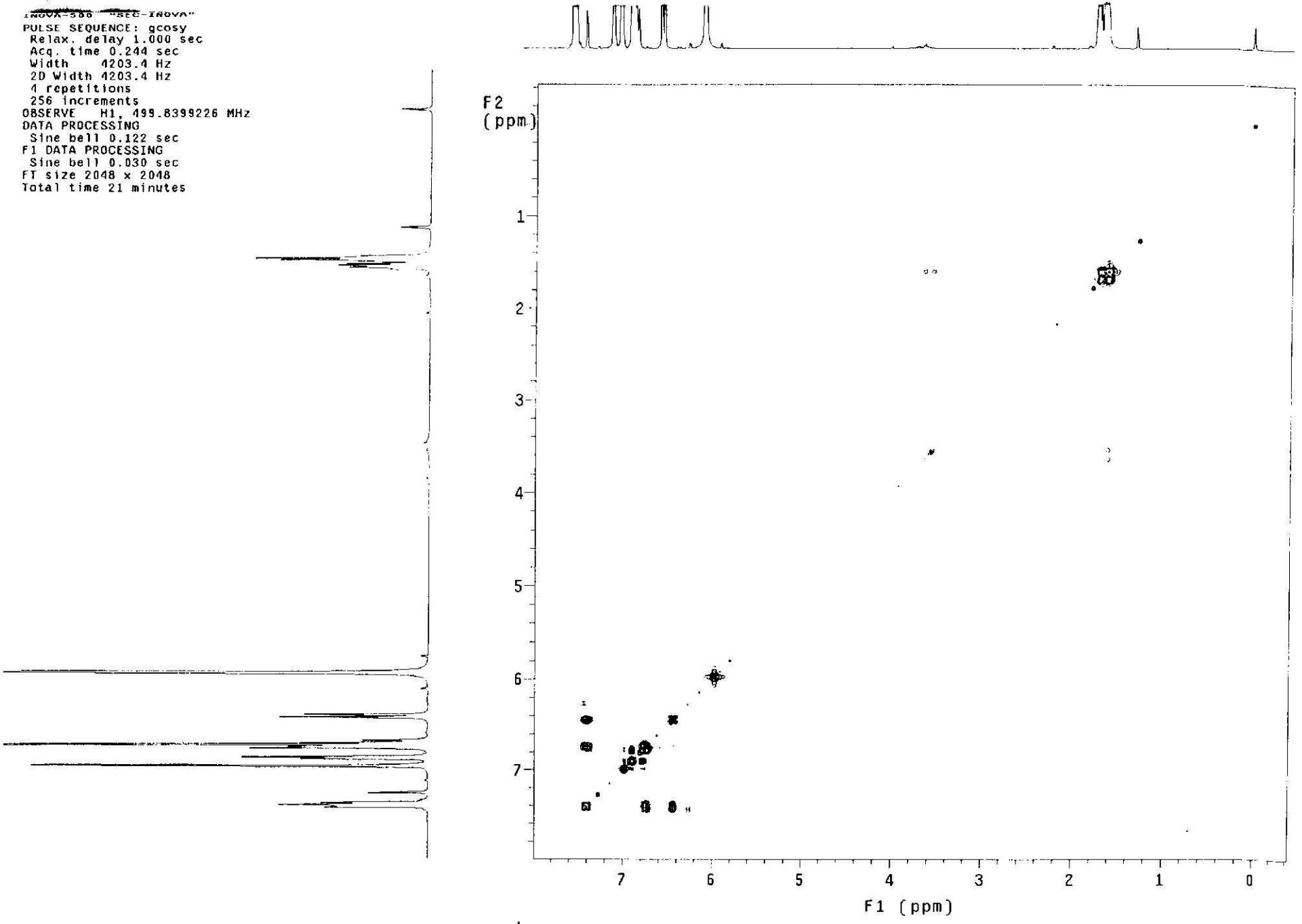
รูปที่ 3 Mass spectrum ของ PN_2 (piperine)



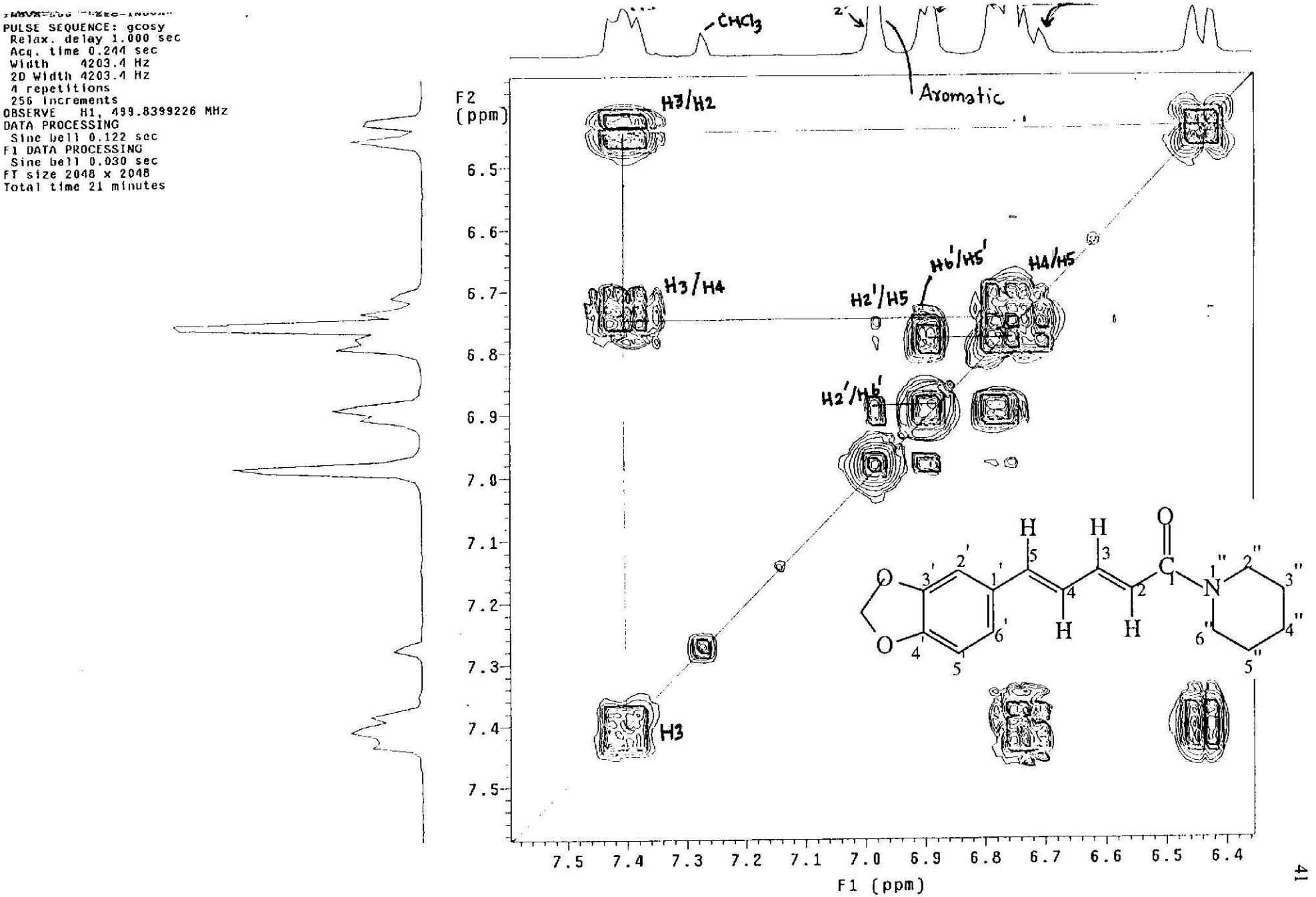
รูปที่ 4 ^{1}H-NMR spectrum ของ PN_2 (piperine)



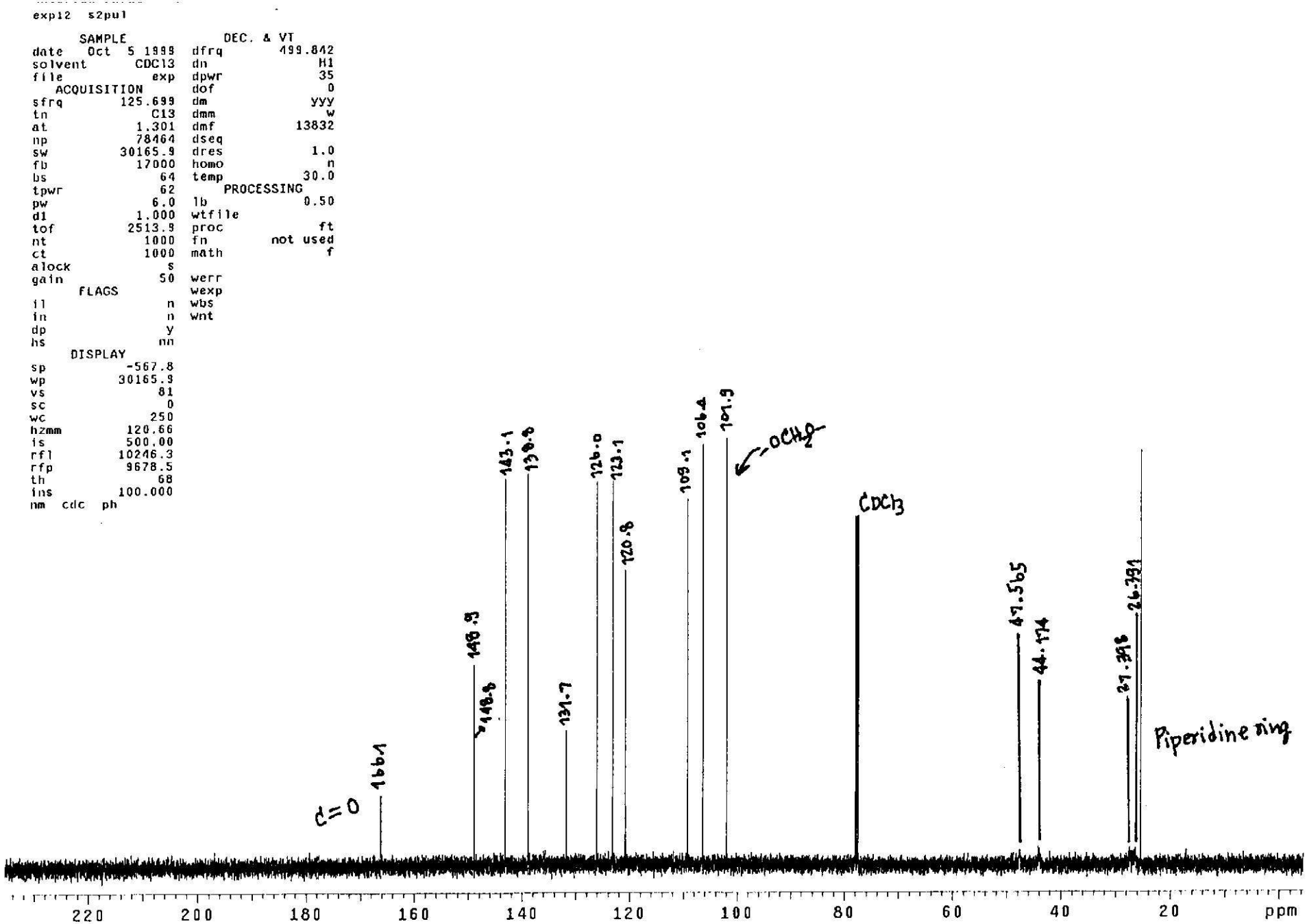
รูปที่ 5 ลักษณะการ coupling ของโปรตรอนใน Aromatic ring ของ PN_2 (piperine)



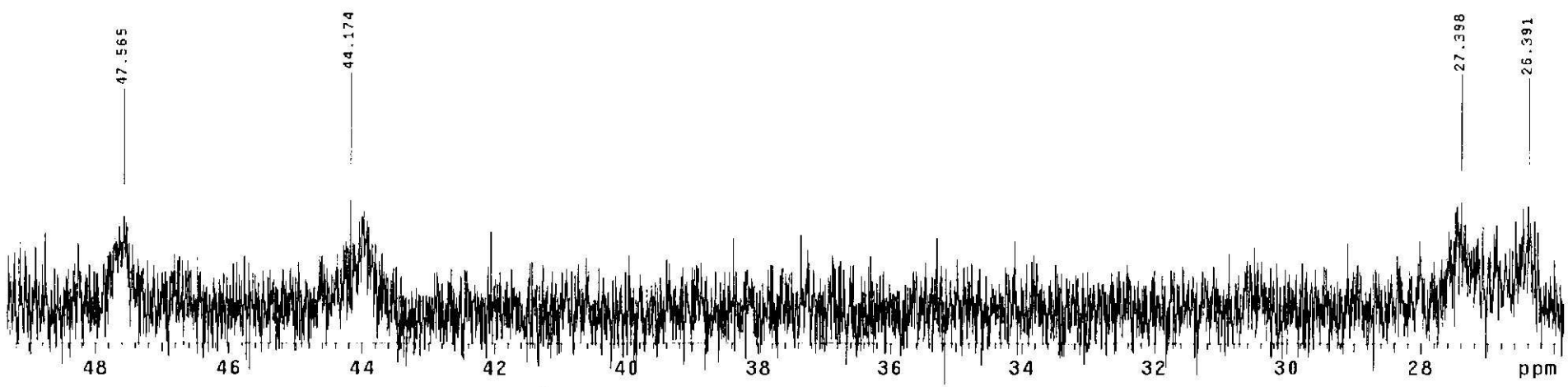
รูปที่ 6 ^{1}H - ^{1}H COSY ของ PN_2 (piperine)



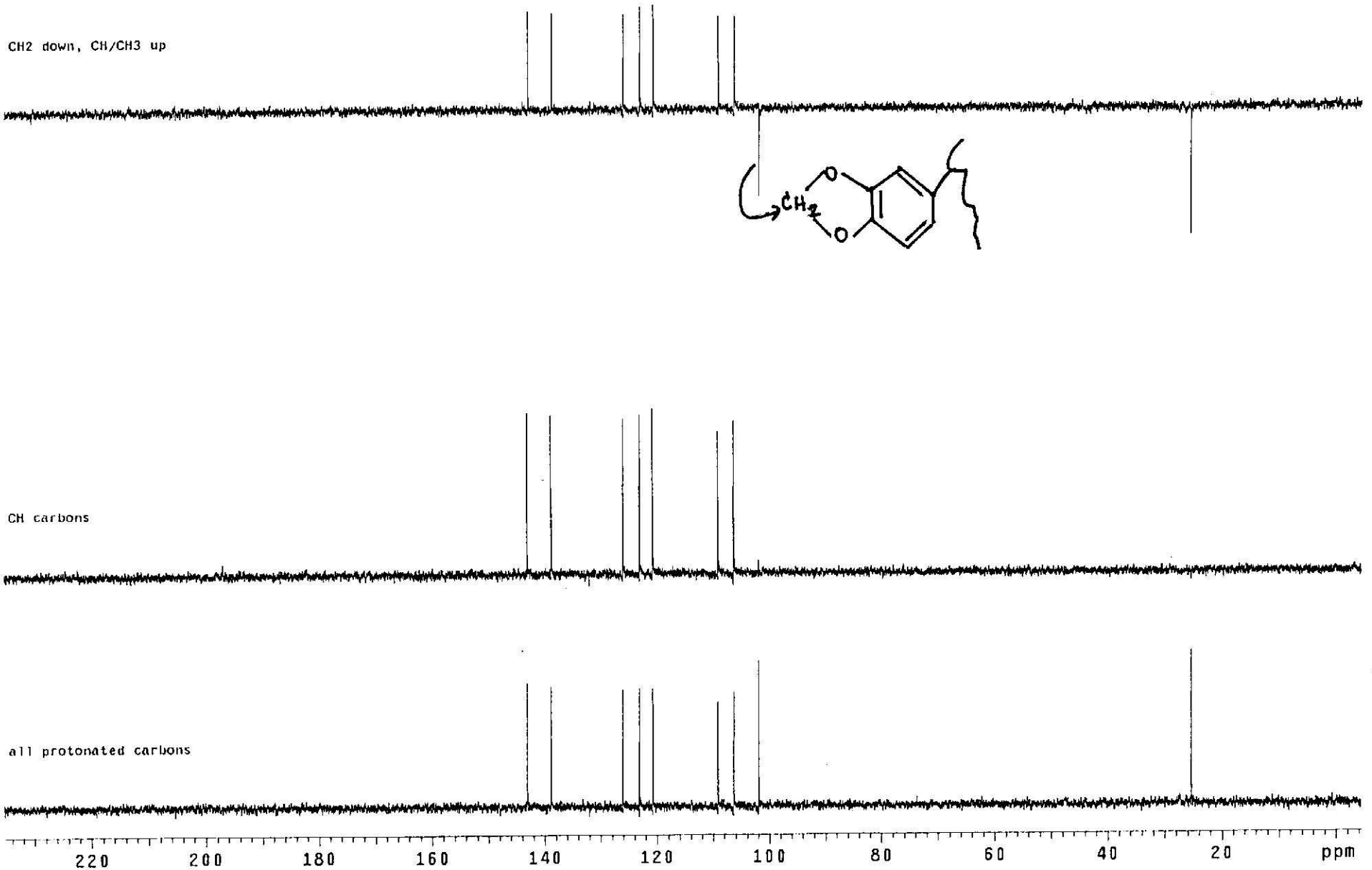
รูปที่ 7 ^{1}H - ^{1}H COSY ของ PN_2 (piperine) : ขยายในส่วนของ downfield region



รูปที่ 8 ^{13}C-NMR spectrum ของ PN_2 (piperine)



รูปที่ 9 ภาพขยายของ ^{13}C-NMR ของ piperidine ring ของ PN_2(piperine)



รูปที่ 10 DEPT spectrum ของ PN, (piperine)

ตารางที่ 9 แสดง functional group ใน IR spectrum (KBr) ของ PN_2 (piperine)

functional group (cm^{-1})	Wavenumber (cm^{-1})
C-H stretching	3100-3000
C=C stretching	1650-1450
C=O	1635
OCH_2O (methylenedioxy)	1250, 1030, 930

ตารางที่ 10 แสดง ^{1}H-NMR assignments ของ piperine

PN_2 (piperine) : 500 MHz $C_{17}H_{19}NO_3$

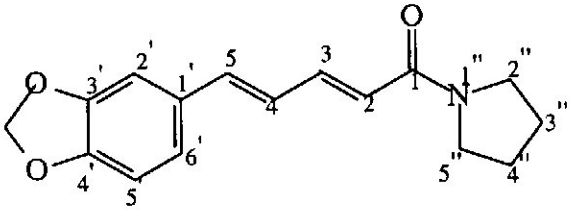
Chemical shift (ppm)	Proton (J in Hz)
7.41	H-3 (1H, ddd, 15, 9, 1)
6.98	H-2' (1H, d, 1.5)
6.90	H-6' (1H, dd, 8.5, 1.5)
6.78	H-5' (1H, d, 8.5)
6.76-6.73	H-4, H-5 (2H,m)
6.45	H-2 (1H, d, 15)
5.97	-O-CH_2-O- (2H, s)
3.68-3.51	H-2'', H-6'' (4H, m)
1.76-1.57	h-3'', H-4'', H-5'' (6H, m)

ตารางที่ 11 แสดง ^{13}C-NMR assignments ของ piperine

Chemical shift (ppm)	^{13}C-NMR
166.1	C(1)
148.9	C(3')
148.8	C(4')
143.1	C(3)
138.8	C(5)
131.7	C(1')
126.1	C(4)
123.1	C(2)
120.8	C(6')
109.1	C(5')
106.4	C(2')
101.9	-O-CH_2-O-
47.5(w) [a]	C(2'')
44.1(w) [a]	C(6'')
27.3(w) [b]	C(3'')
26.3(w) [b]	C(5'')
25.2	C(4'')

a, b : Assignments may be interchanged

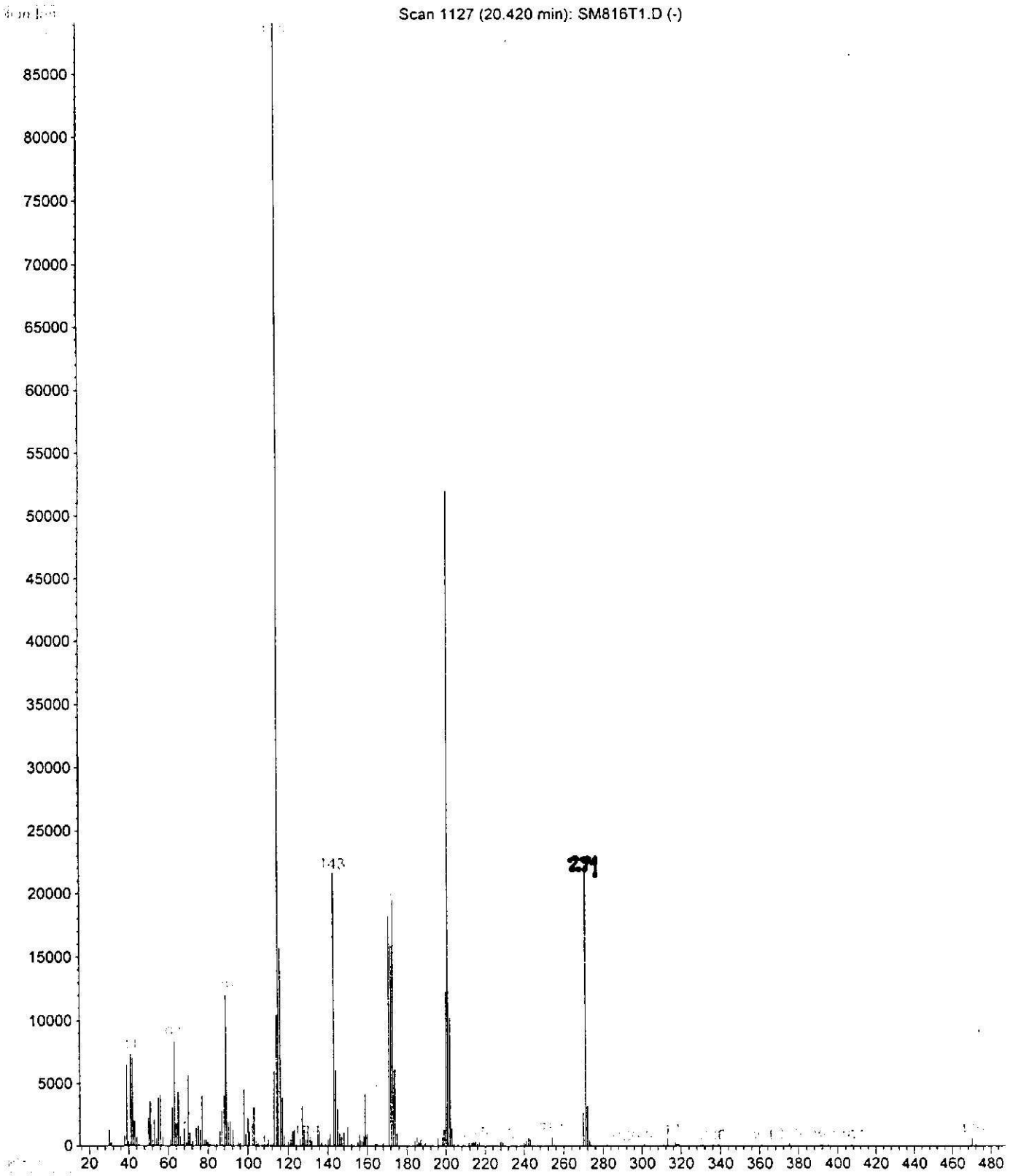
w : weak signals



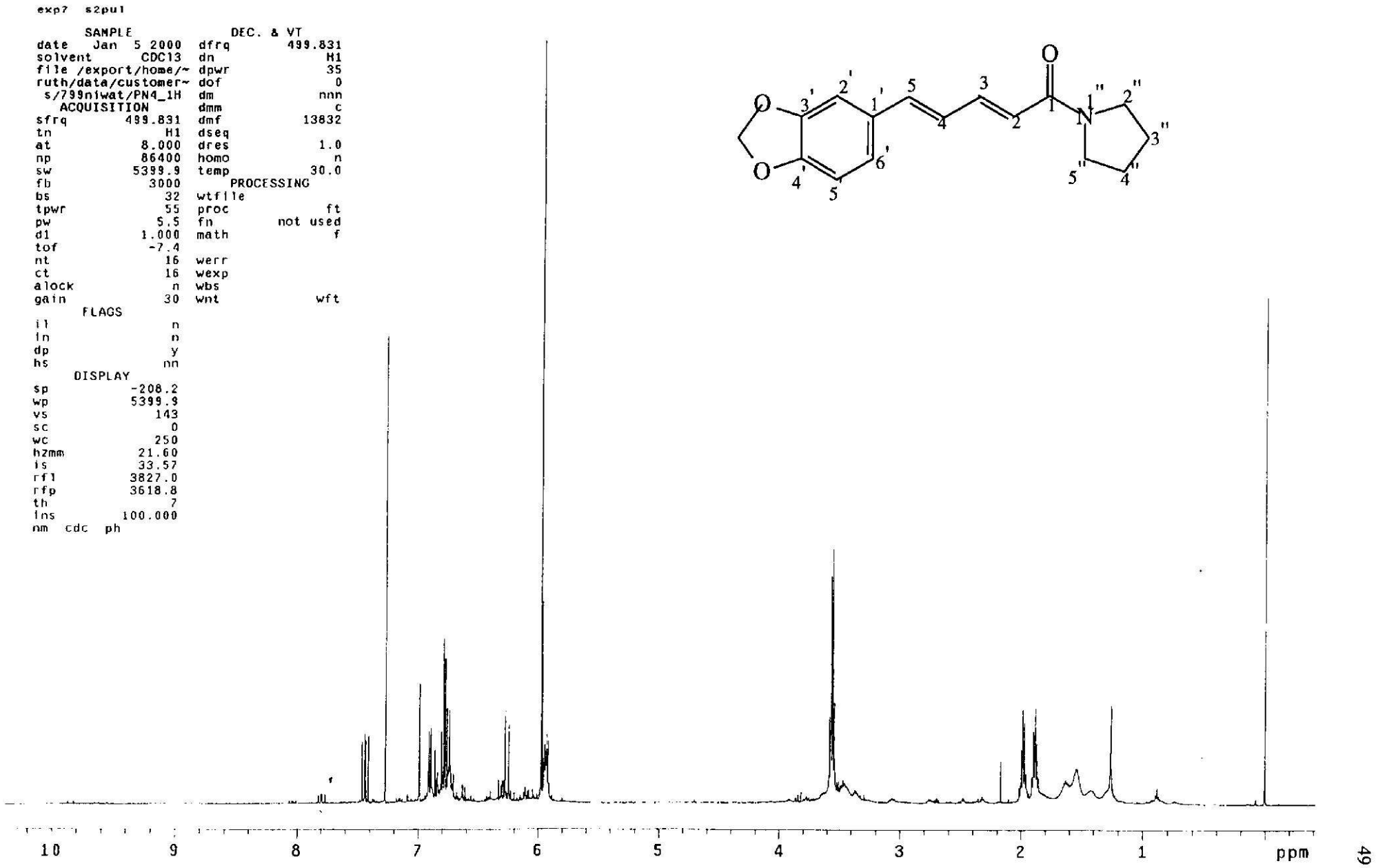
สูตรโมเลกุล	$C_{16}H_{17}NO_3$
น้ำหนักโมเลกุล	271

โครงสร้างของ PN_4 (piperylin) และหมายเลขตำแหน่งต่างๆ

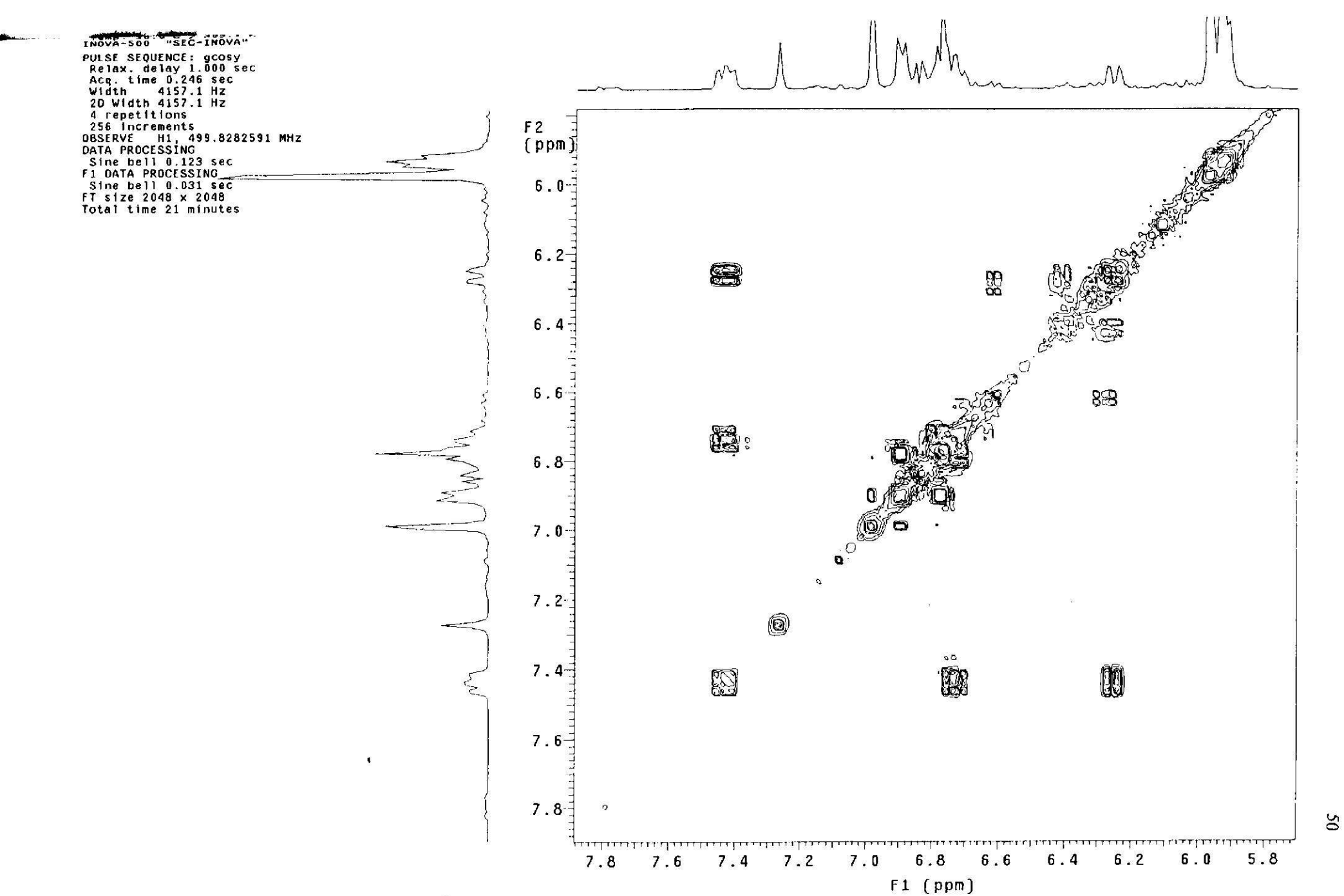
```
File       : C:\HPCHEM\1\DATA\SM816T1.D
Operator   :
Acquired   : 19 Jan 00    4:47 am using AcqMethod HP-1
Instrument :   GC/MS Ins
Sample Name: sample pn 4
Misc Info  :
Vial Number: 1
```



รูปที่ 11 Mass spectrum ของ PN_4 (piperylin)



รูปที่ 12 ^{1}H-NMR spectrum ของ PN_4 (piperylin)

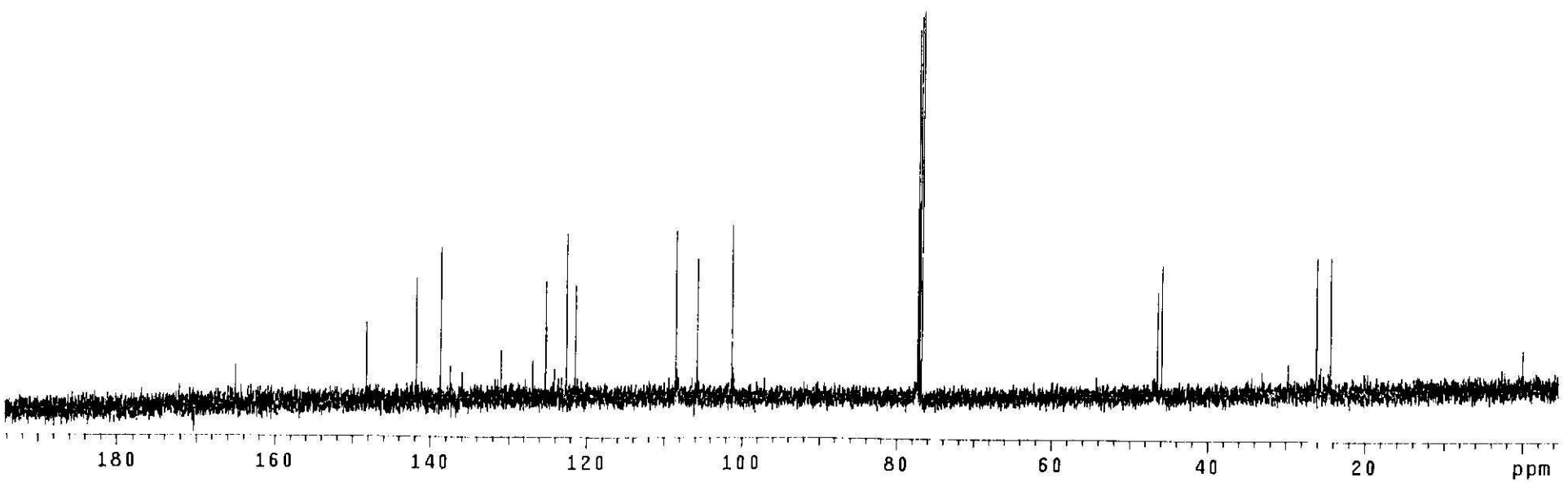


รูปที่ 13 ^{1}H - ^{1}H Cosy ของ PN_4 (piperylin) : ขยายในส่วนของ downfield region

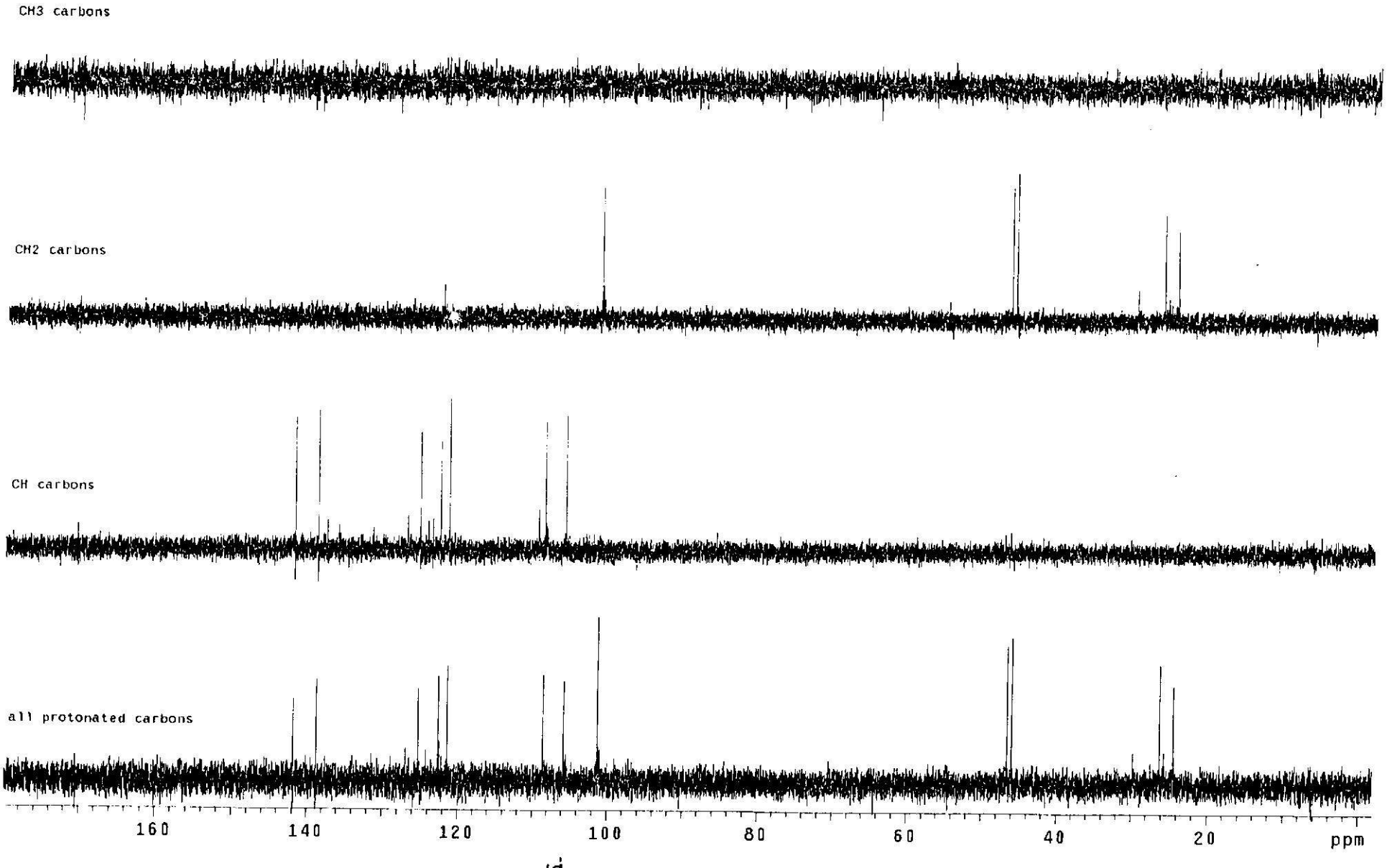
exp8 s2pul

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Jan 6 2000	dfrq	499.831
solvent	CDCl3	dn	H1
file	exp	dpwr	35
ACQUISITION		dof	0
sfrq	125.694	dm	yyy
tn	C13	dmm	w
at	1.300	dmf	13832
np	65024	dseq	
sw	25000.0	dres	1.0
fb	14000	homo	n
bs	64	temp	30.0
tpwr	62	PROCESSING	
pw	6.0	lb	0.50
d1	1.000	wtfile	
tof	0	proc	ft
nt	1000	fn	not used
ct	1000	math	f
alock	n		
gain	56	werr	
FLAGS		wexp	
il	n	wbs	
in	n	wnt	
dp	y		
hs	nn		
DISPLAY			
sp	-584.4		
wp	25000.0		
vs	63		
sc	0		
wc	250		
hzmm	100.00		
is	500.00		
rfl	584.4		
rfp	0		
th	68		
ins	100.000		

nm cdc ph



รูปที่ 14 ^{13}C-NMR spectrum ของ PN, (pipervlin)



รูปที่ 15 DEPT spectrum ของ PN_4 (piperylin)

ตารางที่ 12 แสดง ^{1}H-NMR assignments ของ piperylin

PN_4:Piperylin $C_{16}H_{17}NO_3$

Chemical shift (ppm)	Proton (J in Hz)
7.44	H-3 (1H, ddd, 15, 9.5, 0.5)
6.99	H-2' (1H, d, 1.5)
6.90	H-6' (1H, dd, 8.5, 1.5)
6.79	H-5' (1H, d, 8.5)
6.78-6.75	H-4, H5 (2H, m)
6.26	H-2 (1H, d, 15)
5.98	-O-CH_2-O- (2H, s)
3.59-3.54	H-2'',H-5'' (4H, m)
2.01-1.85	H-3'', H-4'' (4H,m)

ตารางที่ 13 แสดง ^{13}C-NMR assignments ของ piperylin

Chemical shift (ppm)	^{13}C-NMR
165.0	C(1)
148.2	C(3')
148.1	C(4')
141.8	C(3)
138.7	C(5)
131.1	C(1')
125.2	C(4)
122.5	C(2)
121.4	C(6')
108.5	C(5')
105.7	C(2')
101.3	-O-CH_2-O-
46.5 [a]	C(2'')
45.9 [a]	C(5'')
26.1 [b]	C(3'')
24.3 [b]	C(4'')

a, b : Assignments may be interchanged

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกไทย (*Piper nigrum*) พบว่า พริกไทยดำ (black pepper) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าพริกไทยล่อน (white pepper) ส่วนพริกไทยล่อนแทบจะไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (EC_{50} > 100 µg/ml) ซึ่งถ้าจะใช้พริกไทยเพื่อหวังผล antioxidant แนะนำให้ใช้พริกไทยดำ
2. ได้กำหนดตำแหน่งของ C และ H ในโมเลกุลของ piperine และ piperylin ที่แยกได้อย่างครบถ้วนโดยใช้เทคนิค NMR ซึ่งรายงานการวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ยัง assign ไว้ไม่สมบูรณ์
3. สารกลุ่ม alkaloids ที่มีอยู่ในพริกไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำมาก จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น marker ในการกำหนดมาตรฐานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกไทย
4. สามารถแยกสารได้ 2 ชนิดจาก active fraction คือ piperine และ piperylin แต่น่าจะไม่ใช่สารที่ออกฤทธิ์โดยตรง ซึ่งสารที่ออกฤทธิ์โดยตรงน่าจะอยู่ใน fraction ที่มีความเป็นขั้วสูง ซึ่งพยายามแยกสารเหล่านี้ออกมาแต่ยังไม่สำเร็จ แต่คาดว่าในโครงสร้างน่าจะมี OH-group อยู่เพราะ spray ด้วย Anisaldehyde-Sulphuric acid reagent แล้วพบว่า บาง spot จะให้สีม่วงน้ำเงิน ซึ่งถ้าแยกออกมาได้สามารถใช้เป็น marker ในการกำหนดมาตรฐานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพริกไทยดำได้

เอกสารอ้างอิง

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธและกองบรรณาธิการ " สมุนไพร อันดับที่ 02 การรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นสำหรับงานวิจัย " ของโครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ห้างหุ้นส่วน โรงพิมพ์ยูไนเต็ทโปรดักชั่น, กรุงเทพมหานคร (2524) หน้า 111-117.

นิจศิริ เรืองรังษี . เครื่องเทศ. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ (2534) หน้า 90-94.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K ., Hagen, T.M. Oxidant,antioxidants and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993):7915-7922.

Banerji, A., Bandyopadhyay, D., Sarkar, M., Siddhanta, A.K., Pal, S.C., Ghosh, S., Abraham, K., Shoolery, J.N. Stuctural and synthetic studies on the retrofractamides-amide constituents on *Piper retrofractum*. Phytochemistry.24 (1985):279-284.

Dictionary of Natural Products (CD-ROM, 1998). Chapman and Hall, London.

Kiuchi, F., Nakamura, N., Tsuda, Y., Kondo, K., Yoshimura, H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. IV. Isolation and identifiication of larvicidal principles in pepper.Chem. Pharm. Bull. 36(1988):2452-2465.

Lin, Z., Hoult, J.R.S., Bennett, D.C., Raman, A. Stimulation of mouse melanocyte proliferation by *Piper nigrum* fruit extract and its main alkaloids, piperine. Planta Med.65(1999):600-603

Perez, C., Anesini, C. Antibacterial activity of alimentary plants *Staphylococcus aureus* growth. American Journal of Chinese Medicine.22(1994):169-174

Pradhan, K.J., Variyar, P.S., Bandekar, J.R. Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper (*Piper nigrum* L.). Lebensmittel Wissenschaft and Technologie.32(1999):121-123.

Tewtrakul, S. Antioxidant activity of selected *Piper* species. Songklanakarin J. Sci. Technol.20(1998) : 177-181.

Thai Herbal Pharmacopoeia.vol. 1(1995):57-64.

Upston, J.M., Gero, A.M. Parasite-induced permeation of nucleosides in *Plasmodium falciparum* malaria. Biochim Biophys Acta.1236(1995):249-58.

Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T., Sato, T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs.Chem. Pharm. Bull. 42(1994):1663-1665.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย DPPH ใน ethanol ให้มีความเข้มข้น 6×10^{-5}M

การคำนวณ

$$\text{จำนวนโมล} = \frac{\text{น้ำหนักของสาร (g)}}{\text{น้ำหนักโมเลกุล}}$$

น้ำหนักโมเลกุลของ DPPH = 394.32

น้ำหนักของสาร(g) = 6×10^{-5} mole/L $\times$ 394.2 g/mole

= 0.024 g/L

ถ้าต้องการเตรียมสารละลาย DPPH จำนวน 150 ml

$$\text{จะต้องชั่ง DPPH} = \frac{0.024\text{ g} \times 150\text{ ml} \times 1000}{1000\text{ ml}}$$

= 3.6 mg

ต้องชั่ง DPPH 3.6 mg ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 150 ml ด้วย absoluted ethanol เก็บไว้ในขวดสีชา และควรเตรียมทันทีก่อนใช้

การเตรียม Anisaldehyde – Sulphuric Acid Reagent

10%Anisaldehyde in conc. H_2SO_4 ประกอบด้วย

Anisaldehyde	0.5 ml
Methanol	85 ml
Glacial acetic acid	10 ml
Conc. H_2SO_4	5 ml

การเตรียม preparative TLC plate (ความหนา 0.5 mm)

Kieselgel 60 GF_{254}	Art 7730	70 g
Water		140 ml

เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว จึงนำไปลาก plate วางไว้ให้แห้ง นำไป activate ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง