



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ  
องค์ประกอบทางเคมีจากใบหนาด

โดย

ดร. นิสากร แซ่วัน

สิงหาคม 2553

สัญญาเลขที่ MRG5180174

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ  
องค์ประกอบทางเคมีจากใบหนาด

โดย

ดร. นิสากร แซ่วัน  
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการวิจัยตลอดโครงการวิจัย ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรหมมา นักวิจัยที่ปรึกษาในโครงการ ที่ให้คำปรึกษาจนงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อума ประวัติ ดร. สวพร โกยสมบูรณ์ นางสาวยุพรรณ พลพัฒน์ และนางสาวนารีรัตน์ ทองทิพย์ ที่ช่วยเหลือการบันทึกข้อมูล NMR บางส่วน และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

ดร. นิสากร แซ่วัน  
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง  
2553

## บทคัดย่อ

|                  |                                                                                          |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| รหัสโครงการ:     | MRG5180174                                                                               |
| ชื่อโครงการ:     | การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสขององค์ประกอบทางเคมีจากใบหนาด |
| ผู้นักวิจัย:     | ดร. นิสากร แซ่วัน อาจารย์ประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง      |
| Email address:   | nisakorn@mfu.ac.th                                                                       |
| ระยะเวลาโครงการ: | 15 พฤษภาคม 2551 – 14 พฤษภาคม 2553                                                        |

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบหนาดด้วยเอทิลอะซิเตท สามารถแยกสารประเภทฟลาโวนอยด์ได้ 9 สาร ซึ่งประกอบด้วย ฟลาโวนอล 3 สาร คือ quercetin (1), rhamnetin (2), และ tamarixetin (3) ฟลาโวน 2 สาร คือ luteolin (4) และ luteolin-7-methyl ether (5) ไดไฮโดรฟลาโวนอล 2 สาร คือ dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) และ dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) และ ฟลาโวนโนน 2 สาร คือ 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) และ blumeatin (9) โครงสร้างของสารดังกล่าววิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทสโกปี UV NMR และ MS และเปรียบเทียบกับสารที่ได้มีการรายงานมาแล้ว จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น พบว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์เรียงลำดับดังนี้ quercetin (1) > rhamnetin (2) > tamarixetin (3); dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) > dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7); luteolin (4) > luteolin-7-methyl ether (5); 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) > blumeatin (9) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ลดลงตามลำดับดังนี้ quercetin (1) > L-ascorbic acid > Blumatin > 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) > Butylated hydroxytoluene > dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) > Butylated hydroxytoluene > dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7)

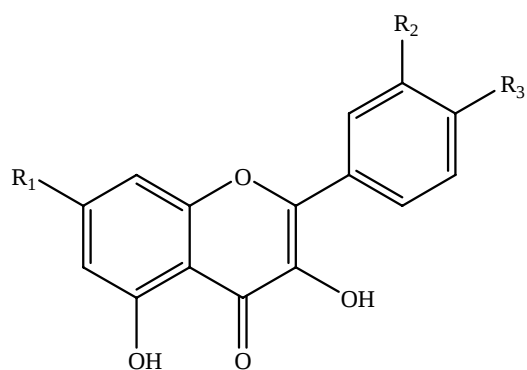
ใบหนาดจาก 7 อำเภอ (เชียงใหม่, เชียงแสน, ดอยหลวง, แม่จัน, แม่สาย, พญาเม็งราย, เวียงชัย) ในจังหวัดเชียงราย มาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต่างกัน คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำ จากนั้นตรวจวัดได้ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดโดยวิธี Folin-Ciocalteu ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH และ ferrous reducing และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเอทิล อะซิเตทด้วยวิธี dopa chrome ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH และ ferrous reducing ของสารสกัดหยาบลดลงตามลำดับดังนี้ สารสกัดเอทิลอะซิเตท >

สารสกัดเอทานอล > สารสกัดไดคลอโรมีเทน > สารสกัดเฮกเซน > สารสกัดน้ำ ซึ่งสารสกัดเอทิลอะซีเตตแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตพบว่าไบโหนดจากอำเภอดอยหลวงแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าแหล่งอื่น

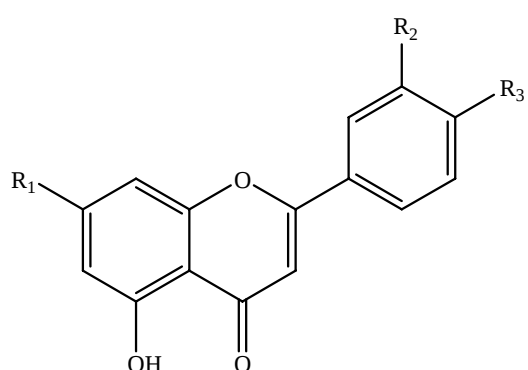
จากการวิเคราะห์ปริมาณ ฟลาโวนอยด์ในสารสกัดด้วยเทคนิค RP-HPLC พบว่าฟลาโวนอยด์หลัก 4 สาร คือ dihydroquercetin-4'-methyl ether (6), dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7), 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8), และ blumatin (9) ในสารสกัดไบโหนดที่เก็บจากแหล่งที่ต่างกัน พบว่ามีความแตกต่างทั้งปริมาณและชนิดของสารฟลาโวนอยด์ โดยสารสกัดเฮกเซนพบเฉพาะ dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วต่ำที่สุดในบรรดาสารฟลาโวนอยด์หลักทั้ง 4 สาร ในขณะที่สารฟลาโวนอยด์ที่ออกฤทธิ์สูงที่สุด คือ 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) ตรวจพบในสารสกัดเอทิลอะซีเตตซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแหล่งที่เก็บไบโหนดมีผลต่อปริมาณและชนิดของสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

**คำสำคัญ:** ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, สารฟลาโวนอยด์, ไบโหนด

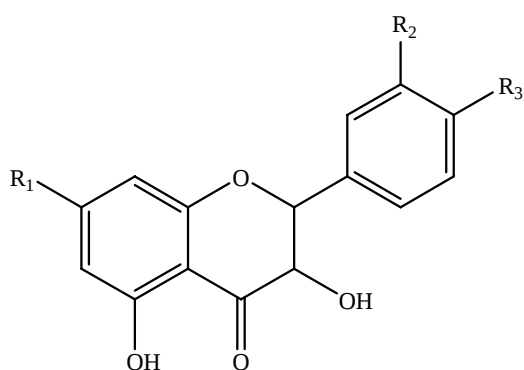
---



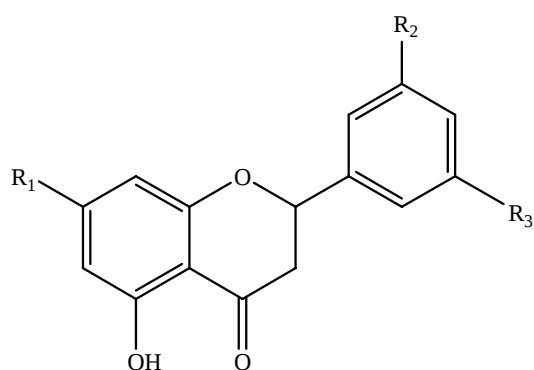
|                 | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |
|-----------------|------------------|----------------|------------------|
| (1) Quercetin   | OH               | OH             | OH               |
| (2) Rhamnetin   | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH               |
| (3) Tamarixetin | OH               | OH             | OCH <sub>3</sub> |



|                             | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|-----------------------------|------------------|----------------|----------------|
| (4) Luteolin                | OH               | OH             | OH             |
| (5) Luteolin-7-methyl ether | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH             |



|                                         | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |
|-----------------------------------------|------------------|----------------|------------------|
| (6) Dihydroquercetin-4'-methylether     | OH               | OH             | OCH <sub>3</sub> |
| (7) Dihydroquercetin-7,4'-dimethylether | OCH <sub>3</sub> | OH             | OCH <sub>3</sub> |



|                                     | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|-------------------------------------|------------------|----------------|----------------|
| (8) 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone | OH               | OH             | OH             |
| (9) Blumeatin                       | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH             |

## Abstract

---

**Project code:** MRG5180174

**Project title:** The study of free radical scavenging and tyrosinase inhibitor of chemical constituent from *Blumea balsamifera* DC leave

**Investigator:** Dr. Nisakorn Saewan, School of Cosmetic Science,  
Mae Fah Luang University

**Email address:** nisakorn@mfu.ac.th

**Project period:** May 15, 2008 to May 14, 2010

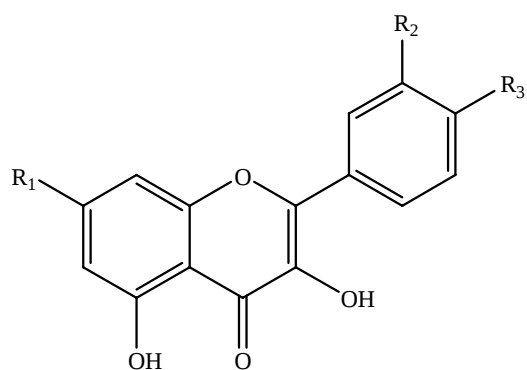
Fractionation of an ethylacetate extract from leaves of *Blumea balsamifera* DC, led to isolation of nine flavonoids. The isolated compounds consist of three flavonols: quercetin (1), rhamnetin (2), tamarixetin (3); two flavones: luteolin (4), luteolin-7-methyl ether (5), two dihydroflavonols: dihydroquercetin-4'-methyl ether (6), dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7), two flavanones: 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8), and blumeatin (9). Their chemical structures were elucidated by spectroscopic methods including UV, NMR and MS analyses. Their inhibitory activities on mushroom tyrosinase using L-DOPA as substrate were evaluated. The anti-tyrosinase activities of all compounds tested decreased in the order: quercetin (1) > rhamnetin (2) > tamarixetin (3); dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) > dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7); luteolin (4) > luteolin-7-methyl ether (5); 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) > blumeatin (9). The antioxidant activities as determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity assay of the isolated compounds were investigated. The order of DPPH radical scavenging activity of the chemical constituents were as following: quercetin (1) > L-ascorbic acid > blumatin > 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) > butylated hydroxyanisole > dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) > butylated hydroxytoluene > dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7).

Leaves of *Blumea balsamifera* DC from seven districts in Chiangrai were extracted by different organic solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and water). The total phenolic content of the extracts were evaluated by Folin-Ciocalteu procedures. Antioxidant activities of the extracts were determined using DPPH method and ferrous reducing assay. Tyrosinase inhibitory activities of the ethyl acetate extracts were determined by dopa chrome method.

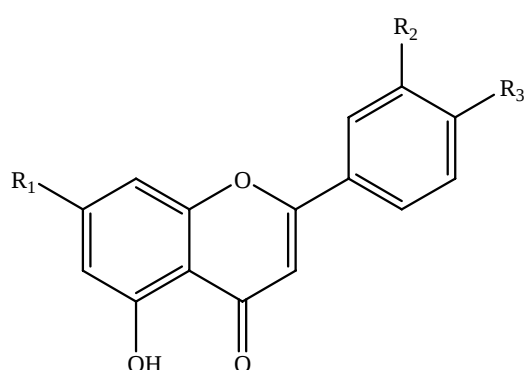
The antioxidant activities (DPPH radical scavenging and ferrous reducing power) of crude extracts decreased in the order: ethyl acetate extract > ethanol extract > dichloromethane extract > hexane extract > water extract. The ethyl acetate extract of *Blumea balsamifera* DC leaves from Doi Luang established highest activity than other sources.

The major flavonoids, dihydroquercetin-4'-methyl ether (6), dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7), 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8), and blumatin (9), in the extracts were quantified by RP-HPLC technique. The results showed different amount and type of flavonoids in each extract. The hexane extracts were found only the less polarity of major flavonoid, dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7). For the highest antioxidant activities of major flavonoids, 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8), was observed in the ethyl acetate extract which is also showed strongest antioxidant activities. This study showed topography effect to amount and type of flavonoids in each sources of *Blumea balsamifera* DC leaves extract and also their activities.

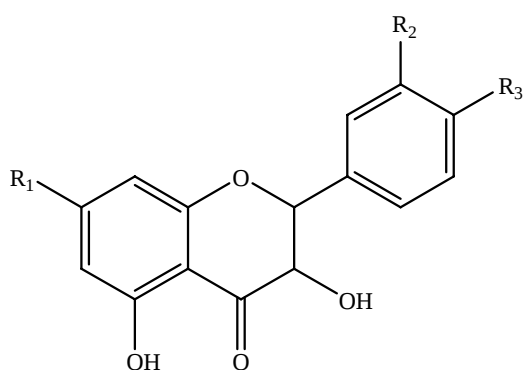
**Key word:** antioxidant, *Blumea balsamifera* DC, flavonoids, tyrosinase inhibitor



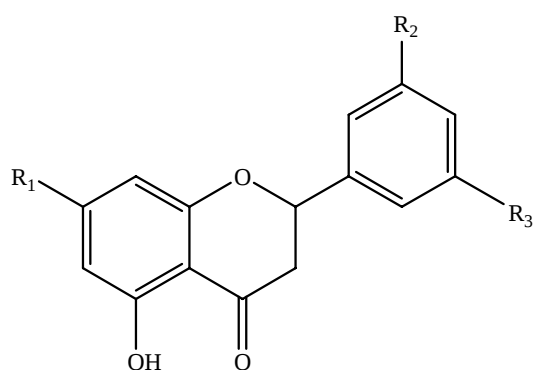
|                 | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |
|-----------------|------------------|----------------|------------------|
| (1) Quercetin   | OH               | OH             | OH               |
| (2) Rhamnetin   | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH               |
| (3) Tamarixetin | OH               | OH             | OCH <sub>3</sub> |



|                             | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|-----------------------------|------------------|----------------|----------------|
| (4) Luteolin                | OH               | OH             | OH             |
| (5) Luteolin-7-methyl ether | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH             |



|                                         | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |
|-----------------------------------------|------------------|----------------|------------------|
| (6) Dihydroquercetin-4'-methylether     | OH               | OH             | OCH <sub>3</sub> |
| (7) Dihydroquercetin-7,4'-dimethylether | OCH <sub>3</sub> | OH             | OCH <sub>3</sub> |



|                                     | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|-------------------------------------|------------------|----------------|----------------|
| (8) 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone | OH               | OH             | OH             |
| (9) Blumeatin                       | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH             |

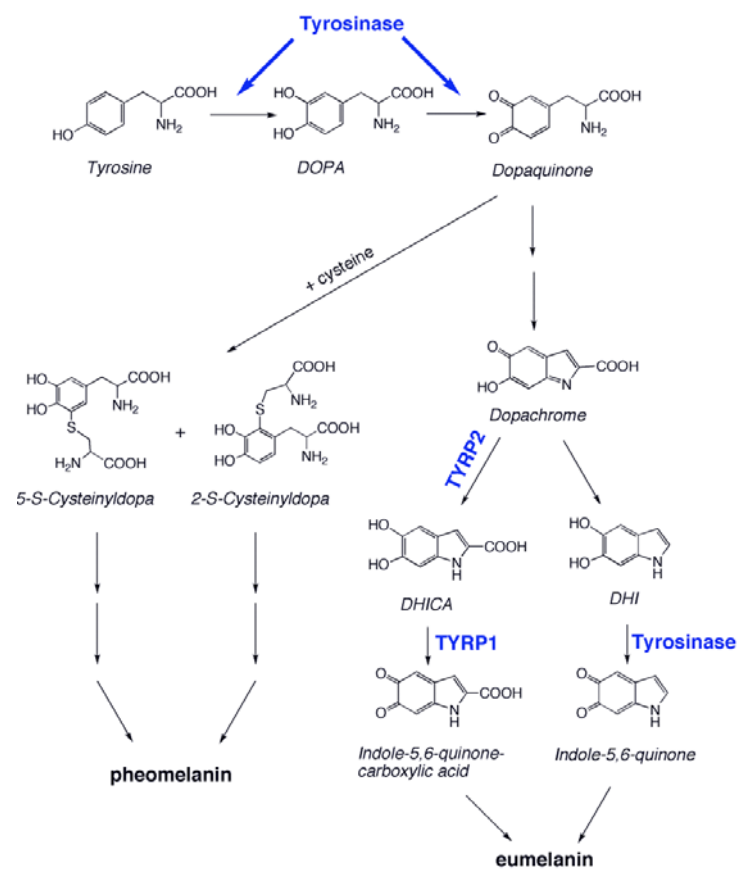
## สารบัญ

|                                                     | หน้า |
|-----------------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                                     | i    |
| บทคัดย่อ (ไทย)                                      | ii   |
| บทคัดย่อ (อังกฤษ)                                   | v    |
| บทนำ                                                | 1    |
| วิธีการทดลอง                                        | 6    |
| ผลการทดลอง วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง              | 13   |
| เอกสารอ้างอิง                                       | 29   |
| Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว. | 31   |

## บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลของสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอม หรือโมเลกุล มีความไม่คงตัว จึงว่องไวต่อการทำปฏิกิริยา สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ยังผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย เช่น ในระบบผิวหนังทำให้เกิดภาวะ Aging เช่น เกิดรอยเหี่ยวย่น (Wrinkle) เกิดเป็นจุดสี (Lipofuscin Spot) หรือเป็นมะเร็งผิวหนังบางชนิด ในระบบหัวใจและหลอดเลือดทำให้เกิดหลอดเลือดแข็งตัว ในระบบสมองเป็นสาเหตุร่วมในการเกิดโรค Parkinson ดังนั้น สารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ และด้านการเกิด oxidation จึงมีบทบาทในการป้องกันหรือยับยั้งความรุนแรงของอาการหรือโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ เช่น อาหาร เครื่องสำอาง เกิดการหืนได้

ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเกิดเม็ดสีเมลานินในผิวหนัง (แผนภาพที่ 1) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดสีที่ผิวหนัง และทำให้ผิวคล้ำ ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงมีผลยับยั้งการสร้างเมลานิน สารเหล่านี้มีประโยชน์ในการรักษาโรคผิวหนังบางชนิด เช่น ฝ้า กระ นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเป็นสารที่ช่วยทำให้ผิวขาว (whitening agent) ที่ใช้ในเครื่องสำอางอีกด้วย (Masuda *et al*, 1996)



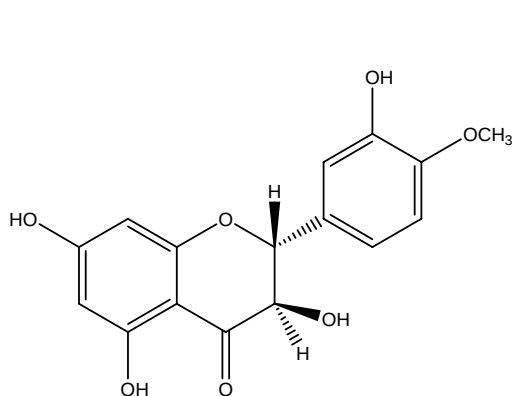
ภาพที่ 1 แสดงกลไกการเกิดเมลานิน

## หนาด

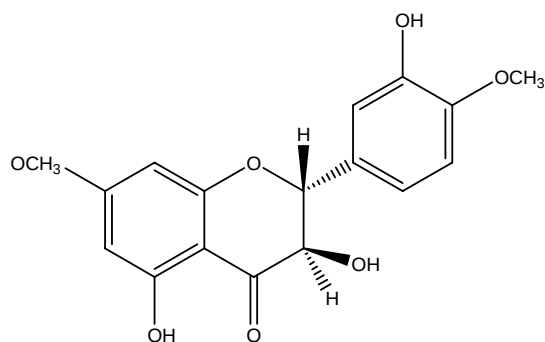
วงศ์สฤติ (วงศ์สฤติและคณะ 2540) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางเภสัชเวทของใบหนาด โดยการศึกษาจุลทรรศน์ลักษณะรวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของใบหนาด (*Blumea balsamifera* (Linn.)DC.) พบว่าใบหนาดประกอบด้วยเนื้อเยื่อและเซลล์ที่สำคัญ ได้แก่ เนื้อเยื่อผิวด้านบนซึ่งเป็นเซลล์ชั้นเดียวปกคลุมด้วยขนชนิดที่มีต่อมแต่ไม่มีเซลล์ปากใบ เนื้อเยื่อผิวด้านล่างซึ่งมีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อผิวด้านบนปกคลุมด้วยขนชนิดหลายเซลล์ และเซลล์ปากใบชนิด anomocytic กลุ่มเซลล์ palisade 1-2 ชั้น กลุ่มเซลล์ spongy 4-5 ชั้น เส้นกลางใบและก้านใบประกอบด้วยเนื้อเยื่อ parenchyma, collenchyma, vessel และ fiber ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ พบว่า ค่าที่สูญเสียจากการระเหยแห้ง แก๊สที่ไม่ละลายในกรด และแก๊สทั้งหมดมีค่าไม่เกิน 8, 4 และ 16% ตามลำดับ สำหรับค่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ น้ำ และอีเทอร์ มีค่าไม่น้อยกว่า 17, 13 และ 7% ตามลำดับ

## การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหนาด

มีรายงานการแยกสารจากใบหนาดใหญ่พบว่า ได้ฟลาโวนอยด์ 2 ชนิด คือ (2R,3R)-dihydroquercetin-4'-methyl ether และ (2R,3R)-dihydroquercetin-4',7-dimethyl ether พร้อมทั้งได้สรุปสูตรโครงสร้างของสารทั้ง 2 ชนิด โดยการศึกษาข้อมูลทางสเปกตรัมและทางเคมีควบคู่กัน (Tappayuthpijarn, 1981; Ruangrunsi *et al*, 1981)

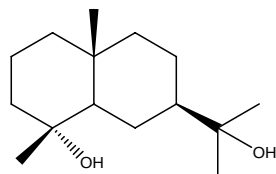


(2R,3R)-dihydroquercetin-4'-methyl ether



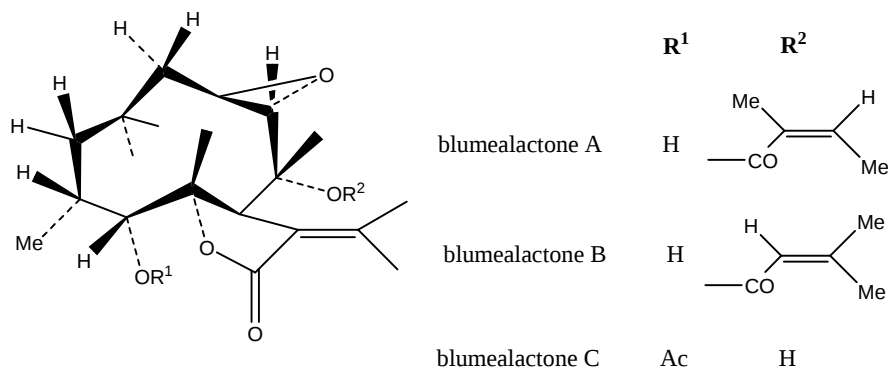
(2R,3R)-dihydroquercetin-4',7-dimethyl ether

Ruangrungsi และคณะ (Ruangrungsi *et al*, 1985) ได้ทำการศึกษาและแยกสารจากใบของ หนาดใหญ่พบว่า ได้ cryptomeridiol ซึ่งเป็นสารต้านอาการกระตุก ชัก และอาการเกร็งของ กล้ามเนื้อ

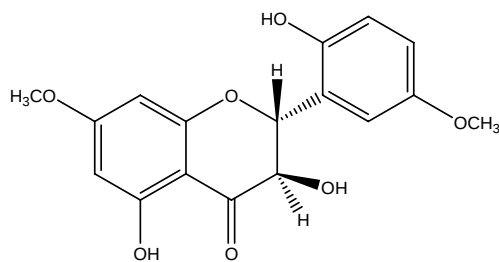


cryptomeridiol

สาร sesquiterpene lactone 3 ชนิด คือ blumealactone A B และ C ซึ่งเป็นสารต้านเนื้องอก (Fujimoto *et al*, 1988)



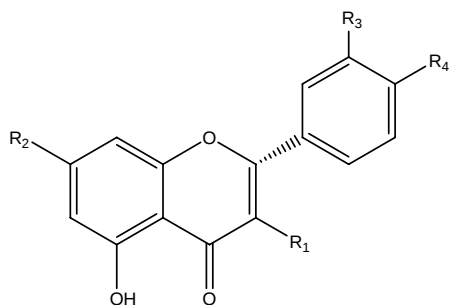
Barua และ Sharma (Barua and Sharma 1992) สามารถแยกสาร (2R,3R)-7,5'-dimethoxy-3,5,2'-trihydroxyflavanone จากใบหนาด



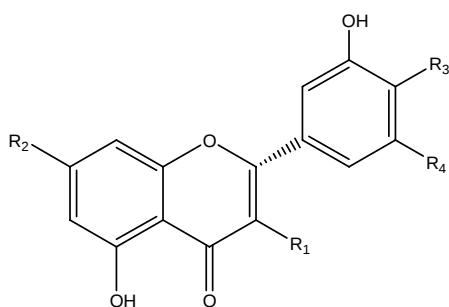
(2R,3R)-7,5'-dimethoxy-3,5,2'-trihydroxyflavanone

Nessa และคณะ (Nessa *et al*, 2004) ได้ศึกษาและแยกสารจากใบหนาดใหญ่ โดยใช้วิธีการทางสเปกโตรสโกปีในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี พบว่า สามารถแยกฟลาโวนอยด์ได้ 11 ชนิด คือ velutin, ombuine, tamarixetin, rhamnetin, luteolin, luteolin-7-methylether, quercetin,

5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone, blumeatin, dihydroquercetin-7-4'-dimethylether และ dihydroquercetin-4'-dimethylether



|                         | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub>   |
|-------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| Velutin                 | H              | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | OH               |
| Ombuine                 | OH             | OCH <sub>3</sub> | OH               | OCH <sub>3</sub> |
| Tamarixetin             | OH             | OH               | OH               | OCH <sub>3</sub> |
| Rhamnetin               | OH             | OCH <sub>3</sub> | OH               | OH               |
| Luteolin                | H              | OH               | OH               | OH               |
| Luteolin-7-methyl ether | H              | OCH <sub>3</sub> | OH               | OH               |
| Quercetin               | OH             | OH               | OH               | OH               |



|                                     | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub> |
|-------------------------------------|----------------|------------------|------------------|----------------|
| 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavone       | H              | OH               | H                | OH             |
| Blumeatin                           | H              | OCH <sub>3</sub> | H                | OH             |
| Dihydroquercetin-7,4'-dimethylether | OH             | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H              |
| Dihydroquercetin-4'-dimethylether   | OH             | OCH <sub>3</sub> | OH               | OH             |

Ali (Ali *et al*, 2005) ได้ทำการแยกสารจากใบแห้งของหนาดใหญ่ พบว่า ได้ฟลาโวนอยด์ที่ยังไม่เคยมีรายงานในหนาดใหญ่มาก่อน คือ 3-O-7''-biluteolin

### การศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของหนาดใหญ่

หนาดใหญ่ (*Blumea balsamifera* (Linn. DC.) เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้ทำยา ชาวจีนใช้ประโยชน์ในด้านขับลมในท้อง ยาบำรุงกำลัง ยาขับพยาธิ ยาใช้เฉพาะที่ ยาป้องกันโรคหรือการติดเชื้อต่างๆ ในร่างกาย (Tappayuthpijarn 1981) สำหรับในประเทศไทยใช้ประโยชน์ในด้านบรรเทา

อาการเจ็บปวด ใช้นิดเข้าเส้นเลือด เป็นยาขับลม ยาขับเสมหะ (Tappayuthpijarn 1981) ส่วนในด้านฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีการใช้เพื่อการยับยั้งหรือขัดขวางเกี่ยวกับระบบประสาทอัตโนมัติ (Leclerc 1940) และมีปัสสาวะมากผิดปกติ (Vander 1942) รักษาโรคนอนไม่หลับ (Leclerc 1940)

Chiayvareesajja และคณะ (Chiayvareesajja *et al*, 1987) ได้ทำการทดลองและทดสอบฤทธิ์ของพันธุ์ไม้ไทย พบว่า หนาดใหญ่ มีผลต่อการฆ่าปาลานิล

Tan และคณะ (Tan *et al*, 1991) ได้รายงานการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ของสารสกัดจากหนาดใหญ่

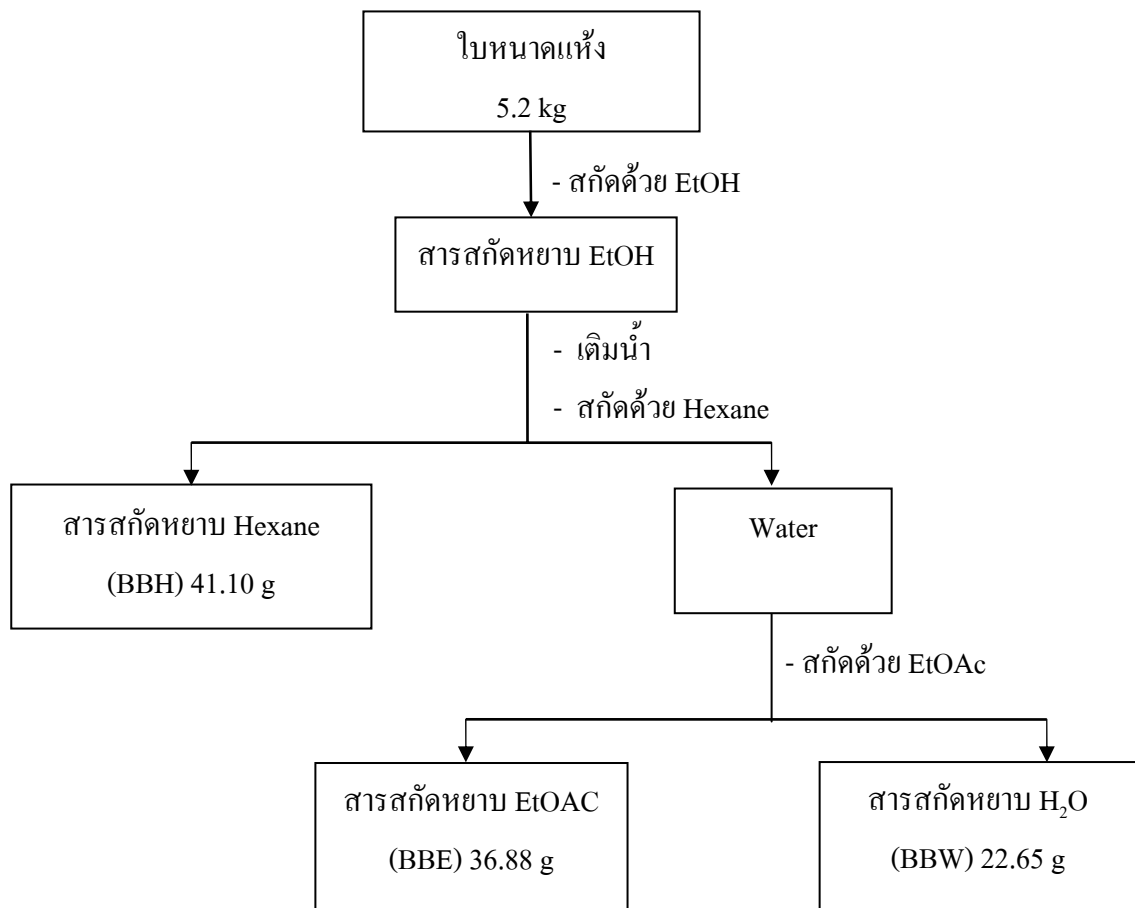
Nessa และคณะ (Nessa *et al*, 2004) ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากใบหนาดใหญ่ โดยใช้วิธี DPPH assay พบว่าการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีค่าลดลงตามลำดับดังนี้ สารสกัดของเมทานอล มากกว่าสารสกัดของคลอโรฟอร์ม มากกว่าสารสกัดของปิโตรเลียมอีเทอร์ และการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากใบหนาดใหญ่เปรียบเทียบกับ butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), L-ascorbic acid และ  $\alpha$ -tocopherol มีค่าลดลงตามลำดับดังนี้ quercetin > rhamnetin > luteolin > luteolin-7-methylether > L-ascorbic acid > blumeatin > BHA > 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone > tamarixetin > BHT >  $\alpha$ -tocopherol > dihydroquercetin-4- dimethylether > dihydroquercetin-7-4'-dimethylether

## วิธีการดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 : การสกัด แยกสารให้บริสุทธิ์และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

### 1. การสกัดพืช

นำตัวอย่างพืชมาตากลมให้แห้ง แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเป็นเวลา 7 วัน ทำซ้ำสองครั้ง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะลดความดันบรรยากาศ จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบเอทานอลที่ได้มาสกัดด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทตามลำดับ จากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออกได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (BBH; 41.10 กรัม) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (BBE; 36.88 กรัม) และสารสกัดหยาบน้ำ (BBW; 22.65 กรัม) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การสกัดใบหนาดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

## 2. การแยกส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบทั้งหมดพบว่าส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทแสดงฤทธิ์สูงสุด จึงนำส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (BBE) มาแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยโครมาโทกราฟีแบบลดความดัน โดยมีเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทเป็นตัวชะ (eluent) ในลักษณะ polarity gradient ได้ส่วนสกัดย่อย 9 ส่วน (F1-F9)

ส่วนย่อย F2 (30.1 g) นำไปแยกต่อด้วย flash CC โดยใช้ hexane-ethylacetate (4:1) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (F2-1 ถึง F2-5) จากนั้นนำ F2-3 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค TLC โดยใช้ hexane-ethylacetate (1:1) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 2 สารคือ dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) (1.49 กรัม) และ blumeatin (9) (53.7 มิลลิกรัม)

Dihydroquercetin-7,4'-dimethylether (7) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว  $^1\text{H}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  11.69 (1H, s, 5-OH), 7.74 (1H, s, 3'-OH), 7.09 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.02 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.1$  Hz, H-6'), 6.98 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-5'), 6.08 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 6.06 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 5.10 (1H, d,  $J = 11.6$  Hz, H-2), 4.79 (1H, d,  $J = 4.4$  Hz, 3-OH), 4.67 (1H, dd,  $J = 11.6, 4.4$  Hz, H-3), 3.88 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.86 (s, 7-OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$ ): 195.8 (C-4), 168.4 (C-7), 163.8 (C-5), 163.1 (C-9), 148.0 (C-4'), 146.5 (C-3'), 130.1 (C-1'), 119.6 (C-6'), 114.6 (C-2'), 111.1 (C-5'), 100.2 (C-10), 94.9 (C-6), 93.8 (C-8), 83.6 (C-2), 72.3 (C-3), 55.5 (7-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (4'-OCH<sub>3</sub>). ESITOFMS  $m/z$  333  $[\text{M} + \text{H}]^+$

Blumeatin (9) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  (400 MHz, Acetone- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  12.16 (1H, s, 5-OH), 7.12 (1H, s, H-4'), 6.95 (2H, s, H-2' and H-6'), 6.12 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.13 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.50 (1H, dd,  $J = 12.6, 2.8$  Hz, H-2), 3.95 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.20 (1H, dd,  $J = 17.1, 12.6$  Hz, H-3b), 2.81 (1H, dd,  $J = 17.1, 2.8$  Hz, H-3a),  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$ ): 197.1 (C4), 167.5 (C7), 163.3 (C5), 162.9 (C9), 145.9 (C3' หรือ C5'), 145.3 (C5' หรือ C3'), 129.4 (C1'), 118.1 (C4'), 115.4 (C6'), 114.5 (C2'), 102.7 (C10), 94.7 (C6), 93.9 (C8), 78.8 (C2), 42.2 (C3) และ 56.0 (7-OCH<sub>3</sub>). ESITOFMS  $m/z$  303  $[\text{M} + \text{H}]^+$

ส่วนย่อย F4 (8.29 g) นำไปแยกต่อด้วย flash CC โดยใช้ hexane-ethylacetate (9:1) และเป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 7 ส่วน (F4-1 ถึง F4-7) ตามด้วย flash CC โดย dichloromethane-ethylacetate-

acetone (18:1:1) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 5 สารคือ rhamnetin (2) (9.2 mg), luteolin (4) (20.3 mg), luteolin-7-methyl ether (5) (5.1 mg), dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) (30.1 mg), and 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) (302.9 mg)

Rhamnetin (2) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง  $^1\text{H}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$  + DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  12.08 (1H, s, 5'-OH), 7.76 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.74 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6'), 7.07 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.52 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.22 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 3.89 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$  + DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  177.5 (C-4), 165.7 (C-7), 162.6 (C-9), 158.4 (C-5), 148.9 (C-4'), 148.2 (C-2), 146.3 (C-3'), 137.4 (C-3), 124.3 (C-10), 121.8 (C-6'), 116.5 (C-5'), 116.4 (C-2'), 104.7 (C-10), 99.4 (C-6), 94.6 (C-8), 55.8 (7-OCH<sub>3</sub>). ESITOFMS  $m/z$  317 [M + H]<sup>+</sup>

Luteolin (4) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง  $^1\text{H}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$  + DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  13.00 (1H, s, 5-OH), 7.47 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.43 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6'), 6.97 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.61 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.23 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6).  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$  + DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  181.6 (C-4), 164.4 (C-7), 163.8 (C-2), 161.7.5 (C-9), 157.3 (C-5), 149.5 (C-4'), 145.7 (C-3'), 121.7 (C-1'), 118.4 (C-6'), 115.5 (C-5'), 112.9 (C-2'), 103.6 (C-10), 102.5 (C-3), 98.5 (C-6), 93.4 (C-8). ESITOFMS  $m/z$  287 [M + H]<sup>+</sup>

Luteolin-7-methyl ether (5) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง  $^1\text{H}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$  + DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  13.00 (1H, s, 5-OH), 7.52 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.49 (1H, dd,  $J = 8.1, 2.1$  Hz, H-6'), 6.99 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.68 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-8), 6.62 (1H, s, H-3), 6.32 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-6), 3.93 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$  + DMSO- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  181.8 (C-4), 165.2 (C-7), 164.13 (C-2), 161.5 (C-9), 157.3 (C-5), 151.2 (C-4'), 148.1 (C-3'), 121.3 (C-1'), 120.2 (C-6'), 115.6 (C-5'), 109.8 (C-2'), 104.6 (C-10), 103.0 (C-3), 97.5 (C-6), 92.1 (C-8), 55.5 (7-OCH<sub>3</sub>). ESITOFMS  $m/z$  301 [M + H]<sup>+</sup>

Dihydroquercetin-7-methylether (6) มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี  $^1\text{H}$  NMR (Acetone- $\text{d}_6$ ):  $\delta$  11.72 (1H, s, 5-OH), 7.09 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.01 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6'), 6.99 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 5.99 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 5.95 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 5.06 (1H,

d,  $J = 11.2$  Hz, H-2), 4.63 (1H, d,  $J = 11.6$  Hz, H-3), 3.87 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (Acetone-d<sub>6</sub>): 197.2 (C-4), 167.3 (C-7), 164.1 (C-9'), 163.2 (C-5), 148.0 (C-4'), 146.4 (C-3'), 130.2 (C-1'), 119.6 (C-6'), 114.6 (C-2'), 111.1 (C-5'), 100.5 (C-10), 96.2 (C-8), 95.2 (C-6), 83.5 (C-2), 72.2 (C-3), 55.4 (4'-OCH<sub>3</sub>). ESITOFMS  $m/z$  319 [M + H]<sup>+</sup>

5, 6, 3', 5' tetrahydroxyflavanone (8) มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี <sup>1</sup>H NMR (Acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  12.20 (1H, s, 5-OH), 7.03 (1H, s, H-2'), 6.89 (1H, s, H-6'), 6.89 (1H, s, H-4'), 5.95 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 5.93 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.39 (1H, dd,  $J = 12.4, 2.8$  Hz, H-2), 3.14 (1H, dd,  $J = 17.2, 12.8$  Hz, H-3), 2.72 (1H, dd,  $J = 17.2, 2.8$  Hz, H-3). <sup>13</sup>C NMR (Acetone-d<sub>6</sub>): 197.3 (C-4), 167.5 (C-5), 165.4 (C-9), 164.4 (C-7), 146.5 (C-3'), 146.1 (C-5'), 131.6 (C-1'), 119.3 (C-6'), 116.1 (C-4'), 114.8 (C-2'), 103.3 (C-10), 96.9 (C-6), 80.0 (C-2), 95.9 (C-8), 43.6 (C-3). ESITOFMS  $m/z$  289 [M + H]<sup>+</sup>

ส่วนย่อย F5 (4.65 g) นำไปแยกต่อด้วย flash CC โดยใช้ hexane-ethylacetate (1:1) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ tamarixetin (3) (8.5 mg)

Tamarixetin (3) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง <sup>1</sup>H NMR (Acetone-d<sub>6</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  12.43 (1H, s, 5'-OH), 7.80 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.77 (1H, dd,  $J = 8.7, 2.1$  Hz, H-6'), 7.12 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-5'), 6.51 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 6.26 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 3.93 (3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (Acetone-d<sub>6</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  175.2 (C-4), 164.2 (C-7), 156.3 (C-9), 160.8 (C-5), 149.2 (C-4'), 145.9 (C-2), 146.3 (C-3'), 136.3 (C-3), 123.6 (C-10), 119.6 (C-6'), 114.4 (C-5'), 111.3 (C-2'), 102.8 (C-1'), 98.0 (C-6), 93.1 (C-8), 55.1 (4'-OCH<sub>3</sub>). ESITOFMS  $m/z$  317 [M + H]<sup>+</sup>

ส่วนย่อย F7 (5.47 g) นำไปแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ ethanol และตามด้วย preparative TLC โดยใช้ dichloromethane-ethylacetate-acetone (7:2:1) ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ quercetin (1) (22.7 mg)

Quercetin (1) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง <sup>1</sup>H NMR (Acetone-d<sub>6</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  12.39 (1H, s, 5'-OH), 7.83 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.68 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6'), 6.98 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.51 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.26 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6). <sup>13</sup>C NMR (Acetone-d<sub>6</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  175.6 (C-4), 164.1 (C-7), 160.9 (C-9), 156.3 (C-5), 147.5 (C-4'), 146.3 (C-2),

144.9 (C-3'), 135.6 (C-3), 122.1 (C-10), 119.8 (C-6'), 115.1 (C-5'), 114.7 (C-2'), 102.7 (C-1'), 97.9 (C-6), 93.1 (C-8). ESITOFMS  $m/z$  303  $[M + H]^+$

### 3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี 2-2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระในสารสกัดใบหนาดด้วยวิธี DPPH คัดแปลงจากวิธีที่มีรายงานโดย Nuchanart และคณะ(2007) โดยหยดสารสกัด (หรือสารบริสุทธิ์, เอทานอล, ascorbic acid; สารมาตรฐาน) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 195 ไมโครลิตร ในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม หลังจากนั้นบ่มเพลทในที่มืดอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท

ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระคำนวณ โดยสมการดังนี้

$$\text{Radical scavenging (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

ค่า  $SC_{50}$  ของสารมาตรฐานประเมินค่าโดยการวาดกราฟเส้นระหว่างความเข้มข้น (x) และร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (y) และนำสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานแต่ละตัวคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ร้อยละ 50

### 4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดใบหนาดด้วยวิธี dopachrome คัดแปลงจากวิธีที่มีรายงานโดย Kubo และคณะ(2000) การเกิดปฏิกิริยาแบ่งเป็น 4 หลอดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1 ลำดับการหยดสารดังนี้ หยดโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.8 และหยดสารสกัด (หรือสารบริสุทธิ์, เอทานอล, kojic acid; สารมาตรฐาน) ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลาย L-dopa ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เขย่าแล้วหยดเอนไซม์ไทโรซิเนส ผสมให้เข้ากันภายใน 10 วินาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร และหลังจาก 20 วินาที วัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ 475 นาโนเมตร ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสคำนวณตามสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{Tyrosinase inhibition} = \frac{[A - (B - C)]}{A} \times 100$$

A, B และ C เป็นค่าต่างที่วัดได้ของปฏิกิริยาแต่ละหลอดที่ 475 นาโนเมตร ระหว่างก่อนและหลังบ่ม

ตารางที่ 1 ปริมาตรสารละลายในการทำปฏิกิริยาของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

| หลอด  | L-Dopa<br>(มล.) | บัฟเฟอร์<br>(มล.) | ตัวทำละลาย<br>(มล.) | ตัวอย่าง<br>(มล.) | ไทโรซิเนส<br>(มล.) |
|-------|-----------------|-------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| blank | -               | 2.9               | 0.1                 | -                 | -                  |
| A     | 1.0             | 1.8               | 0.1                 | -                 | 0.1                |
| B     | 1.0             | 1.8               | -                   | 0.1               | 0.1                |
| C     | 1.0             | 1.9               | -                   | 0.1               | -                  |

ตอนที่ 2 : การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสารสกัดใบหนาดจากแหล่งที่ต่างกัน

### 1. วิธีทำให้แห้ง

เก็บใบหนาดจากแหล่งต่าง ๆ (อำเภอเชียงของ, อำเภอเชียงแสน, อำเภอดอยหลวง, อำเภอแม่จัน, อำเภอแม่สาย, อำเภอพญาเม็งราย, อำเภอเวียงชัย) ตากลมที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งวัน

### 2. การสกัด

ชั่งใบหนาดแห้งแหล่งละ 20 กรัม แช่ในตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตร ซึ่งได้แก่ น้ำกลั่น, เอทานอล, เอทิลอะซิเตท, ไดคลอโรมีเทน และ เฮกเซน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 และทำให้แห้งโดยการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนการศึกษารั้งต่อไป

### 3. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิธีการทดสอบหาผลรวมสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบหนาดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu อ้างอิงวิธีทำจาก Gajula และคณะ(2009) โดยหยดสารสกัด (หรือเอทานอลบริสุทธิ์; กรดแกลลิก) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นหยดสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร หลังจาก 5 นาที เติมน้ำโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำเฟลทปฏิกิริยาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท อ่านค่าดูดกลืนแสงของแกลลิกแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ วาดกราฟเส้นระหว่างความเข้มข้น (x) และค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (y) เพื่อหาสมการเส้นตรง และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบหนาดแสดงโดยคำนวณเทียบกับปริมาณกรดแกลลิก (GAE) ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของตัวอย่าง

### 4. การทดสอบความสามารถในการรีดักชัน

วิธีการทดสอบความสามารถในการรีดักชันในสารสกัดใบหนาดด้วยวิธี Ferrous reducing power คัดแปลงจากวิธีที่มีรายงานโดย Takashi Kuda และคณะ(2009) หยดสารสกัด (หรือเอทานอลบริสุทธิ์, ascorbic acid, สารมาตรฐานที่ได้กล่าวข้างต้น) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.2 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ potassium ferricyanide ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมในไมโคร

เพลทขนาด 96 หลุม หลังจากนั้นบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 60 นาที หยด Trichloroacetic acid ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร ( $Abs_{before}$ ) และหลังจากวัดค่าดูดกลืนแสงหยด Ferric chloride ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้ง ( $Abs_{after}$ ) ปฏิกริยาค่าดูดกลืนแสงสามารถคำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{Reducing Power (OD)} = [Abs_{after} - Abs_{before}]_{\text{sample}} - [Abs_{after} - Abs_{before}]_{\text{control}}$$

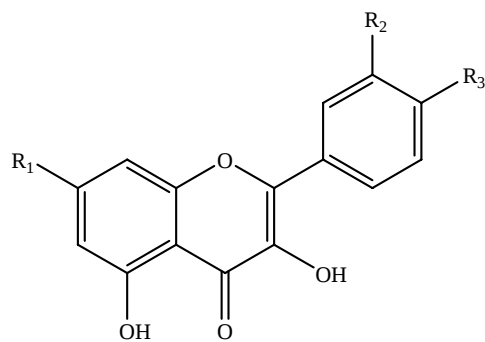
## 5. การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี HPLC

วิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณสารประกอบของสกัดใบหนาดด้วยวิธี HPLC ดัดแปลงจากวิธีที่มีรายงานโดย Nessa และคณะ (2005) การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารประกอบที่เป็นจำพวกฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาดใช้คอลัมน์ Reverse phase ชนิด  $C_{18}$  โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 0.5% phosphoric acid (50:50, v/v) อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 285 นาโนเมตร อัตราการเคลื่อนที่ 0.1 มิลลิเมตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร ควบคุมอุณหภูมิของระบบที่ 30 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์สารประกอบจะฉีดซ้ำ 3 ครั้ง สำหรับค่าดูดกลืนแสงที่วิเคราะห์เป็นพื้นที่ได้กราฟของสารมาตรฐานจำพวกฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นทำ standard curve เพื่อใช้เปรียบเทียบหาปริมาณสารประกอบในสารสกัด

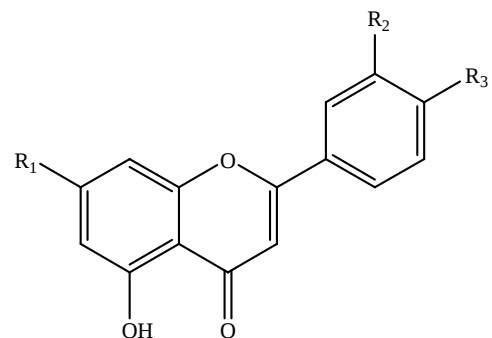
## ผลการทดลอง วิจัยรณัผล และสรุปรผลการทดลอง

ตอนที่ 1 : การสกัด แยกสารให้บริสุทธิ์และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

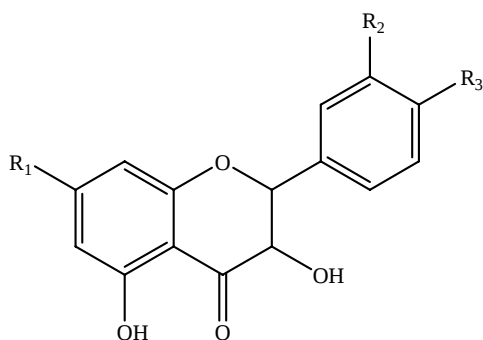
องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบหนาดมีทั้งหมด 9 สาร โดยเป็นสารประเภท flavonols 3 สาร คือ quercetin (1), rhamnetin (2), tamarixetin (3) สารประเภท flavones 2 สารคือ luteolin (4) และ luteolin-7-methyl ether (5) สารประเภท dihydroflavonols 2 สารคือ dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) และ dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) สารประเภท flavanones 2 สารคือ 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) และ blumeatin (9)



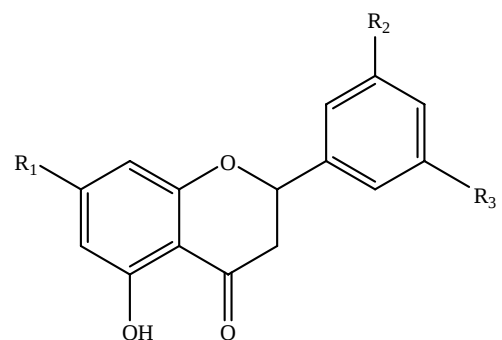
|                 | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |
|-----------------|------------------|----------------|------------------|
| (1) Quercetin   | OH               | OH             | OH               |
| (2) Rhamnetin   | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH               |
| (3) Tamarixetin | OH               | OH             | OCH <sub>3</sub> |



|                             | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|-----------------------------|------------------|----------------|----------------|
| (4) Luteolin                | OH               | OH             | OH             |
| (5) Luteolin-7-methyl ether | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH             |



|                                         | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |
|-----------------------------------------|------------------|----------------|------------------|
| (6) Dihydroquercetin-4'-methylether     | OH               | OH             | OCH <sub>3</sub> |
| (7) Dihydroquercetin-7,4'-dimethylether | OCH <sub>3</sub> | OH             | OCH <sub>3</sub> |



|                                     | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|-------------------------------------|------------------|----------------|----------------|
| (8) 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone | OH               | OH             | OH             |
| (9) Blumeatin                       | OCH <sub>3</sub> | OH             | OH             |

ภาพที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบหนาด

ตารางที่ 2ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหนาด (*Blumea balsamifera* DC) ( $n = 3$ )

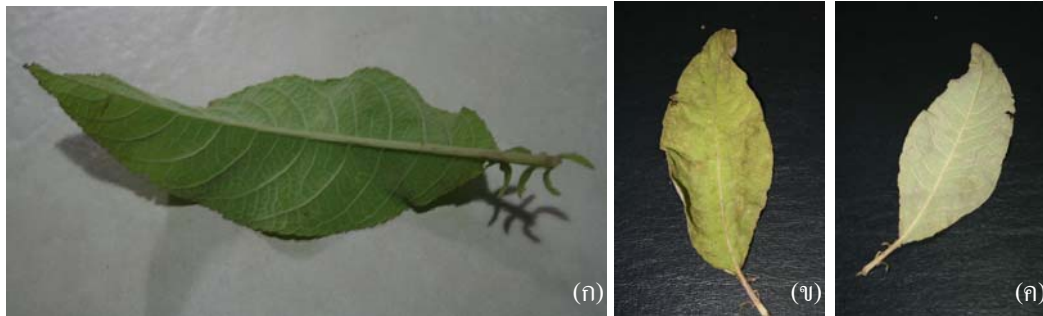
| สารสกัด              | IC <sub>50</sub> (mg/ml) |
|----------------------|--------------------------|
| Hexane extract       | 0.319 ± 0.002            |
| Ethylacetate extract | 0.206 ± 0.004            |
| Water extract        | 0.345 ± 0.008            |

ตารางที่ 3ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์จากใบหนาด (*Blumea balsamifera* DC)

| สารประกอบ                                | IC <sub>50</sub> (mM) ±SD |
|------------------------------------------|---------------------------|
| Quercetin (1)                            | 0.072 ± 0.004             |
| Rhamnetin (2)                            | 0.107 ± 0.017             |
| Tamarixetin (3)                          | 0.144 ± 0.004             |
| Luteolin (4)                             | 0.258 ± 0.015             |
| Luteolin-7-methyl ether (5)              | 0.350 ± 0.002             |
| Dihydroquercetin-4'-methyl ether (6)     | 0.115 ± 0.013             |
| Dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) | 0.162 ± 0.042             |
| 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone (8)      | 0.423 ± 0.049             |
| Blumatin (9)                             | 0.624 ± 0.029             |
| Kojic acid                               | 0.009 ± 0.005             |
| Arbutin                                  | 0.233 ± 0.025             |

ตอนที่ 2 : การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสารสกัดใบหนาดจากแหล่งที่ต่างกัน

### สารสกัดใบหนาด



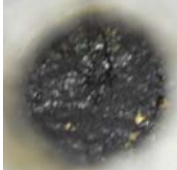
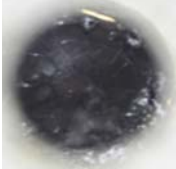
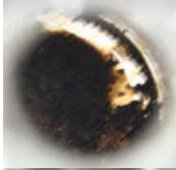
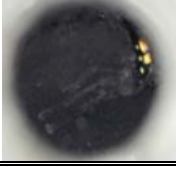
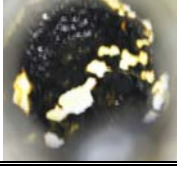
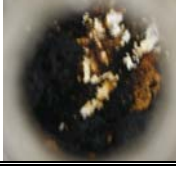
ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของใบหนาด; ใบสด (ก) และใบแห้ง (ข), (ค)

ใบหนาด (ภาพที่ 3 ก-ค) เก็บรวบรวมจากจังหวัดเชียงราย ในอำเภอต่างๆ 7 อำเภอ นำใบมาตากลมให้แห้งแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน (DCM), เอทิลอะซิเตท (EtOAc), เอทานอล (EtOH) และน้ำกลั่น หลังจากแช่ใบหนาดแห้งในตัวทำละลาย 12 ชั่วโมง นำสารสกัดกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วไปทำให้แห้งด้วยระบบสุญญากาศ

สารสกัดด้วยเฮกเซนมีสีเหลืองลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว, สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีสีเขียวเข้มแกมเหลืองลักษณะหนืดกึ่งแข็งกึ่งเหลว, ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและเอทานอลมีสีดำแกมเขียวเข้มลักษณะหนืดกึ่งแข็งกึ่งเหลวและสารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีสีดำลักษณะแข็งแห้ง (ตารางที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละผลได้ของสารสกัดใบหนาด พบว่า สารสกัดด้วยเฮกเซนมีร้อยละผลได้น้อยที่สุด เนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำ จึงไม่สามารถสกัดหรือละลายสารในใบหนาดซึ่งเป็นจำพวกฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซีหลายหมู่ ในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงกว่าเฮกเซน ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท เอทานอล และน้ำกลั่น แสดงร้อยละผลได้ของสารสกัดใบหนาดสูงกว่าโดยเพิ่มมากขึ้นตามขั้ว และตามความสามารถในการสกัดสารจำพวกฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซีหลายหมู่ สารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีร้อยละผลได้มากที่สุด และสารสกัดจากอำเภอพญาเม็งรายแสดงร้อยละผลได้มากที่สุดเมื่อเทียบในตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบหนาดจากอำเภอต่างๆ ในจังหวัดเชียงราย

| แหล่ง | Types of solvent extraction                                                         |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |                                                                                       |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|       | Hexane                                                                              | DCM                                                                                 | EtOAc                                                                               | EtOH                                                                                  | Water                                                                                 |
| CHK   |    |    |    |    |    |
| CHS   |    |    |    |    |    |
| DL    |   |   |   |   |   |
| MCH   |  |  |  |  |  |
| MS    |  |  |  |  |  |
| PMR   |  |  |  |  |  |
| WCH   |  |  |  |  |  |

CHK; อำเภอเชียงของ, CHS; อำเภอเชียงแสน, DL; อำเภอดอยหลวง, MCH; อำเภอแม่จัน, MS; อำเภอแม่สาย, PMR; อำเภอพญาเม็งราย, WCH; อำเภอเวียงชัย

ตารางที่ 5 ร้อยละผลได้ของสารสกัดใบหนาดจากอำเภอต่างๆ ในจังหวัดเชียงราย

| แหล่ง | ร้อยละผลได้            |      |       |      |       |
|-------|------------------------|------|-------|------|-------|
|       | ชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ |      |       |      |       |
|       | Hexane                 | DCM  | EtOAc | EtOH | Water |
| CHK   | 0.63                   | 0.99 | 1.90  | 3.97 | 4.70  |
| CHS   | 0.47                   | 0.58 | 1.27  | 3.56 | 3.68  |
| DL    | 0.50                   | 0.65 | 1.68  | 3.41 | 5.22  |
| MCH   | 0.32                   | 0.53 | 1.44  | 3.55 | 3.64  |
| MS    | 0.43                   | 0.50 | 1.35  | 3.45 | 2.91  |
| PMR   | 0.63                   | 1.41 | 5.08  | 5.11 | 6.59  |
| WCH   | 0.56                   | 0.92 | 2.18  | 4.14 | 4.14  |

CHK; อำเภอเชียงของ, CHS; อำเภอเชียงแสน, DL; อำเภอดอยหลวง, MCH; อำเภอแม่จัน, MS; อำเภอแม่สาย, PMR; อำเภอพญาเม็งราย, WCH; อำเภอเวียงชัย

#### 4.3 การทดสอบหาผลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลรวมสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบหนาดทดสอบโดยวิธี Folin Ciocalteu ซึ่งสารเคมีชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซีของฟีนอลิก และในการทดลองนี้จะเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดโดยใช้สมการของเกลติกแอซิดในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 4.4

สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ซึ่งปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลิกลดลงตามความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกของตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนี้ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต > สารสกัดด้วยเอทานอล > สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน > สารสกัดด้วยน้ำกลั่น > สารสกัดด้วยเฮกเซน ซึ่งสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอลหลายหมู่ในพืชจะถูกสกัดได้ด้วยความสามารถในการละลายของตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่มีขั้วสูงในปริมาณที่มากกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (Naczek&Shahidi, 2006) จากงานวิจัยใบหนาดพบว่า ในสารสกัดใบหนาดประกอบด้วยสารจำพวกฟลาโวนอยด์ที่มีกลุ่มไฮดรอกซีหลายหมู่ ซึ่งสามารถละลายได้น้อยในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ เช่น เฮกเซน ยิ่งไปกว่านั้นสารประกอบในสารสกัดใบหนาดประกอบด้วยสารจำพวกอะไกลโคน หรือ โมเลกุลที่ไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ จึงละลายในน้ำได้น้อย

จากการเปรียบเทียบผลรวมสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบหนาดในแต่ละอำเภอพบว่าใบหนาดจากอำเภอดอยหลวงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลิก

คสูงสุด คือ  $620.92 \pm 0.02$  ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสารสกัดจากอำเภอพญาเม็งรายและอำเภอเวียงชัย ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้จากการทดลองสามารถกล่าวได้ว่า สารสกัดใบหนาดจากอำเภอเชียงของ, อำเภอเชียงแสน, อำเภอแม่จัน และอำเภอแม่สายมีปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งลดลงตามลำดับ ( $p < 0.05$ ) สำหรับสารสกัดที่ได้ร้อยละผลได้สูงแต่แสดงปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลิกน้อยเป็นเพราะในสารสกัดประกอบด้วยสารประกอบจำพวกที่ไม่ใช่ฟีนอลิกและไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ Folin Ciocalteu

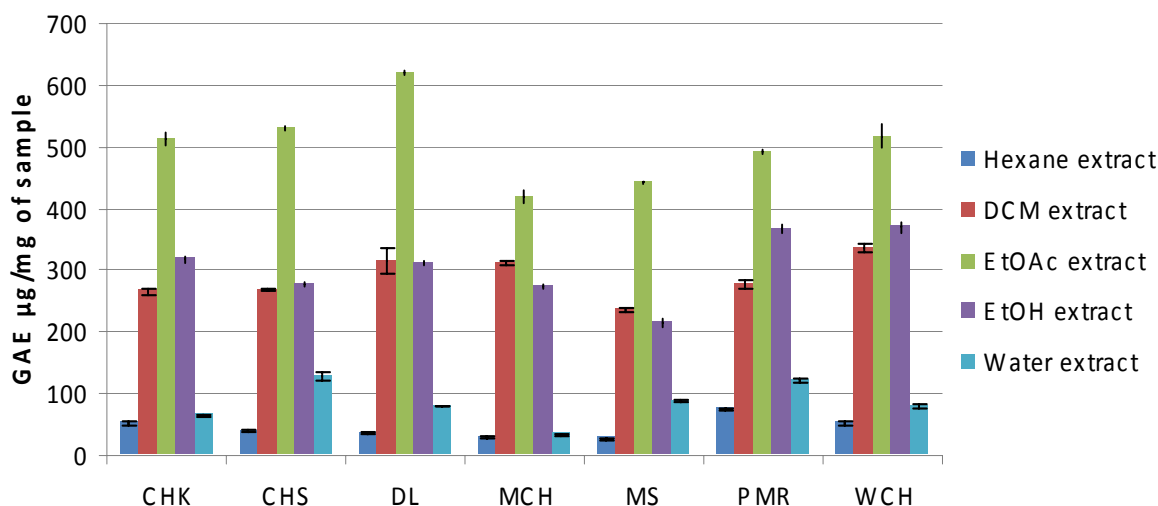
ตารางที่ 6 ปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบหนาด

| แหล่ง             | GAE $\mu\text{g}/\text{mg}$ of sample |                    |                    |                   |                    |
|-------------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
|                   | Types of solvent extraction           |                    |                    |                   |                    |
|                   | Hexane <sup>c</sup>                   | DCM <sup>c</sup>   | EtOAc <sup>a</sup> | EtOH <sup>b</sup> | Water <sup>d</sup> |
| CHK <sup>i</sup>  | 52.08 $\pm$ 2.79                      | 265.33 $\pm$ 5.77  | 514.08 $\pm$ 10.5  | 317.42 $\pm$ 5.02 | 64.58 $\pm$ 2.27   |
| CHS <sup>h</sup>  | 38.42 $\pm$ 2.00                      | 268.08 $\pm$ 1.62  | 529.58 $\pm$ 3.25  | 276.67 $\pm$ 2.79 | 128.67 $\pm$ 6.64  |
| DL <sup>f</sup>   | 36.00 $\pm$ 1.75                      | 313.75 $\pm$ 20.73 | 620.92 $\pm$ 4.06  | 312.83 $\pm$ 4.02 | 80.75 $\pm$ 0.43   |
| MCH <sup>j</sup>  | 29.42 $\pm$ 2.91                      | 310.50 $\pm$ 3.78  | 420.58 $\pm$ 10.04 | 273.92 $\pm$ 2.32 | 33.58 $\pm$ 1.77   |
| MS <sup>k</sup>   | 26.17 $\pm$ 1.89                      | 235.25 $\pm$ 4.42  | 442.17 $\pm$ 2.08  | 216.50 $\pm$ 6.99 | 88.00 $\pm$ 2.88   |
| PMR <sup>g</sup>  | 75.83 $\pm$ 1.60                      | 276.58 $\pm$ 7.87  | 491.75 $\pm$ 2.24  | 368.17 $\pm$ 6.63 | 120.67 $\pm$ 4.40  |
| WCH <sup>fg</sup> | 51.92 $\pm$ 2.55                      | 336.00 $\pm$ 8.35  | 517.42 $\pm$ 18.64 | 370.17 $\pm$ 9.23 | 78.67 $\pm$ 3.62   |

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

<sup>a-c</sup> ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแถวเดียวกัน ( $p < 0.05$ )

<sup>f-k</sup> ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงผลรวมสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบหนาด

#### 4.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ที่ DPPH มีการฟอกสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนในการทำพันธะเป็น DPPH-H ซึ่งมีความคงตัวมากขึ้น สำหรับค่าดูดกลืนแสงที่น้อยกว่า แสดงว่าสารยับยั้งอนุมูลอิสระยังสามารถให้ไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็ว (Nessa, 2004) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของพลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาด 6 ชนิด และนำเปรียบเทียบกับความสามารถกับสารต้านอนุมูลอิสระที่รู้จักกันทั่วไปคือ Ascorbic acid, BHA และ BHT ผลปรากฏว่า Quercetin มีค่า  $SC_{50}$  0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงความสามารถในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ascorbic acid ( $SC_{50}$  0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการทดสอบพลาโวนอยด์และสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระลดลงตามลำดับดังนี้ Quercetin (1) > ascorbic acid > Blumatin (9) > 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone (8) > Butylated hydroxytoluene (BHA) > Dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) > Butylated hydroxytoluene (BHT) > Dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ที่ร้อยละ 50

| สารประกอบ                                | SC <sub>50</sub> (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|------------------------------------------|------------------------------------------|
| Ascorbic acid                            | 0.004                                    |
| Butylated hydroxyanisole (BHA)           | 0.0097                                   |
| Butylated hydroxytoluene (BHT)           | 0.140                                    |
| Quercetin (1)                            | 0.002                                    |
| Dihydroquercetin-4'-methyl ether (6)     | 0.103                                    |
| Dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) | 0.190                                    |
| 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone (8)      | 0.007                                    |
| Blumeatin (9)                            | 0.006                                    |

สารสกัดใบหนาดด้วยเอทิลอะซิเตทมีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด โดยร้อยละที่แสดงความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ และปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 มีค่าความสัมพันธ์ 0.903 โดยใช้ทฤษฎี Pearson correlation ดังนั้นสารสกัดที่มีปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลสูง จะแปรผันตรงกับร้อยละฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีค่าสูงด้วย

สารสกัดใบหนาดด้วยเอทิลอะซิเตทแสดงร้อยละฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ คือ  $97.35 \pm 0.01$  ( $p < 0.05$ ) เพราะตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทสามารถสกัดกลุ่มฟีนอลได้มากกว่า ซึ่งมีไฮดรอกซีหลายหมู่ หรือเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง นอกจากนี้สารสกัดจากอำเภอพญาเม็งรายมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 5

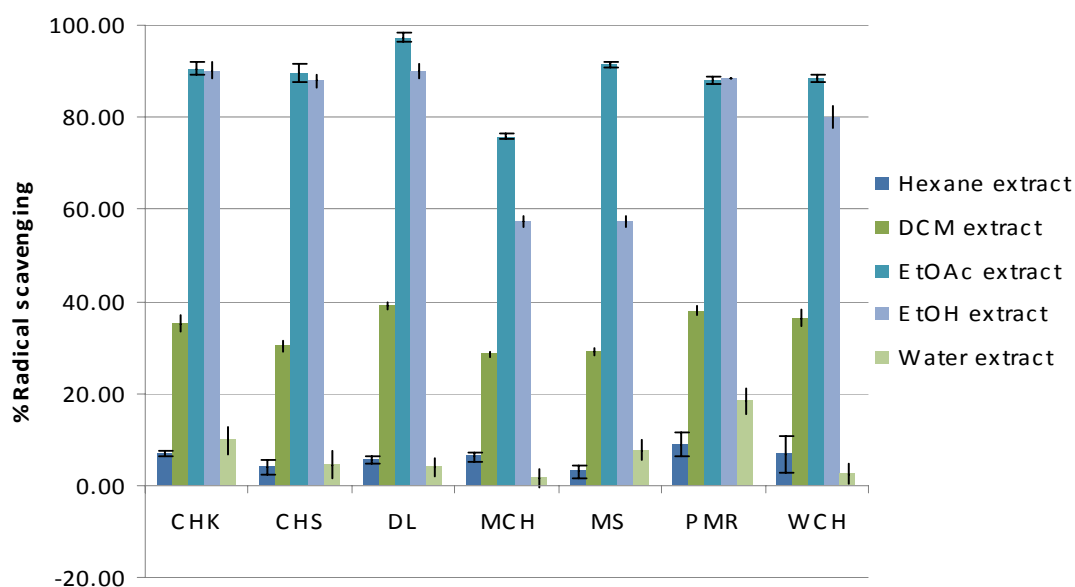
ตารางที่ 8ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหนาด

| แหล่ง            | % Scavenging activity       |                  |                    |                   |                    |
|------------------|-----------------------------|------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
|                  | Types of solvent extraction |                  |                    |                   |                    |
|                  | Hexane <sup>d</sup>         | DCM <sup>c</sup> | EtOAc <sup>a</sup> | EtOH <sup>b</sup> | Water <sup>d</sup> |
| CHK <sup>f</sup> | 6.78±0.59                   | 35.18±1.66       | 90.57±1.40         | 90.18±1.80        | 9.73±2.84          |
| CHS <sup>g</sup> | 3.82±1.57                   | 30.13±1.21       | 89.59±2.07         | 87.85±1.53        | 4.47±2.89          |
| DL <sup>f</sup>  | 5.55±0.67                   | 39.03±0.67       | 97.35±0.91         | 90.06±1.44        | 4.02±2.00          |
| MCH <sup>i</sup> | 6.22±1.07                   | 28.53±0.70       | 75.79±0.67         | 57.39±1.09        | 1.70±1.99          |
| MS <sup>h</sup>  | 2.96±1.51                   | 29.02±0.67       | 91.56±0.56         | 57.46±1.26        | 7.70±2.38          |
| PMR <sup>c</sup> | 8.87±2.57                   | 37.95±0.93       | 87.92±0.77         | 88.39±0.14        | 18.11±2.76         |
| WCH <sup>g</sup> | 6.84±3.95                   | 36.41±1.99       | 88.48±0.65         | 80.11±2.51        | 2.43±2.26          |

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

<sup>a-d</sup> ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแถวเดียวกัน ( $p < 0.05$ )

<sup>e-i</sup> ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน ( $p < 0.05$ )

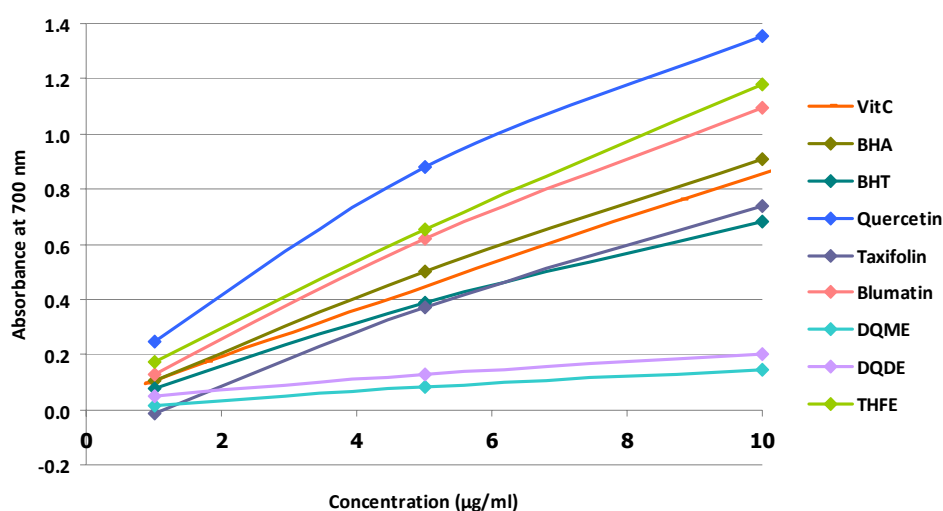


ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหนาด

#### 4.5 การทดสอบความสามารถในการรีดักชัน

ความสามารถในการรีดักชันสามารถวัดปฏิกิริยาของสารที่เปลี่ยน  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  เป็น  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสีฟ้า เนื่องจากประจุ  $\text{Fe}^{3+}$  ที่เหลืออยู่ในระบบ การทำปฏิกิริยาที่เกิดจากการรีดักชันของ  $\text{Fe}^{3+}$  (ferricyanide) ใน stoichiometry ที่เหลืออยู่ในระบบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร ถ้าหากค่าดูดกลืนแสงมากก็แสดงว่าเกิดปฏิกิริยามาก และสารตัวอย่างนั้นมีความสามารถในการรีดักชันสูง

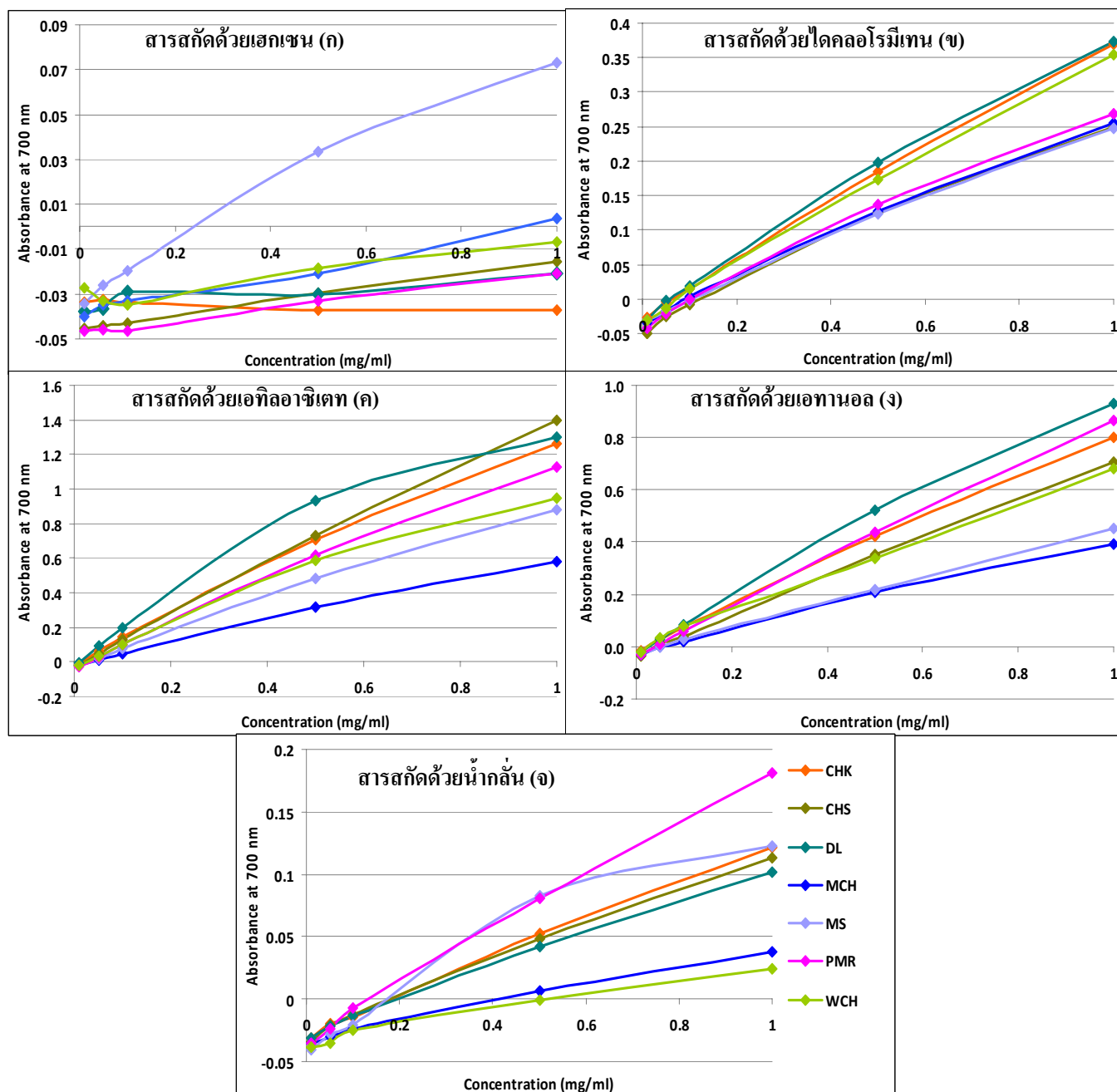
พลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาด 6 ชนิด เทียบปฏิกิริยาความสามารถในการรีดักชันกับ Ascorbic acid ที่เป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังแสดงในกราฟ ภาพที่ 6 ความสามารถในการรีดักชันเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของพลาโวนอยด์ ความสามารถในการรีดักชันของ Quercetin (1), 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone (8) และ Blumatrin (9) มากกว่า ascorbic acid ส่วน Dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) และ Dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) มีความสามารถในการรีดักชันต่ำมาก นอกจากนี้จะพบว่า Quercetin มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ความสามารถในการรีดักชันดีกว่า ascorbic acid



ภาพที่ 6 กราฟเส้นแสดงความสามารถในการรีดักชันของพลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาด

สารสกัดใบหนาดด้วยเฮกเซนแสดงค่าความสามารถในการรีดักชันน้อยที่สุด ดังภาพที่ 7 ก และสารสกัดใบหนาดด้วยเอทิลอะซิเตทแสดงค่าดูดกลืนแสงมากที่สุด ดังรูปภาพที่ 7 ค สารสกัดใบหนาดด้วยไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตท และ เอทานอลที่มาจากอำเภอคลองหลวงแสดงค่าดูดกลืนแสงที่มาก แต่สารสกัดจากอำเภอแม่จันแสดงค่าดูดกลืนแสงน้อยที่สุด ดังแสดงในรูปภาพที่ 7 ข, ค, ง แนวโน้มเส้นกราฟของค่าดูดกลืนแสงของความสามารถในการรีดักชันมีความสัมพันธ์กับปริมาณ

ผลรวมสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งอธิบายได้จากสารสกัดใบหนาดจากอำเภอ ดอยหลวงที่มีปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลิกและมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่สูง สรุปได้ว่าชนิด ของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและแหล่งของพืช มีผลต่อความสามารถในการรีดักชันและมีความสัมพันธ์ กับปริมาณผลรวมสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 7 กราฟเส้นแสดงความสามารถในการรีดักชันของสารสกัดใบหนาด; สารสกัดด้วยเฮกเซน (ก), สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (ข), สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (ค), สารสกัดด้วยเอทานอล (ง) และสารสกัดด้วยน้ำกลั่น (จ)

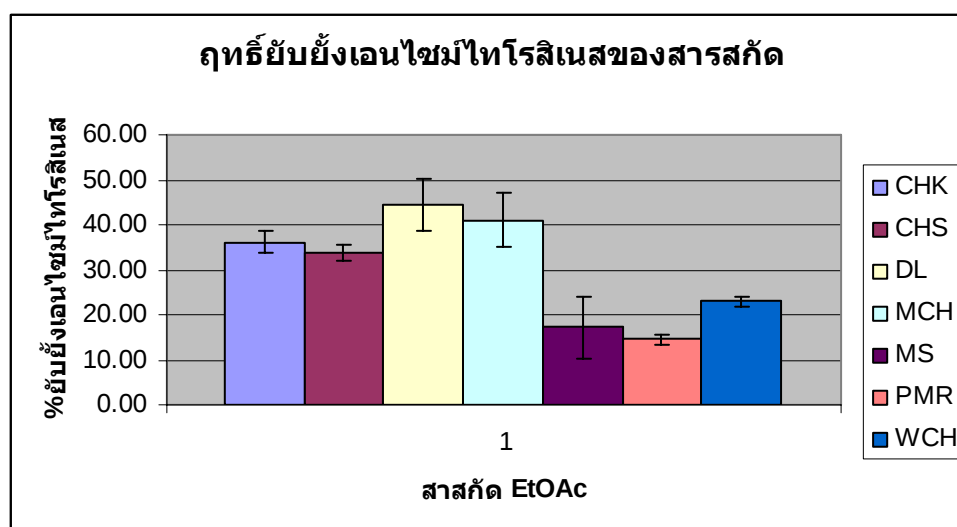
#### 4.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เมื่อนำสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome ทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้ L-dopa เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนสผลิต Dopachrome ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร หากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสก็จะมีค่าดูดกลืนแสงที่ต่ำ เพราะเกิด Dopachrome น้อย โคจิกแอซิดมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและที่ความเข้มข้น 1.4 ไมโครโมลาร์ แสดงร้อยละยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็น 76.51 สารสกัดจากอำเภอดอยหลวงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่าสารสกัดที่ได้จากอำเภ่อื่น แต่จากการเปรียบเทียบบรรยากาศฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของแหล่งของพืชจากอำเภอดอยหลวง

ตารางที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหนาด

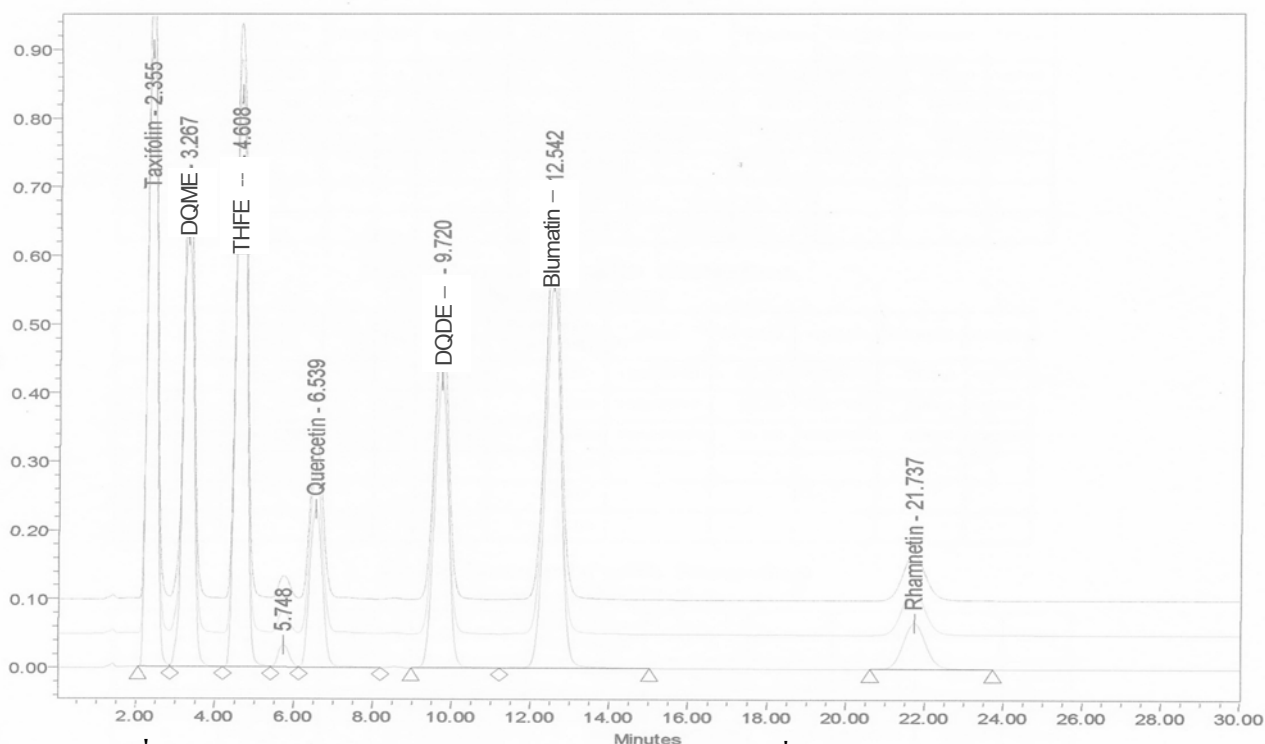
| แหล่ง | % ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด EtOAc |
|-------|-------------------------------------------|
| CHK   | 36.14 ± 2.41                              |
| CHS   | 33.73 ± 1.81                              |
| DL    | 44.28 ± 5.72                              |
| MCH   | 40.96 ± 6.02                              |
| MS    | 17.17 ± 6.93                              |
| PMR   | 14.46 ± 1.20                              |
| WCH   | 22.89 ± 1.20                              |

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหนาด

#### 4.8 การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี HPLC



ภาพที่ 9 HPLC chromatogram ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ใช้เทียบกับสารสกัดใบหนาด

ตารางที่ 10 ข้อมูลกราฟของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ( $n=3$ )

| Compounds | Retention time (min) | Regression equation    | $r$    | Linear range ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----------|----------------------|------------------------|--------|-----------------------------------|
| Taxifolin | 2.360                | $Y=243328.6x+76058.78$ | 0.9989 | 11.07-199.23                      |
| DQME      | 3.264                | $Y=188236.7x+59778.86$ | 0.9998 | 11.06-199.20                      |
| THFE      | 4.612                | $Y=248833.3x+81410.94$ | 0.9998 | 11.10-199.24                      |
| Quercetin | 6.556                | $Y=19870.22x+26552.24$ | 0.9999 | 11.79-199.62                      |
| DQDE      | 9.721                | $Y=159165.4x+51500.51$ | 0.9999 | 11.16-199.26                      |
| Blumeatin | 12.537               | $Y=195328.9x+77413.42$ | 0.9999 | 11.44-199.56                      |
| Rhamnetin | 21.754               | $Y=27645.97-1838.44x$  | 0.9999 | 6.13-100.03                       |

จากสมการ  $y = ax + b$ ,  $x$  อ้างถึงความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร),  $y$  แทนพื้นที่ใต้กราฟ, และ  $r$  แสดง correlation coefficient ของสมการเส้นตรง

ตารางที่ 11 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบหนาด

| ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบหนาด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) |             |             |             |                  |                                                         |        |
|------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|---------------------------------------------------------|--------|
| สารสกัด                                                          | DQME<br>(6) | DQDE<br>(7) | THFE<br>(8) | Blumeatin<br>(9) | ปริมาณรวมสารประกอบฟลาโวนอยด์<br>(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) |        |
| Hexane                                                           | CHK         | nd          | 4.7±0.8     | nd               | nd                                                      | 4.70   |
|                                                                  | CHS         | nd          | 7.8±0.1     | nd               | nd                                                      | 7.80   |
|                                                                  | DL          | nd          | 6.1±0.1     | nd               | nd                                                      | 6.10   |
|                                                                  | MCH         | nd          | 8.1±0.4     | nd               | nd                                                      | 8.10   |
|                                                                  | MS          | nd          | nd          | nd               | nd                                                      | 0.00   |
|                                                                  | PMR         | nd          | 7.7±0.5     | nd               | nd                                                      | 7.70   |
|                                                                  | WCH         | nd          | 10.2±0.3    | nd               | nd                                                      | 10.20  |
| DCM                                                              | CHK         | 29.3±0.0    | 26.3±0.8    | nd               | 7.7±0.1                                                 | 63.30  |
|                                                                  | CHS         | 16.8±0.1    | 26.3±0.6    | nd               | 9.9±0.1                                                 | 53.00  |
|                                                                  | DL          | 23.4±0.1    | 36.2±0.1    | nd               | 12.4±0.1                                                | 72.00  |
|                                                                  | MCH         | 41.6±1.4    | 49.6±1.0    | nd               | 9.6±0.4                                                 | 100.80 |
|                                                                  | MS          | 10.1±0.1    | 20.4±0.7    | nd               | 12.6±0.1                                                | 43.10  |
|                                                                  | PMR         | 25.1±0.1    | 45.5±0.6    | nd               | 17.9±0.0                                                | 88.50  |
|                                                                  | WCH         | 50.7±0.2    | 38.1±0.1    | nd               | 16.1±0.0                                                | 104.90 |
| EtOAc                                                            | CHK         | 28.1±0.0    | 12.4±0.0    | 5.3±0.0          | 5.9±0.1                                                 | 51.70  |
|                                                                  | CHS         | 32.2±0.0    | 14.5±0.1    | 6.4±0.1          | 12.1±0.1                                                | 65.20  |
|                                                                  | DL          | 22.6±0.0    | 6.2±0.0     | 2.9±0.0          | 3.9±0.0                                                 | 35.60  |
|                                                                  | MCH         | 28.9±0.1    | 13.8±0.0    | 3.7±0.0          | 9.1±0.0                                                 | 55.50  |
|                                                                  | MS          | 17.2±0.0    | 7.7±0.0     | 2.5±0.0          | 9.8±0.0                                                 | 37.20  |
|                                                                  | PMR         | 35.6±0.0    | 13.2±0.0    | 13.8±0.0         | 11.7±0.0                                                | 74.30  |
|                                                                  | WCH         | 48.8±0.1    | 11.6±0.1    | 15.2±0.0         | 11.1±0.0                                                | 86.70  |
| EtOH                                                             | CHK         | 5.7±0.0     | 3.0±0.1     | nd               | 0.6±0.0                                                 | 9.30   |
|                                                                  | CHS         | nd          | nd          | nd               | 0.5±0.0                                                 | 0.50   |
|                                                                  | DL          | 6.7±0.0     | 4.4±0.1     | 0.2±0.0          | 2.9±0.0                                                 | 14.20  |
|                                                                  | MCH         | 5.1±0.0     | 3.6±0.0     | nd               | 1.0±0.0                                                 | 9.70   |
|                                                                  | MS          | 1.6±0.0     | 0.3±0.0     | nd               | 1.4±0.0                                                 | 3.30   |
|                                                                  | PMR         | 11.4±0.0    | 10.3±0.0    | 3.7±0.0          | 8.8±0.0                                                 | 34.20  |
|                                                                  | WCH         | 23.1±0.0    | 6±0.1       | 6.7±0.7          | 4±0.0                                                   | 39.80  |

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการฉีดทดสอบ 3 ซ้ำ

HPLC chromatogram ของสารสกัดใบหนาดที่ 285 นาโนเมตรนั้นแสดงสารประกอบฟลาโวนอยด์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ DQME (6), DQDE (7), THFE (8) และ blumeatin (9) ซึ่งสารประกอบชนิดอื่นที่ไม่พบในสารสกัดใบหนาด ได้แก่ quercetin และ rhamnetin สารประกอบเหล่านี้อาจสกัดได้ในปริมาณที่น้อยและไม่สามารถตรวจบอกปริมาณได้ สารสกัดใบหนาดด้วยเฮกเซนตรวจพบ DQDE เพียงชนิดเดียวเท่านั้นและมีปริมาณสารน้อยมาก เพราะคุณสมบัติที่มีขั้วต่ำของเฮกเซนที่สามารถสกัดสารที่มีความเป็นขั้วต่ำและในปริมาณที่น้อยกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตท และเอทานอลแสดงสารประกอบฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ในทางตรงกันข้ามสารสกัดด้วยน้ำกลั่นไม่พบสารประกอบที่ 285 นาโนเมตร ซึ่งสารประกอบที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่นนั้นมีความเป็นขั้วสูงและไม่สามารถตรวจปริมาณได้ด้วยระบบการวิเคราะห์แบบนี้

การที่สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและเอทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูง อาจเป็นเพราะอิทธิพลจากการที่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์สูง โดยเฉพาะ THFE ที่พบเฉพาะในสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและเอทานอล สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเทียบเป็น DQME (0.517), THFE (0.585) และ blumeatin (0.421) ที่ระดับ 0.01 โดยทฤษฎี Pearson correlation แต่ DQDE มีความสัมพันธ์เพียง 0.055 ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างไม่เป็นนัยสำคัญ สำหรับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่พบความสัมพันธ์กับสารประกอบฟลาโวนอยด์เหล่านี้ตามทฤษฎี Pearson correlation

## เอกสารอ้างอิง

- วงศ์สถิต นัวกุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์ และพรทิพย์ สุภัทรวณิช. การศึกษาลักษณะทางเภสัชเวทของ ใบหนาด, เภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล 24(1-4) : 1-6, 2540
- Ali, D.M.H., K.C. Wong and P.K. Lim. "Flavonoids from *Blumea balsamifera*," Fitoterapia 76(1) : 128-130, 2005
- Barua, Nabin C. and Ram P. Sharma. "(2R,3R)-7,5'-dimethoxy-3,5,2'-trihydroxyflavanone from *Blumea balsamifera*," Phytochemistry 31(11) : 4040, 1992
- Chiayvareesajja, Sommai and others. "Thai Piscicidal Plants I," Journal of the Science Society of Thailand 13(1) : 29-45, 1987
- Fujimoto, Yasuo, Agustine Soemartono and Made Sumatra. "Sesquiterpenelactones from *Blumea balsamifera*," Phytochemistry 27(4) : 1109-1111, 1988
- Leclerc, H. "Sombong *Blumea balsamifera* DC.," Chemical Abstracts 35 : 2981, 1940
- Nessa, Fazilatun and others. "Free Radical – scavenging Activity of Organic Extracts and of Pure Flavonoids of *Blumea balsamifera* DC Leaves," Food Chemistry 88 : 243-252, 2004
- Rice-Evans, C.A.; Miller, n. J. and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20(7), 933-956, 1996
- Ruangrunsi, N., Tappayuthpijaran, P., & Tantivatana, P. Traditional medicinal plants of Thailand I. Isolation and structure elucidation of two new flavonoids, (2R,3R)-dihydroquercetin-4'-methyl ether and (2R,3R)-dihydroquercetin-4',7-dimethyl ether from *Blumea balsamifera*. Journal of Natural products 44, 541–545, 1981
- Ruangrunsi, N., Tantivatana, P., Tappayuthpijaran, P., Boris, R. P., & Cordell, G. A. Traditional Medicinal plants of Thailand. VI. Isolation of Cryptomeridiol from *Blumea balsamifera*. Journal of the Science Society of Thailand 11(2): 47-50, 1985
- Tan, Ghee T. and others. "Evaluation of Natural Products as Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reverse Transcriptase," Journal of Natural Products 54(1) : 143-154, 1991
- Tappayuthpijarn, P. Phytochemical Study of *Blumea balsamifera* DC Leaves. Master's Thesis. Bangkok : Chulalongkorn University, 1981

Vander, Woerd L.A. "The Native Medicine of East Indian Archipelago VII. The Diuretic Action of Some of the Most Common Herbs Used in Netherland East Indies in Native Medicines Against Diseases of the Urinary System," Ibid 36 : 161, 1942

## Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

### 1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Saewan, N., Koysoomboon, S, Chantrapromma, K. Tyrosinase inhibitors from *Blumea Balsamifera* DC. Food Chemistry (submitted)

### 2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
  1. ทุนวิจัยนี้ได้มีส่วนช่วยในการทำวิจัยในส่วนของปริญญานิพนธ์ของนักศึกษา ระดับปริญญาตรี จำนวน 3 คน
- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
  1. การพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์สเปาจากสารสกัดใบหนาด ได้รับทุน IRPUS 52 และนำไปประยุกต์ใช้ในภาคธุรกิจโดยบริษัทสยาม เนเชอรัล โปรดักส์ จำกัด 44/33 ม. 5 ต.ขวัญเมือง อ.บางปะหัน จ.อยุธยา 13220

### 3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Saewan, N., Chantrapromma, K. Evaluation of Anti-oxidant and Anti-tyrosinase Activities of *Blumea balsamifera* DC leaves, The 3<sup>rd</sup> Annual PSU Phuket Research Conference 2010. (accepted)