



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

"การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืช *Dasymaschalon echinatum*
และ *Tacca integrifolia* และศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ"

โดย ดร. ถาวร ใจเพชร และคณะ

พฤษภาคม พ.ศ. 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

"การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืช *Dasymaschalon echinatum*
และ *Tacca integrifolia* และศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ"

คณะผู้วิจัย

1. ดร. ถาวร ใจเพชร
2. รศ. ดร.ชุตินา คูกากาญจน์
3. ผศ.ดร. วัชระ จินตโกวิท

สังกัด

มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี
ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นชอบด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนเงินสนับสนุนงานวิจัย ผ่านทุนวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์ "สมุนไพร ยารักษาโรคและสารเสริมสุขภาพ" (สัญญาเลขที่ DBG5480014) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมีสำหรับการสนับสนุนด้านเครื่องมือในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. วิชัย รวีตระกูล ที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ ในงานวิจัย

ดร. ถาวร ใจเพชร

Executive Summary

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาสารสกัดและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบในพืช 2 ชนิดคือ *Dasymaschalon echinatum* และ *Tacca integrifolia* 2) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ Anti-inflammatory, Anti-infection, Anti-cancer, Anti-HIV RT และ Anti-oxidant จากพืชทั้ง 2 ชนิด โดยพิจารณาประสิทธิภาพของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นเกณฑ์ในการแยก ซึ่งใน *Dasymachalon echinatum* ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างพืชใช้ทุกส่วนของพืช ทำการสกัดแช่ (Percolation) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เมทานอล (Methanol) สารสกัดหยาบในชั้นเมทานอล (MeOH extracts) ได้ปริมาณ 430.86 g และทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบและแยกสารบริสุทธิ์ ในสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate แยกได้สารประกอบ Aristolactam A II, Aristolactam B II และสารผสมของ β -Sitosterol และ Stigmasterol glucoside และสารสกัดหยาบชั้น 50% เมทานอล-เอทิลอะซิเตต ได้สารประกอบ Piperolactam C, Asperphenamate, N-benzoyl-L-phenylalninol, , Goniopedaline, Piperolactam A, Noraristolodione, Duguevalline ซึ่งผลงานดังกล่าวได้ถูกตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ส่วนพืช *Tacca integrifolia* ทำการเก็บตัวอย่างพืช ส่วนที่เก็บแบ่งเป็น ราก และใบ ทำการสกัดแช่ (Percolation) ส่วนรากและใบ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เพิ่มลำดับความเป็นขั้วของสารละลาย ซึ่งหลังจากระเหยตัวทำละลายแล้วได้สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตต เมทานอล (ดูในการทดลอง) สารสกัดจากรากชั้น methanol ได้สารประกอบดังนี้คือ β -sitosterol glucoside, saponin (25S) , Chantrieroside, Pregnane Glucoside (sugar 3 units), C-24 hydroxy derivative of saponin และ diastereoisomer (25S และ 25R) ของ saponin , C-25 hydroxy derivative of saponin และ Pregnane Glucoside (sugar 4 units). โดยในส่วนของการวิจัยใน *Tacca integrifolia* นั้นอยู่ในขั้นตอนเตรียมส่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

สารบัญ

หัวข้อ	หน้าที่
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
วิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	6
- การศึกษาสารสกัดและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช <i>Dasymachalon echinatum</i>	6
- การศึกษาสารสกัดและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช <i>Tacca integrifolia</i>	22
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

หัวข้อ	หน้าที่
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ <i>Dasymaschalon echinatum</i>	6
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Anti-HIV-I-RT ของ <i>Dasymaschalon echinatum</i>	6
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Anti inflammatory ของ <i>Dasymaschalon echinatum</i>	7
ตารางที่ 4 ปริมาณสารสกัดหยาบจากการ Partition ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลจาก <i>Dasymaschalon echinatum</i>	7
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ สารสกัดหยาบทั้ง 4 fractions และ fractions ของ สารสกัดชั้น ethyl acetate (6 fractions; F1-F6) ของ <i>Dasymaschalon echinatum</i>	14
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Anti-HIV-1 activities ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 fractions และ fractions ของสารสกัดชั้น ethyl acetate (6 fractions; F1-F6) ของ <i>Dasymaschalon echinatum</i>	15
ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Anti-inflammatory activity ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 fractions และ fractionsของสารสกัดชั้น ethyl acetate (6 fractions; F1-F6) ของ <i>Dasymaschalon echinatum</i>	16
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบCytotoxic activity ของ fractions จากสารสกัด 50% methanol:ethyl acetate fraction (H1-H7) ของ methanol extract of <i>Dasymaschalon echinatum</i>	17
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ Anti-HIV-1 activities ของ fractions จากสารสกัด 50% methanol:ethyl acetate (H1-H7) ของ methanol extract of <i>Dasymaschalon echinatum</i>	18
ตารางที่ 10 ผลการทดสอบ Anti-inflammatory activity ของ fractions จากสารสกัด 50% methanol:ethyl acetate fraction (H1-H7) ของ methanol extract of <i>Dasymaschalon echinatum</i>	19
ตารางที่ 11 ผลการทดสอบ Cytotoxic activity ของสารประกอบบริสุทธิ์ 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 และ 10 จาก aerial part of <i>D. echinatum</i>	20
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบ Anti-HIV-1 activities ของสารประกอบบริสุทธิ์ 3, 4 และ 8 จาก aerial part of <i>D.echinatum</i>	21
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบAnti-inflammatory activity ของสารประกอบบริสุทธิ์ 3 จาก aerial part of <i>D. echinatum</i>	21
ตารางที่ 14 ปริมาณสารสกัดหยาบของ <i>Tacca integrifolia</i> จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ	22
ตารางที่ 15 ผลของสารสกัดหยาบของ <i>Tacca integrifolia</i> และ Diclofenac ต่อ EPP induced ear edema	23
ตารางที่ 16 ผลของสารสกัดหยาบของ <i>Tacca integrifolia</i> และ Diclofenac ต่อ carrageenan induced hind paw edema	24
ตารางที่ 17 ผลของสารสกัดหยาบของ <i>Tacca integrifolia</i> และ Aspirin ต่อ acetic acid induced writhing response	24
ตารางที่ 18 ผลการทดสอบ Cytoxic activities ของสารสกัดหยาบของ <i>Tacca integrifolia</i>	25

สารบัญตาราง (ต่อ)

หัวข้อ	หน้าที่
ตารางที่ 19 ผลการทดสอบ Anti-HIV-1-RT ของสารสกัดหยาบของ <i>Tacca integrifolia</i>	25
ตารางที่ 20 ผลการทดสอบ Cytotoxic activities ของ fractions ของ <i>Tacca integrifolia</i>	26
ตารางที่ 21 ผลการทดสอบ Cytotoxic activities ของสารประกอบบริสุทธิ์ของ <i>Tacca integrifolia</i>	27
ตารางที่ 22 ผลการทดสอบ Anti-HIV-RT ของ fractions ของ <i>Tacca integrifolia</i>	27
ตารางที่ 23 ผลการทดสอบ Anti-HIV-RT ของ สารประกอบบริสุทธิ์ ของ <i>Tacca integrifolia</i>	33

สารบัญแผนภูมิ

หัวข้อ	หน้าที่
แผนภูมิที่ 1 ปริมาณสารในแต่ละ fraction ที่ทำการแยกจากชั้น EtOAc extracts ของ <i>Dasymaschalon echinatum</i> โดยวิธี Column chromatography	8
แผนภูมิที่ 2 ปริมาณสารในแต่ละ fraction ที่ทำการแยก 50% Methanol: EtOAc extracts ของ <i>Dasymaschalon echinatum</i> โดยวิธี Column chromatography	10
แผนภูมิที่ 3 ปริมาณสารในแต่ละ fraction ที่ทำการแยกจาก Root Methanol extracts ของ <i>Tacca integrifolia</i> โดยวิธี Column chromatography	26

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DBG5480014

ชื่อโครงการ "การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืช *Dasymaschalon echinatum* และ *Tacca integrifolia* และศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ"

ชื่อนักวิจัย :

- 1) ดร. ถาวร ใจเพชร
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี
Thaworn_jaipetch@yahoo.com
- 2) รองศาสตราจารย์ ดร. ชุตินา คูหากาญจน์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
chutima.kuh@mahidol.ac.th
- 3) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรระ จินตโกวิท
มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี
watcharra.chi@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ :

30 กันยายน 2554 – 29 กันยายน 2557

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยพืชสมุนไพร และได้มีการนำมาใช้รักษาโรคต่าง ๆ เป็นระยะเวลายาวนาน โครงการวิจัยนี้จึงเล็งเห็นถึงความสำคัญและความจำเป็นจากการใช้ยาจากพืชสมุนไพร โดยศึกษาพืชสมุนไพร 2 ชนิดคือ *Dasymaschalon echinatum* (โดยใช้ทุกส่วนของพืช) ทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol และ *Tacca integrifolia* (โดยใช้ส่วนใบ) ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิดคือ hexane, ethyl acetate และ methanol หลังจากกระเหยตัวทำละลายจะได้สารสกัดหยาบของพืชทั้ง 2 ชนิด ซึ่งให้ผลต่อ Anti-inflammatory Anti-infection และ Anti-HIV RT ที่น่าสนใจ ได้ทำการแยกหาสารบริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟี สารบริสุทธิ์หลายชนิดได้พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยวิธีทางสเปกโตรสโกปี

Abstract

Project Code : DBG5480014

Project Title : Study of Chemical Constituent of *Dasymaschalon echinatum* and *Tacca integrifolia* and their Biological Activities

Investigators:

- 1) Dr. Thaworn Jaipetch
Mahidol University, Kanchanaburi Campus
Thaworn_jaipetch@yahoo.com
- 2) Assoc.Prof. Dr. Chutima Kuhakan
Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University
Chutima.Kuh@mahidol.ac.th
- 3) Asst.Prof. Dr. Watcharra Chintakovid
Mahidol University, Kanchanaburi Campus
watcharra.chi@mahidol.ac.th

Project Period : 30 September 2011- 29 September 2014

Thailand is rich in biodiversity of herbs which has been used in folk medicine for a long time. This project research anticipated that Thai herbs are important and essential for use as medicinal plants. Two herbs were studied: *Dasymaschalon echinatum* (all parts of plant), extracted with methanol solvent and *Tacca integrifolia* (leaf part), sequential extracted with organic solvents: hexane, ethyl acetate and methanol. After evaporation of solvents and freeze dried, crude extracts from those plants were obtained and showed interesting activities in Anti-inflammatory, Anti-infection and Anti-HIV RT. Crude extracts were further separated by chromatography technique to obtain pure compounds and identify chemical structure by spectroscopy.

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อศึกษาสารสกัดและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบในพืช 2 ชนิดคือ
 1. *Dasymaschalon echinetum* และ 2. *Tacca integrifolia*
- 2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ Anti-inflammatory, Anti-infection, Anti-cancer, Anti-HIV RT และ Anti-oxidant จากพืช 2 ชนิด คือ 1. *Dasymaschalon echinetum* และ 2. *Tacca integrifolia* โดยพิจารณาประสิทธิภาพของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นเกณฑ์ในการแยก

วิธีการทดลอง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืช *Dasymaschalon echinatum* และ *Tacca integrifolia* และ
ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ"

1. การเก็บตัวอย่างพืช
พืชที่เก็บมาได้ต้องนำมาล้างให้สะอาด (ชั่งน้ำหนักสด) และนำไปตากในที่ร่มให้แห้ง จากนั้นนำพืชที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด จดบันทึกน้ำหนักแห้งที่ได้
2. การสกัดหยาบ (crude extract)
 - 2.1 นำพืชที่บดแห้งแล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์โดยเพิ่มความเป็นขั้วของตัวทำละลายตามลำดับ จาก เฮกเซน (hexane), เอทิลแอสีเตต (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol) ตามลำดับ หลังจากกระเหยตัวทำละลายออกแล้ว จะได้สารสกัดหยาบของเฮกเซน สารสกัดหยาบของเอทิลแอสีเตต และสารสกัดหยาบของเมทานอล ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ทั้ง 3 ส่วน
 - 2.2 ส่งสารสกัดหยาบทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ Anti-inflammatory, Anti-infection, Anti-cancer, Anti-HIV RT และ Anti-oxidant
 - 2.3 เมื่อทราบผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว ทำการเลือกสารสกัดหยาบที่ให้ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ นำสารสกัดที่สนใจมาทำการแยกเพื่อให้ได้มาซึ่งสารบริสุทธิ์ และหาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ดังกล่าว
3. การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ
 - 3.1 เลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะใช้แยกสารสกัดโดยใช้โครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)
 - 3.2 เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว ทำการแยกสารสกัดหยาบโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบหลอดแก้ว (column chromatography) โดยใช้ซิลิกา (SiO₂) และ Sephadex LH 20 เป็นตัวแยก และใช้ TLC ในการร่วมตรวจสอบเพื่อรวมส่วนที่คล้ายกันไว้ด้วยกัน
 - 3.3 วิธีการนี้จะได้สารผสมออกมาเป็นส่วนๆ (fractions) บันทึกน้ำหนักแต่ละส่วนที่ได้พร้อมทั้งบันทึกผลแต่ละส่วนทางสเปกโตรสโกปีโดยใช้ ¹H Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR)
 - 3.4 ทำการแยกซ้ำเพื่อให้ได้สารประกอบบริสุทธิ์โดยอาจจะใช้วิธีทางโครมาโตกราฟีชนิดอื่นๆ เช่น preparative thin layer chromatography, radial chromatography และเทคนิคอื่นๆ เช่น การตกผลึก

4. การหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

ใช้เทคนิคต่างทางสเปกโตรสโคปีประกอบกันเพื่อเป็นการพิสูจน์โครงสร้าง โดยใช้เทคนิคต่างๆ ดังนี้

- 1D และ 2D Nuclear Magnetic Resonance (^1H และ ^{13}C NMR)
- Infrared spectroscopy
- LC-MS spectrometry
- UV-Vis spectroscopy
- จุดหลอมเหลว
- ข้อมูลจากผลงานที่เกี่ยวข้อง

5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่ได้

ผลการทดลอง

1. การศึกษาสารสกัดและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช

Dasymaschalon echinatum

1. เก็บตัวอย่างพืช *Dasymaschalon echinatum* ทุกส่วนของพืช มีน้ำหนักแห้ง 4.0 kg ทำการสกัดแช่ (Percolation) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล (Methanol) หลังจากระเหยตัวทำละลายแล้วได้สารสกัดแห้งในชั้นเมทานอล (MeOH extracts) ปริมาณ 430.86 g ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ *Dasymaschalon echinatum*

Compounds	Cell line cytotoxicity						
	P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK	Hek-293
MeOH	< 4	-	-	11.8	3.32	-	6.56
extracts							
P-388	= Murine lymphocytic leukemia						
KB	= Human nasopharyngeal carcinoma						
Col-2	= Human colon cancer						
MCF-7	= Michigan cancer foundation, human breast cancer						
Lu-1	= Human lung cancer						
ASK	= Cell line from rat glioma cell						
Hek-293	= Human kidney cell (transformed with adenivirus 5 DNA						

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Anti-HIV-I-RT ของ *Dasymaschalon echinatum*

Compounds	% inhibition (IC50, ug/mL)	Activity
MeOH	7.11	Inactive
extracts		

Syncytium assay: IC50 = the dose of compound that inhibited 50% metabolic activity of uninfected cells.

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Anti inflammatory ของ *Dasymaschalon echinatum*

Compounds	Dose mg/ear	Edema thickness (mm)				% inhibition			
		15 min	30 min	60 min	120 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Acetone	-	110±4	137±4	192±4	175±2	-	-	-	-
5% DMSO	-	88±6	142±5	147±5	108±5	-	-	-	-
Phenylbutazone +Acetone	-	35±2	65±2	70±6	40±5	68	52	63	77
MeOH extracts	3	0±0 ^{***}	20±3 ^{***}	27±4 ^{***}	13±3 ^{***}	100	85	88	93

Mean±SEM (N=6), Significant difference from control P* <0.05 , P** <0.01 , P*** <0.001

2. การแยกหาสารบริสุทธิ์

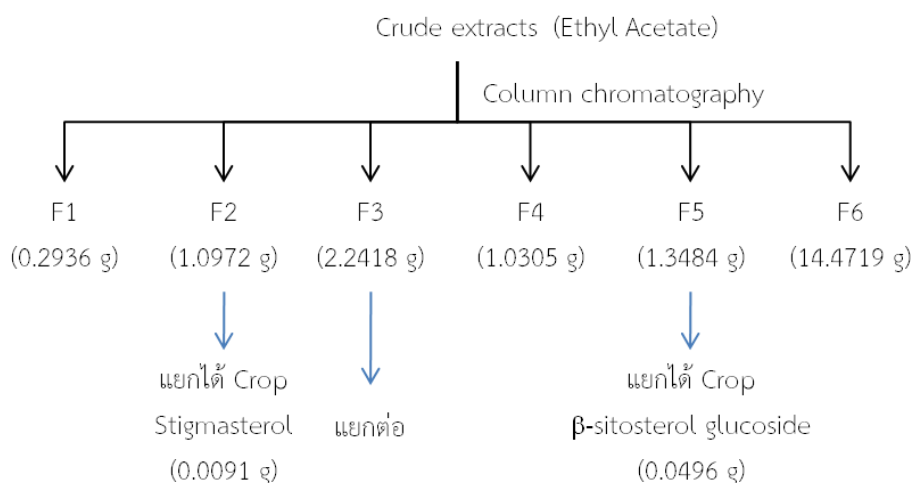
2.1 นำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล 237.39 g มาแยก Partition โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความเป็นขั้วได้ผลดังนี้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณสารสกัดหยาบจากการ Partition ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลจาก *Dasymaschalon echinatum*

Extracts	Hexane (g)	Ethyl Acetate (g)	50% Methanol: Ethyl Acetate (g)	Methanol (g)
MeOH extracts	13.64	25.43	138.97	44.56

ดำเนินการนำสารสกัดหยาบทั้ง 4 fractions ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และทำการแยกเพื่อหาสารประกอบบริสุทธิ์ในส่วนของสารสกัดหยาบของชั้น Ethyl Acetate และ 50% Methanol-Ethyl acetate โดยวิธี Column Chromatography ดังนี้

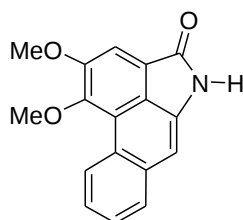
2.2 สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetateหนัก 25.43 g แยกด้วย column chromatography ใช้ Silica gel No 7734 และใช้ตัวทำละลายในระบบเฟ้น้ำ โดยเริ่มจาก 100 % hexane → 100% ethyl acetate → 5%, 10%, 30%, 50% methanol-ethyl acetate → 100% methanol จากผลการตรวจ สอบเบื้องต้นด้วย Thin layer chromatography และ ^1H NMR สามารถรวมได้ 6 fractions (ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ) ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 ปริมาณสารในแต่ละ fraction ที่ทำการแยกจากชั้น EtOAc extracts ของ *Dasymaschalon echinatum* โดยวิธี Column chromatography

แต่ละ fraction ทำการแยกสารต่อ จนได้สารบริสุทธิ์และทำการศึกษาหาสูตรโครงสร้างดังนี้
 Fraction 3 (2.2418 g) นำมาแยกต่อโดยใช้ Column Chromatography (Silica gel No7734) และทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Preparative Thin Layer Chromatography (PLC) ได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้

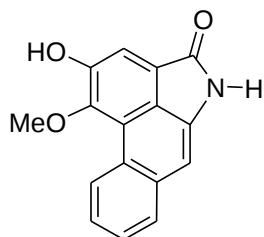
Compound 1 (Aristolactam B II)



Aristolactam B II

- Fraction 4 (1.5195 g) นำมาแยกต่อโดยใช้ Column Chromatography (Silica gel No7734) และทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Preparative Thin Layer Chromatography (PLC) ได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้

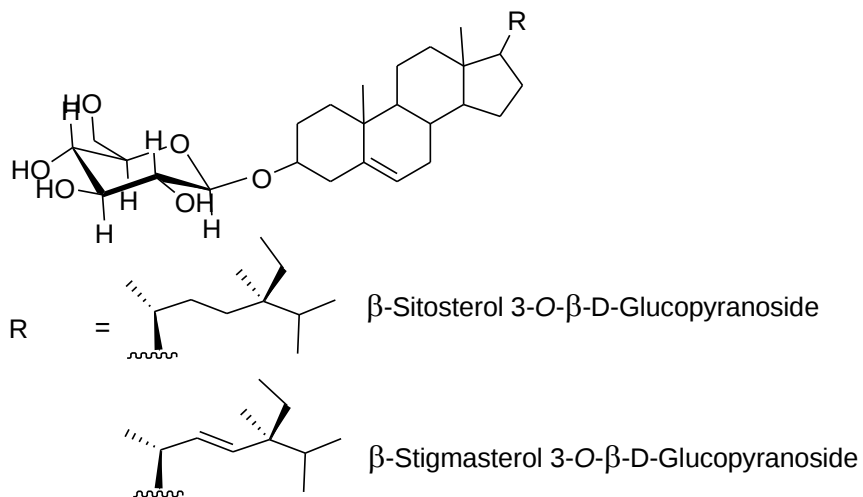
Compound 2 (Aristolactam A II)



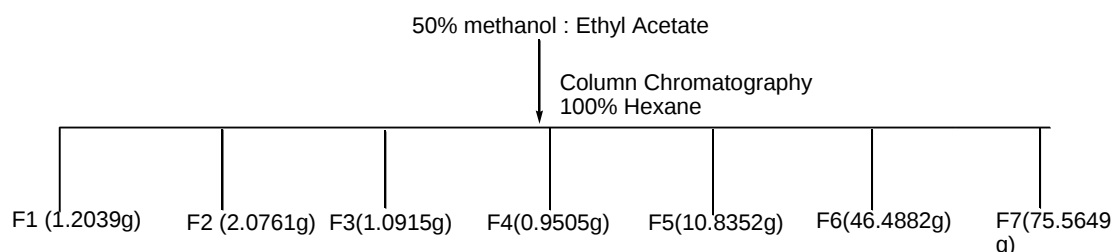
Aristolactam A II

- Fraction 5 (1,3980 g) นำมาตกผลึกด้วย methanol ได้ส่วนที่เป็นผลึกหนัก 0.0469 g ทำการหาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้เป็นสารผสม มีโครงสร้างคือ

Compound 3 [β -Sitosterol 3-O- β -D-glucopyranoside (3A) และ Stigmasterol 3-O- β -D-glucopyranoside (3B)]



2.3 นำสารสกัดหยาบของ ชั้น 50% เมทานอล-เอทิลอะซิเตต น้ำหนัก 138.97 g แยกครั้งแรกโดยใช้ Silica gel No.7734 และใช้ตัวทำละลายในระบบการเพิ่มขั้ว โดยเริ่มจาก 100% Hexane → 100% Ethyl Acetate → 5%, 10%, 30%, 50% Methanol: Ethyl Acetate → 100% Methanol จากผลทาง TLC และ ^1H NMR สามารถแยกได้ 7 fractions ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 ปริมาณสารในแต่ละ fraction ที่ทำการแยก 50% Methanol: EtOAc extracts ของ *Dasymaschalon echinatum* โดยวิธี Column chromatography

นำแต่ละ fraction ทำการแยกต่อเพื่อให้ได้สารประกอบบริสุทธิ์ดังนี้
Fraction 2 น้ำหนัก (2.0761 g) แยกต่อโดยใช้ Sephadex LH 20 และใช้ 100% MeOH เป็นตัวทำละลาย แยกได้ 6 fractions ดังนี้

fraction 2.1 น้ำหนัก 1.17336 g

fraction 2.4 น้ำหนัก 0.0025 g

fraction 2.2 น้ำหนัก 0.0111 g

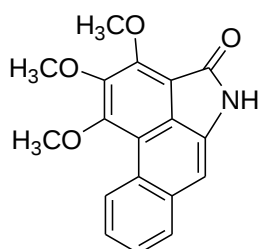
fraction 2.5 น้ำหนัก 0.0014 g

fraction 2.3 น้ำหนัก 0.0600 g

fraction 2.6 น้ำหนัก 0.0021 g

fraction 2.3 น้ำหนัก 0.0600 g แยกต่อโดยใช้ Preparative Thin Layer Chromatography (ใช้ตัวทำละลาย 20% Ethyl Acetate:Hexane) ได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้

Compound 4 (Piperolactam C)



Piperolactam C

Fraction ที่ 3 น้ำหนัก 1.0915 g แยกต่อโดยใช้ Sephadex LH 20 และใช้ตัวทำละลาย 100% MeOH แยกได้ 7 fraction ดังนี้

fraction 3.1 น้ำหนัก 0.3330 g

fraction 3.5 น้ำหนัก 0.0497 g

fraction 3.2 น้ำหนัก 0.3407 g

fraction 3.6 น้ำหนัก 0.0228 g

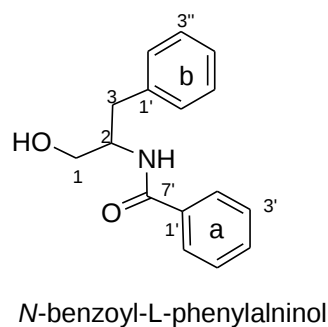
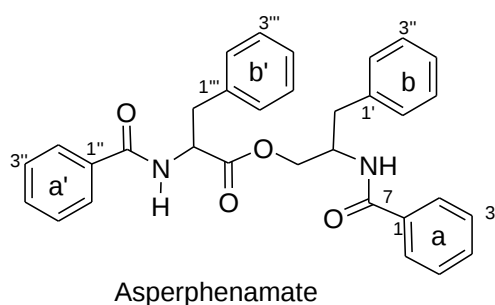
fraction 3.3 น้ำหนัก 0.0318 g

fraction 3.7 น้ำหนัก 0.3290 g

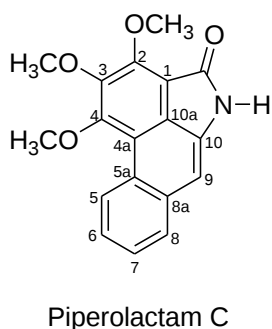
fraction 3.4 น้ำหนัก 0.0355 g

fraction 3.2 น้ำหนัก 0.3407 g ทำการแยกต่อโดยใช้ Silica gel Column Chromatography และ Sephadex LH 20 จนได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครงสร้าง สร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้

Compound 5 (Asperphenamate) และ Compound 6 (N-benzoyl-L-phenylalaninol)

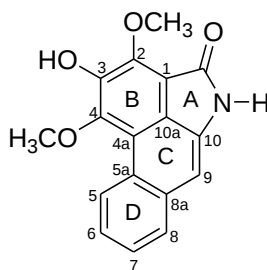


fraction 3.3 น้ำหนัก 0.0318 g รวมกับ fraction 3.4 น้ำหนัก 0.0355 g แยกต่อโดยใช้ Sephadex LH 20 และ ใช้ PLC จนได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครงสร้าง สร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้



Fraction 3.5 น้ก 0.0497 g แยกต่อโดยใช้ PLC (60% EtOAc: Hexane) เป็น solvent
แยกได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครง สร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้

Compound 7 (Goniopedaline)



Goniopedaline

Fraction 5 น้ก 10.8352 g แยกต่อโดยใช้ Silica gel Column Chromatography (Silica gel no. 7734)
และใช้ตัวทำละลาย 40% Ethyl : Hexane แยกได้ 10 fractions ดังนี้

fraction 5.1 น้ก 0.1751 g

fraction 5.6 น้ก 0.5550 g

fraction 5.2 น้ก 0.0735 g

fraction 5.7 น้ก 0.3621 g

fraction 5.3 น้ก 0.1072 g

fraction 5.8 น้ก 1.1242 g

fraction 5.4 น้ก 0.1022 g

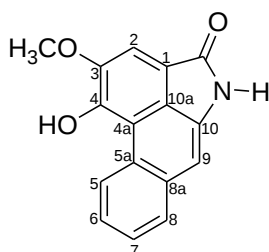
fraction 5.9 น้ก 25.6324 g

fraction 5.5 น้ก 0.6204 g

fraction 5.10 น้ก 3.2973 g

fraction 5.6 น้ก 0.5550 g แยกต่อโดยใช้ Sephadex LH 20 (100% MeOH เป็น solvent) และ PLC
(40% Acetone : Hexane เป็น solvent) จนได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครง สร้างโดยใช้ 2D
NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้

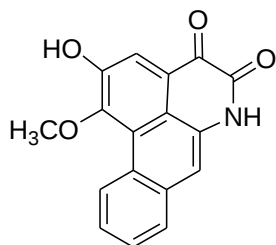
Compound 8 (Piperolactam A)



Piperolactam A

fraction ที่ 5.8 หนัก 1.1242 g ทำการแยกต่อโดยใช้ Silica gel Column Chromatography และ Sephadex LH 20 จนได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้

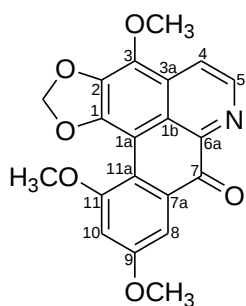
Compound 9 (Noraristolodione)



Noraristolodione

fraction ที่ 5.9 หนัก 25.6324 g แยกต่อโดยใช้ Sephadex LH 20 (100% MeOH เป็น solvent) และ PLC (60% EtOAC : Hexane เป็น solvent) จนได้สารประกอบบริสุทธิ์และทำการหาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้โครงสร้างดังนี้

Compound 10 (Duguevalline)



Duguevalline

1.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารสกัดหยาบทั้ง 4 fractions (hexane, ethyl acetate , 50% methanol-ethyl acetate และ methanol) และ fractions ของสารสกัดชั้น ethyl acetate (6 fractions; F1-F6) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ Cytotoxicity ของ สารสกัดหยาบทั้ง 4 fractions และ fractions ของ สารสกัดชั้น ethyl acetate (6 fractions; F1-F6) ของ *Dasymaschalon echinatum*

Samples	Cell line (ED 50, $\mu\text{g/mL}$)								
	P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK	HT 29	A549	Hex293
MeOH extract	0.168	>20	>20	11.8	3.32	>20	-	-	6.56
Extract hexane	0.16	4.61	9.54	0.54	6.68	0.33	8.42	8.67	1.64
Extract EtOAc	0.16	5.10	>20	0.67	13.90	8.55	>20	0.76	0.54
50% MeOH:EtOAc	2.20	7.03	>20	3.43	>20	19.07	>20	10.07	2.63
Extract MeOH	17.54	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
(Residue)	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
F1	>20	>20	-	>20	-	>20	>20	>20	>20
F2	10.45	12.05	-	11.27	-	11.28	>20	>20	10.84
F3	0.10	5.90	-	1.86	-	0.67	>20	1.98	3.76
F4	0.08	5.92	-	0.73	-	0.15	>20	0.42	0.76
F5	0.11	7.47	-	1.26	-	0.38	>20	0.52	0.76
F6	0.31	>20	-	2.51	-	0.73	>20	0.77	3.43

Results are expressed as ED₅₀ ($\mu\text{g/mL}$):ED₅₀<20 $\mu\text{g/mL}$ is considered active for crude or fraction,

ED₅₀>20 $\mu\text{g/mL}$ is considered inactive for crude or fraction and <4 $\mu\text{g/mL}$ is consider active for pure compound.

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Anti-HIV-1 activities ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 fractions และ fractions ของสารสกัดชั้น ethyl acetate (6 fractions; F1-F6) ของ *Dasymaschalon echinatum*

Extract, Fractions	Anti-HIV-1 activity ^a					
	Anti-syncytium				HIV-1 RT	
	IC ₅₀ (μ g/mL)	EC ₅₀ (μ g/mL)	TI	Activity	% Inhibition	Activity
MeOH extract	*	*	*	*	7.11	I
Hexanes fraction	*	*	*	*	52.79	M
EtOAc fraction	*	*	*	*	40.16	W
50% MeOH:EtOAc fraction	*	*	*	*	0	I
MeOH fraction	*	*	*	*	0	I
Residue fraction	*	*	*	*	0	I
F1	*	*	*	*	0	I
F2	*	*	*	*	91.01	VA
F3	*	*	*	*	100	VA
F4	*	*	*	*	100	VA
F5	*	*	*	*	80.09	VA
F6	*	*	*	*	33.68	W

^aSyncytium assays: IC₅₀ = the dose of substance that inhibited 50% metabolic activity of uninfected cell. EC₅₀ = the dose of substance that reduced 50% syncytium of formation by Δ Tat/Rev MC99 virus. Syncytium reduction assay: Aa = active, Ia = inactive, T= toxic; Radioisotopic RT assay: VA= very active (>70% inhibition), M = moderately active (>50% to 70% inhibition), W = weakly active (30% to 50% inhibition), I = inactive (<30% inhibition), * = submitted for testing but the results were not completed

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Anti-inflammatory activity ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 fractions และ fractions ของสารสกัดชั้น ethyl acetate (6 fractions; F1-F6) ของ *Dasymaschalon echinatum*

Extract, Fractions	Dose mg/ ear	Edema thickness (um)				% Inhibition			
		15 min	30 min	1 h	2 h	15 min	30 min	1 h	2 h
Phenylbutazone ^a	-	12±2 ^{***}	23±2 ^{***}	33±2 ^{***}	18±3 ^{***}	82	82	77	83
MeOH extract ^a	3	13±2 ^{***}	33±3 ^{***}	40±4 ^{***}	28±5 ^{***}	81	74	72	74
Phenylbutazone	-	13±4	33±4	57±3	90±4	92	82	72	53
Hexanes fraction	*	*	*	*	*	*	*	*	*
EtOAc fraction	*	*	*	*	*	*	*	*	*
50% MeOH:EtOAc fraction	3	20±4 ^{***}	63±2 ^{***}	85±17 ^{***}	110±6 ^{***}	85	65	51	21
MeOH fraction	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Residue fraction	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Phenylbutazone ^a	1	32±3 ^{***}	75±2 ^{***}	80±4 ^{***}	55±5 ^{***}	76	57	58	56
F1 ^a	3	37±6 ^{***}	73±12 ^{***}	103±10 ^{***}	80±9 ^{***}	72	58	46	36
F2 ^b	3	30±4 ^{***}	53±8 ^{***}	65±3 ^{***}	57±6 ^{***}	70	68	65	51
F3 ^b	3	40±7 ^{***}	93±6 ^{***}	95±6 ^{***}	72±6 ^{***}	61	45	48	39
F4 ^b	3	42±3 ^{***}	67±7 ^{***}	78±5 ^{***}	62±7 ^{***}	59	60	57	47
F5 ^b	3	53±5 ^{***}	102±5 ^{***}	113±3 ^{***}	75±4 ^{***}	48	40	38	36
F6 ^b	3	47±3 ^{***}	75±6 ^{***}	85±3 ^{***}	65±2 ^{***}	54	55	54	44

Values are expressed as mean±SEM (N = 6), significant from control * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Dissolved in a) acetone, b) absolute ethanol, * = submitted for testing but the results were not completed

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ Cytotoxic activity ของ fractions จากสารสกัด 50% methanol:ethyl acetate fraction (H1-H7) ของ methanol extract of *Dasymaschalon echinatum*

Fractions	Cytotoxic activity ^a against cancer cell lines (µg/mL)						
	P-388	KB	HT29	MCF-7	A549	ASK	Hek293
H1	11.41	19.12	>20	>20	>20	>20	14.47
H2	6.74	12.83	12.09	12.59	>20	12.92	10.82
H3	0.26	1.59	3.11	0.74	3.20	6.5	0.68
H4	1.98	4.07	4	1.39	8.89	11.95	2.20
H5	0.65	0.42	2.26	0.53	1.34	4.10	0.65
H6	4	1.82	2.02	0.12	11.14	12.52	3.21
H7	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20

^aResults are expressed as ED₅₀ (µg/mL): ED₅₀ < 20 µg/mL is considered active for crude or fraction, ED₅₀ > 20 µg/mL is considered inactive for crude or fraction and < 4 µg/mL is considered active for pure compound. P-388 = murine lymphocytic leukemia, KB = human nasopharyngeal carcinoma, HT29 = Human colorectal adenocarcinoma, MCF-7 = human breast cancer, A549 = Human lung carcinoma, ASK = cell line from rat glioma, Hek293 = normal human kidney cell

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ Anti-HIV-1 activities ของ fractions จากสารสกัด 50% methanol:ethyl acetate (H1-H7) ของ methanol extract of *Dasymaschalon echinatum*

Fractions	Anti-HIV-1 activity ^a					
	Anti-syncytium				HIV-1 RT	
	IC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)	TI	Activity	% Inhibition	Activity
H1	*	*	*	*	63.01	M
H2	*	*	*	*	64.65	M
H3	*	*	*	*	84.39	VA
H4	*	*	*	*	78.55	VA
H5	*	*	*	*	53.31	M
H6	*	*	*	*	34.28	W
H7	*	*	*	*	23.88	I

^aSyncytium assays: IC₅₀ = the dose of substance that inhibited 50% metabolic activity of uninfected cell. EC₅₀ = the dose of substance that reduced 50% syncytium of formation by Δ Tat/Rev MC99 virus. Syncytium reduction assay: Aa = active, Ia = inactive, T= toxic; Radioisotopic RT assay: VA= very active (>70% inhibition), M = moderately active (>50% to 70% inhibition), W = weakly active (30% to 50% inhibition), I = inactive (<30% inhibition), * = submitted for testing but the results were not completed

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบ Anti-inflammatory activity ของ fractions จากสารสกัด 50% methanol:ethyl acetate fraction (H1-H7) ของ methanol extract ของ *Dasymaschalon echinatum*

Extract, Fractions	Dose mg/ ear	Edema thickness (um)				% Inhibition			
		15 min	30 min	1 h	2 h	15 min	30 min	1 h	2 h
Phenylbutazone ^a	1	32±3 ^{***}	75±2 ^{***}	80±4 ^{***}	55±5 ^{***}	76	57	58	56
H1 ^a	3	37±6 ^{***}	73±12 ^{***}	103±10 ^{* **}	80±9 ^{***}	72	58	46	36
H2 ^b	3	30±4 ^{***}	53±8 ^{***}	65±3 ^{***}	57±6 ^{***}	70	68	65	51
H3 ^b	3	40±7 ^{***}	93±6 ^{***}	95±6 ^{***}	72±6 ^{***}	61	45	48	39
H4 ^b	3	42±3 ^{***}	67±7 ^{***}	78±5 ^{***}	62±7 ^{***}	59	60	57	47
H5 ^b	3	53±5 ^{***}	102±5 ^{***}	113±3 ^{***}	75±4 ^{***}	48	40	38	36
H6 ^b	3	47±3 ^{***}	75±6 ^{***}	85±3 ^{***}	65±2 ^{***}	54	55	54	44
H7	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Values are expressed as mean±SEM (N = 6), significant from control * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Dissolved in a) acetone, b) absolute ethanol, * = submitted for testing but the results were not completed

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบ Cytotoxic activity ของสารประกอบบริสุทธิ์ 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 และ 10 จาก aerial part ของ *Dasymaschalon echinatum*

Compounds	Cytotoxic activity ^a against cancer cell lines (µg/mL)						
	P-388	KB	MCF-7	ASK	HT29	A549	Hek293
1	>20	>20	0.63	>20	>20	>20	>20
2	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
3	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
4	>20	>20	3.76	>20	>20	>20	>20
7	9.90	7.75	3.97	18.16	>20	>20	>20
8	5.75	10.38	>20	12.32	>20	11.07	>20
9	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
10	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20

^aResults are expressed as ED₅₀ (µg/mL): ED₅₀ < 20 µg/mL is considered active for crude or fraction, ED₅₀ > 20 µg/mL is considered inactive for crude or fraction and < 4 µg/mL is considered active for pure compound. P-388 = murine lymphocytic leukemia, KB = human nasopharyngeal carcinoma, Col-2 = human colon cancer, MCF-7 = human breast cancer, Lu-1 = human lung cancer, ASK = cell line from rat glioma, HT29 = Human colorectal adenocarcinoma, A549 = Human lung carcinoma, Hek293 = normal human kidney cell

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบ Anti-HIV-1 activities ของสารประกอบบริสุทธิ์ 3, 4 และ 8 จาก aerial part ของ *Dasymaschalon echinatum*

Compound	HIV-1-RT	
	% Inhibition	Activity
3	25.68	I
4	0	I
8	100 (IC ₅₀ = 57.93 µg/mL)	VA

IC₅₀ = the dose of substance that inhibited 50% metabolic activity of uninfected cell, VA= very active (>70% inhibition), I = inactive (<30% inhibition)

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบ Anti-inflammatory activity ของสารประกอบบริสุทธิ์ 3 จาก aerial part ของ *Dasymaschalon echinatum*

Compounds	Dose mg/ear	Edema thickness (um)				% Inhibition			
		15 min	30 min	1 h	2 h	15 min	30 min	1 h	2 h
Phenylbutazone	-	5±3 ^{***}	32±2 ^{***}	65±4 ^{***}	60±4 ^{***}	92	74	64	60
3	1	37±6 ^{***}	55±6 ^{***}	67±4 ^{***}	57±5 ^{***}	38	52	60	54

Values are expressed as mean±SEM (N = 6), significant from control *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

ผลงานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

Bunteang S, Chanakul W, Hongtong S, Kuhakarn C, Chintakovid W, Sungchawek N, Akkarawongsapat R, Limthongkul J, Nantasaen N, Ruetrakul V, Jaipetch J. (2018) Anti-HIV Activity of Alkaloids from *Dasymaschalon echinatum* . Natural Product Communications,13, 29-32.

2. การศึกษาสารสกัดและหาสูตรโครงสร้างทางเคมีและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพืช *Tacca integrifolia*

1. ทำการสกัดแช่ (Percolation) ส่วนรากและใบ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เพิ่มลำดับความเป็นขั้วของสารละลาย ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) และเมทานอล (Methanol) ซึ่งหลังจากระเหยตัวทำละลายแล้วได้สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตต เมทานอล ดังนี้

ตารางที่ 14 ปริมาณสารสกัดหยาบของ *Tacca integrifolia* จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ส่วนของพืช	สารสกัดหยาบเฮกเซน (g)	สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (g)	สารสกัดหยาบเมทานอล (g)
ราก	91.53	174.46	466.64
ใบ	40.59	70.91	150.81

ทุก Fractions ของสารสกัดหยาบได้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ผลการทดสอบดังนี้ (ตารางที่ 2-6)

ตารางที่ 15 ผลของสารสกัดหยาบของ *Tacca integrifolia* และ Diclofenac ต่อ EPP induced ear edema

Compounds	Dose mg/e ar	Edema thickness (mm)				% inhibition			
		15 min	30 min	60 min	120 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Ethanol	-	91.7±9.5	153.3±8.0	166.7±4.2	173.3±8.8	-	-	-	-
Acetone		93.3±8.8	153.3±4.2	165.0±2.2	175.0±8.5	-	-	-	-
Diclofenac	-	3.3±2.1**	55.0±11.8**	76.7±10.9**	83.3±14.8**	96.3	64.1	54.0	51.9
(a) Root- Hexane extracts	3	43.3±12.0**	85.0±20.8**	108.3±7.9**	118.3±7.0**	53.5	44.5	34.3	32.3
(b) Root- EtOAC extracts	3	28.3±7.0**	85.0±9.2**	100.0±8.2**	105.0±9.6**	69.0	44.5	40.0	39.4
(b) Root- MeOH extracts	3	20.0±5.8**	63.3±7.1**	96.7±15.0**	106.7±13.3*	78.1	58.7	42.0	38.4
(a) Leaf- Hexane extracts	3	8.3±3.1**	41.7±10.5**	83.3±9.2*	95.0±9.9**	91.0	72.8	49.4	45.7
(a) Leaf- EtOAC extracts	3	3.3±2.1**	40.0±4.5**	75.0±6.7*	88.3±6.0**	96.4	73.9	54.5	49.5
(b) Leaf- MeOH extracts	3	51.7±7.5**	101.7±12.5*	116.7±7.6**	126.7±8.0**	43.6	33.7	30.0	26.9

(a) = Dissolved in acetone

(b) = Dissolved in ethanol

Significant difference from control P* < 0.05, P** < 0.001

ตารางที่ 16 ผลของสารสกัดหยาบของ *Tacca integrifolia* และ Diclofenac ต่อ carrageenan induced hind paw edema

Treatment	Dose (mg/kg)	1 h		2 h		3 h	
		EV	%EI	EV	%EI	EV	%EI
5% Tween80		0.170±0.025	-	0.597±0.056	-	0.592±0.035	-
Diclofenac	10	0.070±0.015*	58.82	0.185±0.033**	68.99	0.288±0.032**	51.27
Root- MeOH extracts	100	0.117±0.064	31.37	0.470±0.047*	21.23	0.507±0.033	14.37
Leaf- EtOAC extracts	100	0.098±0.075	42.16	0.351±0.024*	41.06	0.382±0.034**	35.49

EV = Edema volume (ml) at time

%EI = Percent edema inhibition of test substance at time

Significant difference from control P* < 0.05, P** < 0.001

ตารางที่ 17 ผลของสารสกัดหยาบของ *Tacca integrifolia* และ Aspirin ต่อ acetic acid induced writhing response

Treatment	Dose (mg/kg)	n	nWR (+S.E.M)	%WI
5% Tween80		6	25	
Aspirin	300	6	10.7	57.2
Root- MeOH extracts	100	3	9	64
Leaf- EtOAC extracts	100	3	4	84

nWR = Number of writhing response

%WI = Percent writhing response inhibition of test substance at time

จากผลการทดสอบ พบว่าการต้านการอักเสบ (Anti inflammatory) พบว่า MeOH extracts ของราก และ EtOAc ของใบ ให้ผลที่น่าสนใจ ซึ่งจะได้มีการทดสอบทางด้าน Toxicity และแยกหาสารประกอบบริสุทธิ์ ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบ Cytotoxic activities ของสารสกัดหยาบของ *Tacca integrifolia*

fractions	Cytotoxic activity ^a against cancer cell lines (ug/ml)					
	P-388	KB	Col2	MCF-7	Lu-1	ASK
Leaf Hexane extract	11.26	12.59	-	12.88	15.34	-
Leaf EtOAc extract	11.20	18.60	-	-	-	-
Leaf MeOH extract	12.39	-	-	-	16.96	-
Root Hexane extract	12.19	-	-	-	17.37	-
Root EtOAc extract	12.07	19.63	13.78	-	12.29	15.78
Root MeOH extract	11.30	-	-	-	17.63	-

^aResults are expressed as ED₅₀ (μg/mL): ED₅₀< 20 μg/mL is considered active for crude or fraction, ED₅₀>20 μg/mL is considered inactive for crude or fraction and < 4 μg/mL is considered active for pure compound. P-388 = murine lymphocytic leukemia, KB = human nasopharyngeal carcinoma, Col 2= Human colon cancer MCF-7 = human breast cancer, LU-1= Human lung cancer ASK=cell line from rat glioma

ตารางที่ 19 ผลการทดสอบ Anti-HIV-1-RT ของสารสกัดหยาบของ *Tacca integrifolia*

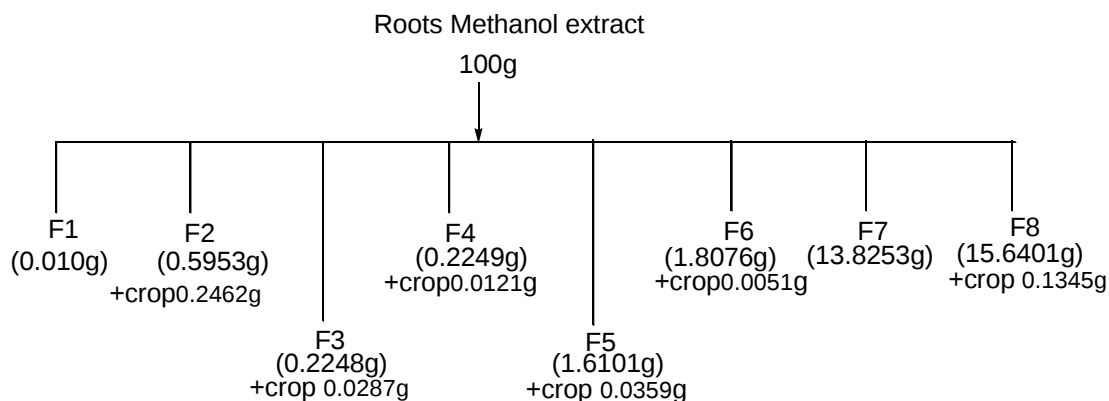
Fractions	Anti-HIV-1-RT	
	% Inhibition	Activity
Root Hexane extract	94.19	VA
Root EtOAc extract	79.37	VA
Root MeOH extract	78.95	VA

IC₅₀ = the dose of substance that inhibited 50% metabolic activity of uninfected cell, VA= very active (>70% inhibition), I = inactive (<30% inhibition)

2. ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์

นำสารสกัดจากรากชั้น methanolหนัก 100 g แยกด้วย column chromatography โดยใช้ Silica gel No 7734 และใช้ตัวทำละลายในระบบเพิ่มความเป็นขั้ว

จากผลการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย Thin layer chromatography และ ^1H NMR สามารถแยกและรวมได้ 8 fractions (ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ) ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3



แผนภูมิที่ 3 ปริมาณสารในแต่ละ fraction ที่ทำการแยกจาก Root Methanol extracts ของ *Tacca integrifolia* โดยวิธี Column chromatography

ทุก fractions ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบ Cytotoxic activities ของ fractions ของ *Tacca integrifolia*

Fractions	Cytotoxic activity ^a against cancer cell lines (ug/ml)					
	P-388	KB	Col2	MCF-7	Lu-1	ASK
Ellip	0.30	0.59	-	0.60	-	0.36
F7	-	-	-	-	-	-
F8	3.05	12.05	-	10.65	-	11.55

ตารางที่ 21 ผลการทดสอบ Cytotoxic activities ของสารประกอบบริสุทธิ์ของ *Tacca integrifolia*

Fractions	Cytotoxic activity ^a against cancer cell lines (ug/ml)					
	P-388	KB	Col2	MCF-7	Lu-1	ASK
Ellip	0.30	0.59	-	0.60	-	0.36
Saponin	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบ Anti-HIV-RT ของ fractions ของ *Tacca integrifolia*

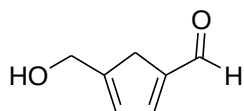
Fractions	Anti-HIV-1RT		
	% Inhibition	Activity	IC 50
F4	85.8	VA	-
F5	83.6	VA	-
F6	74.2	VA	-
F7	-10.01	I	-
F8	6.37	I	-
Navirapine	-	-	2.11

IC₅₀ = the dose of substance that inhibited 50% metabolic activity of uninfected cell, VA= very active (>70% inhibition), I = inactive (<30% inhibition)

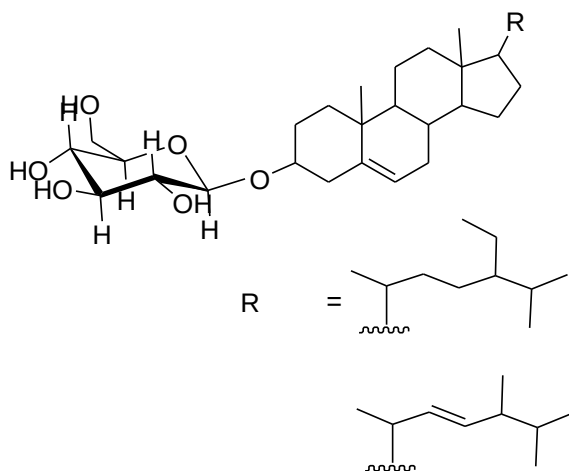
จากการแยกด้วย Column Chromatography สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ และหาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ดังนี้คือ

Fraction ที่ 2 (0.5953) นำมาแยก column chromatography โดยใช้ Sephadex LH 20 และ ใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย สามารถแยกได้สารบริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ดังนี้คือ

Compound 1



Fraction ที่ 4 (2.2249g) และแยกส่วนที่เป็นผลึก (crop 0.0121g) นำ crop ที่ได้หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้เป็นสารผสมของ β -Sitasterol และ Stigmasterol glucoside (compound 2) มีโครงสร้างคือ



Fraction 4 (2.2249 g) แยกต่อโดยใช้ Sephadex LH 20 และใช้ 100% MeOH เป็นตัวทำละลายแยกได้ 6 fractions ดังนี้

fraction 4.1 น้ำหนัก 0.1523 g

fraction 4.4 น้ำหนัก 0.2512 g

fraction 4.2 น้ำหนัก 0.9237 g

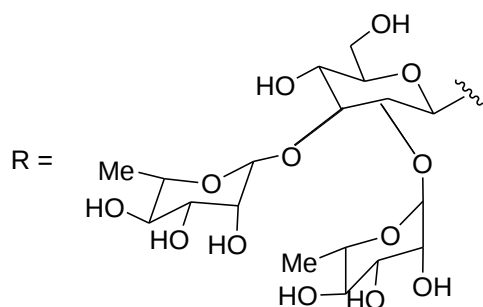
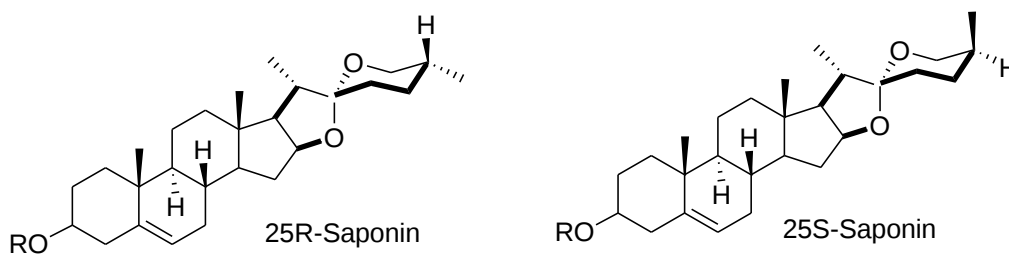
fraction 4.5 น้ำหนัก 0.0438 g

fraction 4.3 น้ำหนัก 0.4730 g

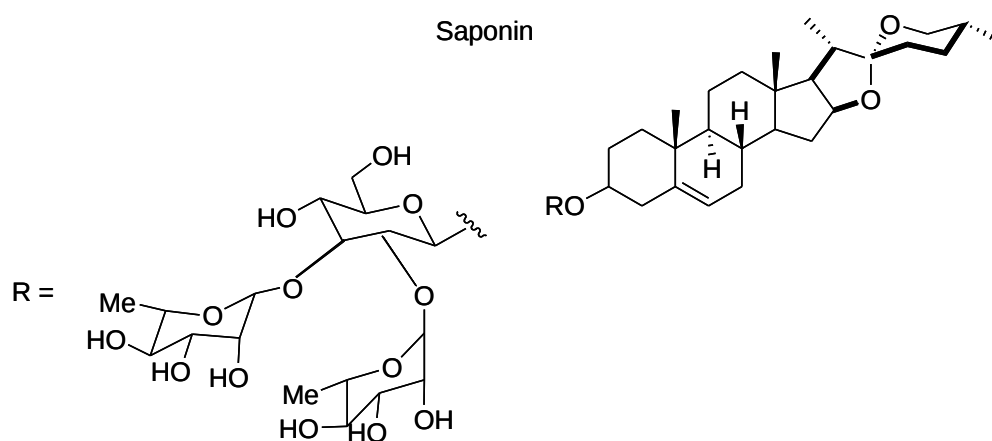
fraction 4.6 น้ำหนัก 0.0342 g

fraction 4.2 น้ำหนัก 0.9237 g นำมาแยก column chromatography โดยใช้ Sephadex LH 20 และใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย แยกสารบริสุทธิ์ได้ คือ 25R-Saponin และ 25S-Saponin

Compound 3(25R Saponin) and Compound 4 (25S Saponin)



Fraction ที่ 5 ส่วนที่เป็นผลึก (crop 0.0359g) นำ crop ที่ได้หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ดังนี้คือ **25R Saponin (compound3)**



Fraction ที่ 5 หนัก 1.6101 g แยกด้วย Sephadex LH 20 และใช้ pure MeOH เป็นตัวทำละลายแยกได้ 6 fractions คือ

fraction 5.1 หนัก 0.0554 g

fraction 5.2 หนัก 0.1573 g

fraction 5.3 หนัก 0.6141 g

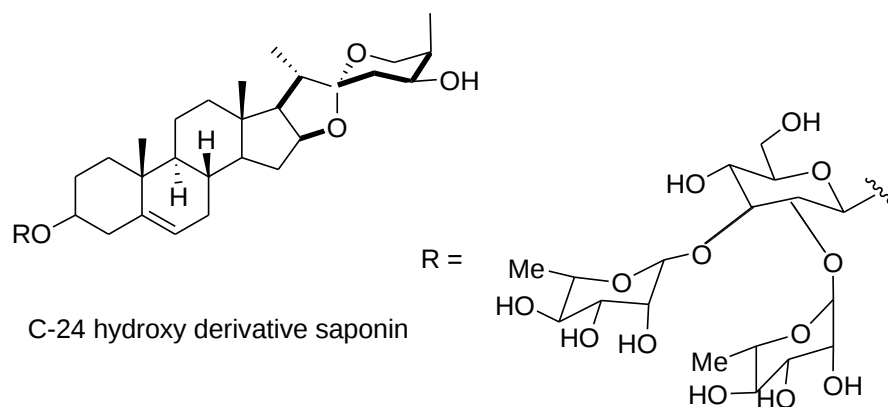
fraction 5.4 หนัก 0.3400 g

fraction 5.5 หนัก 0.0476 g

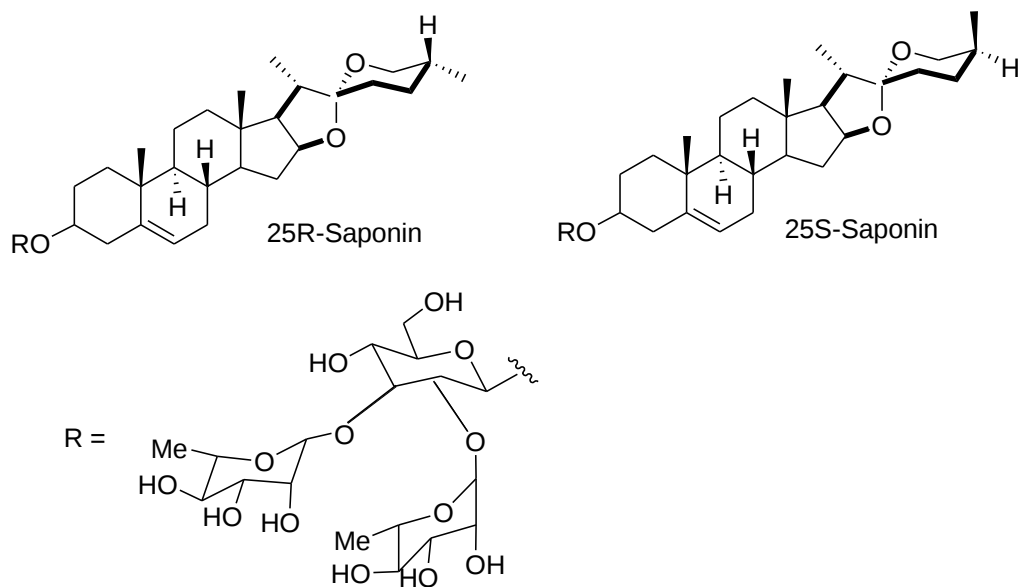
fraction 5.6 หนัก 0.0390 g

Fraction 5F3+5F4 (0.9514 g) แยกต่อโดยใช้ Silica gel column chromatography แยกได้สารบริสุทธิ์คือ

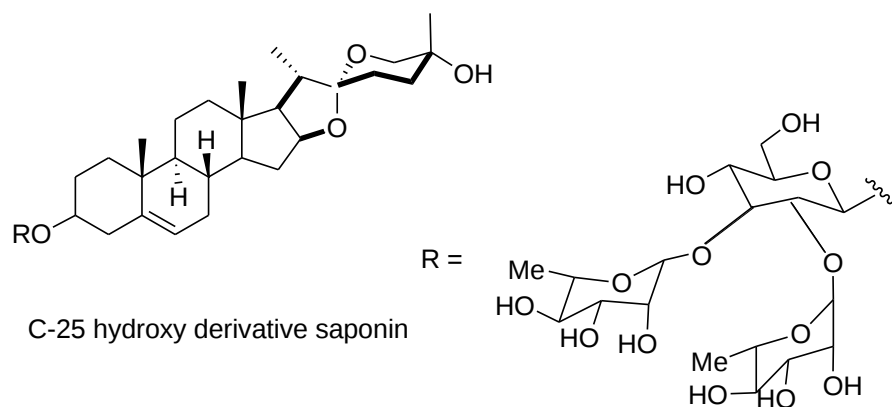
1. C-24 hydroxy derivative saponin (Compound 5)



2. *d,l* diastereoisomer of saponin (25R- and 25S-saponin) Compound 3 and Compound 4

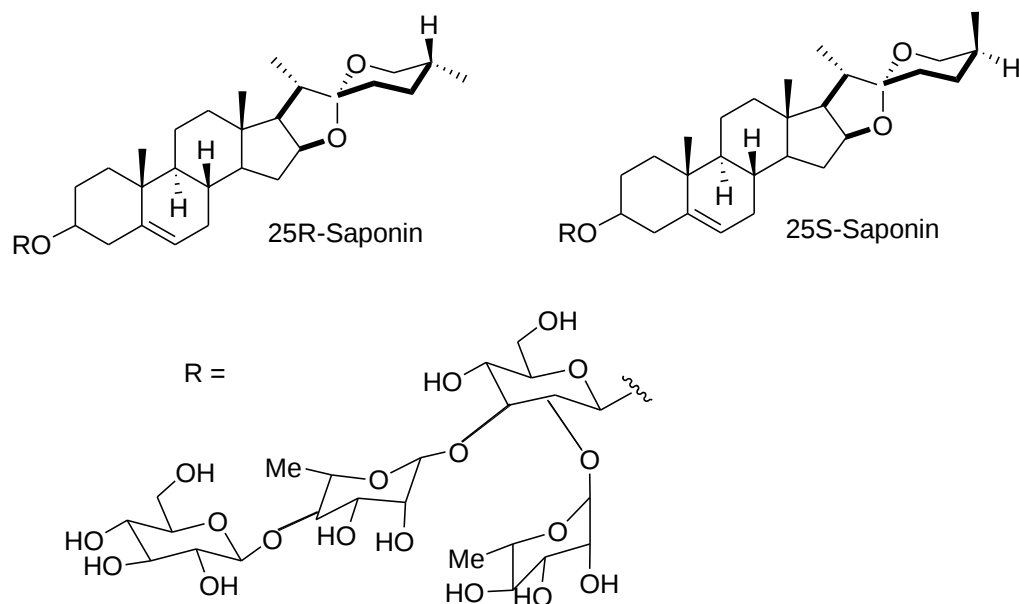


3. Compound 6 New compound ของสารประกอบ (C-25 hydroxy derivative saponin)



Fraction ที่ 6 (1.8076g) และแยกส่วนที่เป็นผลึก (crop 0.0051g) นำ crop ที่ได้หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์นี้คือ dl-isomer Chantrieroside (**compound 7**)

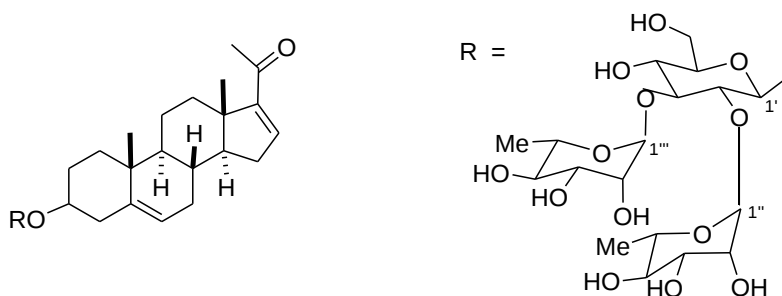
Chantrieroside



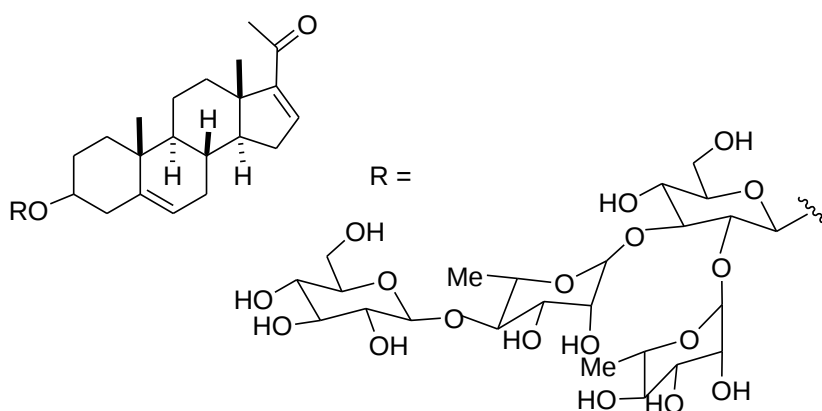
Fraction 7 หนัก 13.3253 g แยกต่อโดยใช้ Silica gel Column Chromatography (Silica gel No. 7734) และใช้ตัวทำละลายคือ CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O ในสัดส่วน 100:10:1, 90:10:1, 80:10:1, 70:10:1, 60:10:1, 50:10:1, 40:10:1, 30:10:1 แยกได้ 10 fractions คือ

fraction 7.1 หนัก	0.0377 g	fraction 7.6 หนัก	1.4770 g
fraction 7.2 หนัก	0.0748 g	fraction 7.7 หนัก	2.7472 g
fraction 7.3 หนัก	0.4243 g	fraction 7.8 หนัก	1.4015 g
fraction 7.4 หนัก	0.2409 g	fraction 7.9 หนัก	0.5016 g
fraction 7.5 หนัก	0.6392 g	fraction 7.10 หนัก	0.4707 g

fraction 7.4 หนัก 0.2409 g แยกต่อโดยใช้ Sephadex LH 20 และใช้ 100% MeOH เป็นตัวทำละลาย สามารถแยกได้สารบริสุทธิ์ได้ 1 สารประกอบและหาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้สูตรโครงสร้างคือ **Compound 8 Pregnane Glucoside (sugar 3 units)**



Fraction 7.7 หนัก 4.1547 g แยกต่อโดยใช้ Silica gel Column Chromatography (Silica gel No. 7734) สามารถแยกได้สารบริสุทธิ์ได้ 1 สารประกอบและหาสูตรโครงสร้างโดยใช้ 2D NMR, IR และ MS ได้สูตรโครงสร้างคือ **Compound 9 Pregnane Glucoside (sugar 4 units)**



สารประกอบบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก fractions ต่างๆ ของ *Tacca integrifolia* นำไปทดสอบทาง Anti-HIV RT ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 23 ผลการทดสอบ Anti-HIV-RT ของ สารประกอบบริสุทธิ์ ของ *Tacca integrifolia*

Compound	Anti-HIV-1RT		
	% Inhibition	Activity	IC 50
3	99.6	VA	112.4
5	ND	-	-
6	34.7	VA	-
7	4.9	I	-
8	88.5	VA	-
9	ND	-	-
Navirapine	-	-	2.11

IC₅₀ = the dose of substance that inhibited 50% metabolic activity of uninfected cell, VA= very active (>70% inhibition), I = inactive (<30% inhibition)

ผลงานวิจัยในส่วนนี้อยู่ในขั้นตอนเตรียมการส่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

ภาคผนวก

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้นำไปสู่

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 1 ฉบับ ได้แก่

Bunteang S, Chanakul W, Hongtong S, Kuhakarn C, Chintakovid W, Sungchawek N, Akkarawongsapat R, Limthongkul J, Nantasaen N, Ruetraku L V, Jaipetch J. (2018) Anti-HIV Activity of Alkaloids from *Dasymaschalon echinatum* . Natural Product Communications,13, 29-32.