



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออก
ฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นหนาดใหญ่และหนาดวัว

โดย

ดร. อุทัย สาขี

พฤษภาคม 2550

สัญญาเลขที่ TRG4680018

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออก
ฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นหนาดใหญ่และหนาดวัว

ดร.อุทัย สาขี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สัญญาเลขที่ TRG4680018

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออก
ฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นหนาดใหญ่และหนาดวัว

ดร.อุทัย สาลี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Project Code : TRG4680018

(รหัสโครงการ)

Project Title :

(ชื่อโครงการ)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นหาดใหญ่
และหนาดวัว

Investigator : ชื่อ

(ชื่อนักวิจัย)

ดร.อุทัย สาขี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

E-mail Address : cyproterone@yhoo.com

Project Period : 2 ปี

(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

หนาดใหญ่เป็นสมุนไพรซึ่งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศจีนได้ใช้ในตำรับยา ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลการต้านเชื้อแบคทีเรียและการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดต่างๆจากใบหนาดใหญ่ พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียปานกลางในขณะที่ สารสกัดออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียน้อย นอกจากนี้สารตัวอย่างต่างๆเหล่านี้ได้นำมาทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทดสอบกับอนุมูลอิสระของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)พบว่าสารสกัดให้ผลการจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหย ทั้งน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากใบหนาดใหญ่ได้นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรสโกปี

Abstract

Blumea balsamifera (Linn.) DC. is a large strong-smelling herb which has been used in the traditional medicine in South-East Asia and China. This studies were designed to examine the antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and solvent extracts of *Blumea balsamifera* DC. The essential oil was particularly found to possess moderate antibacterial activity while other non-polar extract showed weakly activity. The samples also subjected to screening for their possible antioxidant activity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. Polar extracts exhibited stronger activities than non-polar extracts and essential oil. The chemical composition of the essential oils and non-polar extracts were analyzed gaschromatography-massspectroscopy (GC-MS).

Keywords : *Blumea*, Extraction, Essential oil

Project Code : TRG4680018

(รหัสโครงการ)

Project Title :

(ชื่อโครงการ)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นหาดใหญ่
และหนาดวัว

Investigator : ชื่อ

(ชื่อนักวิจัย)

ดร.อุทัย สาขี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

E-mail Address : cyproterone@yhoo.com

Project Period : 2 ปี

(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ

หนาดใหญ่เป็นสมุนไพรซึ่งในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศจีนได้ใช้ในตำรายา ใน การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลการต้านเชื้อแบคทีเรียและการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดต่างๆจากใบหนาดใหญ่ พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียปานกลางในขณะที่ สารสกัดออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียอ่อน นอกจากนั้นสารตัวอย่างต่างๆเหล่านี้ได้นำมาทดสอบการออก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทดสอบกับอนุมูลอิสระของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)พบว่าสารสกัด ให้ผลการจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหย ทั้งน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากใบหนาดใหญ่ได้ นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรสโกปี

Abstract

Blumea balsamifera (Linn.) DC. is a large strong-smelling herb which has been used in the traditional medicine in South-East Asia and China. This studies were designed to examine the antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and solvent extracts of *Blumea balsamifera* DC. The essential oil was particularly found to possess moderate antibacterial activity while other non-polar extract showed weakly activity. The samples also subjected to screening for their possible antioxidant activity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical. Polar extracts exhibited stronger activities than non-polar extracts and essential oil. The chemical composition of the essential oils and non-polar extracts were analyzed gaschromatography-massspectroscopy (GC-MS).

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญเรื่อง	iii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญภาพ	v
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	vi
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
วิธีการดำเนินการวิจัย	4
พืชตัวอย่าง	4
การสกัด	4
การแยกสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย	5
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	5
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	5
การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ	5
การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	6
การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ	9
ผลการวิจัย	11
ผลการสกัด	11
ผลการแยกสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย	
ผลการสกัดและการแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบขนาดใหญ่	
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	11
ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ	23
ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์	28
ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ	54
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	57
บรรณานุกรม	62

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงผลการสกัดใบขนาดใหญ่ด้วยการกลั่นไอน้ำ	11
ตารางที่ 2 แสดงผลการสกัดใบขนาดใหญ่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	12
ตารางที่ 3 แสดงผลการสกัดรากขนาดใหญ่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์	12
ตารางที่ 4 แสดงผลการสกัดใบขนาดใหญ่ด้วยการกลั่นไอน้ำ	13
ตารางที่ 5 แสดงผลการสกัดใบผักกาดนา และ ใบสาบแร้งสาบกา ด้วยการกลั่นไอน้ำ	13
ตารางที่ 6 ปริมาณของส่วนสกัดที่ได้จากการแยกสารสกัดไดคลอโรมีเทน	14
ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์ผลการกลั่นน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ Clevenger type apparatus	21
ตารางที่ 8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยและสารสกัดของขนาดใหญ่	36
ตารางที่ 9 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบผักกาดนาและสาบแร้งสาบกา	39
ตารางที่ 10 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของ DS4 และส่วยย่อย (DS4-1 ถึง DS4-5)	46
ตารางที่ 11 แสดงค่า LC ₅₀ ของสารสกัดไดคลอโรมีเทน เอทานอล และเมทานอล โดยทดสอบกับกุ้งน้ำเค็ม (<i>Brine shrimp; Artemia salina</i> Leach)	48
ตารางที่ 12 แสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดไดคลอโรมีเทน เอทานอล และเมทานอลจากใบขนาดใหญ่ที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	48
ตารางที่ 13 ผลของการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นและรากของขนาดใหญ่	49
ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากใบขนาดใหญ่	50
ตารางที่ 15 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ด้วยวิธี Agar disc diffusion ที่ 24 ชั่วโมง	51
ตารางที่ 16 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ด้วยวิธี Agar disc diffusion ที่ 48 ชั่วโมง	52
ตารางที่ 17 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้	53
ตารางที่ 18 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้	53
ตารางที่ 19 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ <i>Candida albicans</i>	54
ตารางที่ 20 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง NCI-H187 (Human, small cell lung cancer)	54
ตารางที่ 21 ผลการทดสอบ anti-COX-2 activity at 10 ⁻⁷ – 10 ⁻⁵ g/ml	54
ตารางที่ 22 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ปาก (Anti-Herpes simplex virus type I) และผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero (Cytotoxicity against vero cell)	55
ตารางที่ 23 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer)	55

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ ED18	23
รูปที่ 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ H2	24
รูปที่ 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ IGH5	25
รูปที่ 4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ IGH6	26
รูปที่ 5 FT-IR spectrum ของ IGH6	26
รูปที่ 6 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ สารประกอบอะซีเตท RA	27
รูปที่ 7 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบอะซีเตท RB	28
รูปที่ 8 FT-IR spectrum ของสารประกอบอะซีเตท RB	29
รูปที่ 9 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยของใบสดของหนาดใหญ่ (DS-F)	30
รูปที่ 10 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยของใบแห้งของหนาดใหญ่ (DS-D)	31
รูปที่ 11 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบแห้งสกัดร้อนด้วยเพนเทนของหนาดใหญ่ (DH-P)	32
รูปที่ 12 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบสดสกัดร้อนด้วยเฮกเซนของหนาดใหญ่ (FH-H)	32
รูปที่ 13 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบแห้งสกัดร้อนด้วยเฮกเซนของหนาดใหญ่ (DH-H)	33
รูปที่ 14 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบสดสกัดร้อนด้วยเพนเทนของหนาดใหญ่ (FH-P)	33
รูปที่ 15 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบสดสกัดเย็นด้วยเฮกเซนของหนาดใหญ่ (FH-H)	34
รูปที่ 16 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบสดสกัดเย็นด้วยเพนเทนของหนาดใหญ่ (FC-P)	34
รูปที่ 17 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบแห้งสกัดเย็นด้วยเพนเทนของหนาดใหญ่ (DC-P)	35
รูปที่ 18 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบแห้งสกัดเย็นด้วยเฮกเซนของหนาดใหญ่ (DC-H)	35
รูปที่ 19 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนย่อยที่ 4 (DS4)	
รูปที่ 20 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 1 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-1)	43
รูปที่ 21 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 2 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-2)	44
รูปที่ 22 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 3 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-3)	44
รูปที่ 23 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 4 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-4)	45
รูปที่ 24 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 5 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-5)	45

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

TLC	thin layer chromatography
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
GC-MS	Gas Chromatography-Mass spectrophotometer
DMSO	dimethylsulfoxide
MIC	Minnimum Inhibitory Concentration
MBC	Minimum Bactericidal Concentration

บทนำ

การวิจัยหาสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ยังคงมีความจำเป็นและสำคัญต่อการพัฒนาประเทศ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในท้องถิ่น ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบจากธรรมชาติแล้วยังจะเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร ในการผลิตวัตถุดิบเหล่านี้ ในการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้เป็นยารักษาโรคนั้นจำเป็นที่จะต้องทราบชนิดและโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นเพื่อที่จะได้กำหนดปริมาณการใช้และคุณภาพของวัตถุดิบได้อย่างถูกต้อง ถ้าหากเราสามารถแยกและพิสูจน์โครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้เราก็สามารถนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาผลิตหรือแปรรูปเป็นสินค้าได้ในแยกสารที่ออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้มีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นที่จะต้องมีการสกัดและแยกสารไปพร้อมๆ กันกับการติดตามการออกฤทธิ์และความเป็นพิษจากส่วนสกัดต่างๆ และส่วนย่อย(Fraction) ต่างๆ

ในการเลือกทำการวิจัยพืชชนิดนี้เพราะเป็นพืชที่มีอยู่ในท้องถิ่นและยังพบว่ามีการนำมาใช้ในตำหรับยาไทยแผนโบราณ และยาจีน และในการทดสอบการออกฤทธิ์เบื้องต้นหลายชนิดเช่นฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ยับยั้ง HIV-1 Reverse Transcriptase ของสารสกัดพบการออกฤทธิ์ต่างๆ เหล่านี้ ในการพบสารออกฤทธิ์จากพืชชนิดนี้ ได้มีการจดสิทธิบัตรในประเทศญี่ปุ่นเพียงสามสารคือ Blumealactones A, B และ C ซึ่งเป็นสารต้านเนื้องอก

ในการวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นศักยภาพในการพัฒนาพืชชนิดนี้ให้เป็นพืชเศรษฐกิจ ในการนำมาใช้ทั้งในทางการแพทย์ การใช้สมุนไพรเพื่อสุขภาพ ตลอดจนการใช้สมุนไพรสำหรับการเลี้ยงสัตว์ในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะต่อไป

ในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้มุ่งที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบที่ระเหยได้ (volatile component) จากใบของหนาดหัวและใบหนาดวัว ที่ขึ้นอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และในส่วนที่ไม่สามารถระเหยเองได้ (nonvolatile component) นั้นจะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดและส่วนย่อยที่ได้ทดสอบการออกฤทธิ์เบื้องต้นแล้วว่ามีสารออกฤทธิ์เพื่อที่จะหาสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต่อไป

จากเดิมพืชที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีสองชนิดคือหนาดวัว *Blumea lacera* DC แต่ผู้วิจัยได้พยายามหาแหล่งของหนาดวัวและได้เก็บพืชที่คิดว่าเป็นหนาดวัวส่งไปพิสูจน์จากผู้เชี่ยวชาญพบว่าพืชตัวอย่างนั้นไม่ใช่หนาดวัวแต่เป็นผักกาดนา *Blumea napifolia* DC. และ สาบแร้งสาบกา *Lagdera aurita* Sch-Bip.ex.Schw.(syn. *Blumea aurita*) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนพืชที่จะนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหนาดวัว มาเป็นพืชสองชนิดนี้แทนและเน้นในการศึกษาองค์ประกอบทาง

เคมีของน้ำมันหอมระเหยเพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี เนื่องจากขนาดวุ้นเป็นพืชล้มลุกที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คล้ายคลึงกับพืชสองชนิดนี้เป็นอย่างมากและในการพิสูจน์นั้นจะต้องรอระยะการออกดอกเท่านั้นถึงจะสามารถแยกชนิดได้ การดูลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยก็จะเป็นประโยชน์ในการจำแนกชนิดของพืชเหล่านี้ได้

การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยและการนำเอาน้ำมันหอมระเหยไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อาทิเช่น การนำไปเป็นสารเติมแต่ง(additive) ในผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องสำอาง ทั้งเป็นป้องกันการเกิดออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ หรือเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ในปัจจุบันนี้นับวันจะเป็นที่นิยมมากขึ้นไปเรื่อยๆ ทั้งนี้เพราะการหวาดกลัวการเกิดผลข้างเคียงในการใช้สารเติมแต่งจากสารสังเคราะห์ หรือแม้กระทั่งการเกิดการเคี้ยวของผู้ป่วยที่ใช้ยาปฏิชีวนะจากการสังเคราะห์

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังเล็งเห็นประโยชน์ในอนาคตที่จะมีการพัฒนานำเอาองค์ประกอบที่ระเหยได้จากต้นหนาดใหญ่มาใช้กับผู้ป่วยเอดส์เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะและป้องกันการติดเชื้อและเสริมภูมิคุ้มกันอีกด้วย

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิงเกี่ยวกับ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *Blumea balsamifera* (Linn.) DC. มีดังนี้คือ ในปี 1940 Bose และ Dutt ได้รายงาน Ngaicamphor oil ซึ่งประกอบไปด้วย 1-borneol, 1-camphor, cineol, limonene, sesquiterpene alcohol และ phenol-phloracetophenone-diethyl ether ในปี 1976 Fujimoto Y. และคณะได้รายงานการแยกสาร Sesquiterpenelactones จาก *Blumea balsamifera* ในปี 1981 พิมลวรรณ ทัญทรพิจารณ์ ได้รายงานการแยกสาร dihydroflavonols สองชนิด และ Calpurmenin และอนุพันธ์ 13 α -(2'-pyrrolecarboxylic acid) ester ในปีเดียวกันนี้ Ruangrungrasi N และคณะได้รายงานการแยกและการพิสูจน์โครงสร้างของ Flavonoids สองตัวคือ (2R,3R)-dihydroquercetin-4'-methyl ether และ (2R,3R)-dihydroquercetin-4', 7-dimethyl ether ในปี 1983 พิมลวรรณ ทัญทรพิจารณ์ และคณะ ได้รายงานการแยก Flavonoids สองสารจากใบหนาดใหญ่ Lin YC และคณะได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *Blumea balsamifera* ในคำหรับยาจีน (1988) ในปี 1992 Barua NC และคณะ ได้รายงานการแยก (2R,3R)-7,5'-dimethoxy-3,5,2'-trihydroxyflavanone จาก *Blumea balsamifera* ในปี 1996 Deng QY ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ flavonoid ใน *Blumea balsamifera* และเมื่อเร็วๆ นี้ (Fazilatun Nessa, 2004) ซึ่งเป็นนักวิจัยจากประเทศมาเลเซียได้ทำการแยกสาร Flavonoid 11 สาร จากใบของหนาดใหญ่และได้รายงานการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ของสารเหล่านี้ นอกจากนี้ ยังได้มีการรายงานจาก D.M.H. Ali (2005) ได้สารใหม่ที่ไม่เคยแยกได้จากธรรมชาติมาก่อนเป็นสารพวก biflavonoid

การศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพปี 1941 Vander Word LA ได้รายงานฤทธิ์ในการยับยั้งสภาวะ ของสารสกัด ในปี 1986 Lim-Sylianco และคณะ ได้รายงาน การยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์และการเหนี่ยวนำให้ดื้อยา erythromycin ในปี 1987 Fujimoto Y และคณะได้จดสิทธิบัตรที่ประเทศญี่ปุ่นในการใช้ Blumealactones A, B และ C ที่แยกได้จาก *Blumea balsamifera* เป็นสารต้านเนื้องอก และในปีเดียวกันนี้ Chaiyavareesajja S และคณะได้รายงานการออกฤทธิ์การฆ่าปลา ในปี 1988 Yamazaki M และคณะ ได้รายงานการลดพฤติกรรมของสัตว์ทดลองจากผลของสารสกัด ในปี 1991 Tan GT และคณะ ได้รายงานการยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ของสารสกัด

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นหนาดใหญ่ และหนาดวัว
2. เพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นหนาดใหญ่ และหนาดวัว
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของต้นหนาดใหญ่ และหนาดวัว

วิธีการดำเนินการวิจัย

พืชตัวอย่าง

1. สืบค้นหาแหล่งพืช และเก็บตัวอย่างในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
2. ส่งตัวอย่างพืชเพื่อการพิสูจน์ชนิด ที่สถาบันวิจัยวลัยรุกเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคามเลือกเก็บขนาดใหญ่จาก เขตอำเภอเมืองสรวง จังหวัดร้อยเอ็ด
3. เลือกแหล่งเก็บขนาดใหญ่จาก เขตอำเภอเมืองสรวง จังหวัดร้อยเอ็ด
4. แยกส่วน ใบ ลำต้น และราก ของขนาดใหญ่ออกจากกัน
5. นำราก ลำต้น และใบบางส่วนผึ่งลม เป็นเวลา 3 วัน ใบสดบางส่วนเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C
6. นำใบสดและใบแห้งบดให้ละเอียดก่อนนำไปทำการสกัด

การสกัด

1. การสกัดเย็น

นำพืชตัวอย่างที่ต้องการสกัดซึ่งน้ำหนักลงในถุงผ้า แล้วมัดปากถุง ใส่ลงในถังสกัดแล้วเติมตัวทำละลายลงไปปิดฝาถังสกัด รอจนครบ 7 วัน แล้วนำสารละลายจากการสกัดมาระเหยเอาตัวทำละลายด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดที่มีลักษณะข้นเหนียวออกมาซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง

2. การสกัดร้อน

ซึ่งพืชตัวอย่างลงในขวดกันกลม เติมตัวทำละลาย แล้วทำการรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง กรองเอาสารสกัดและระเหยเอาตัวทำละลายออกโดย rotary evaporator จะได้สารสกัดออกมาซึ่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้

3. การกลั่น

การสกัดน้ำมันหอมระเหยทำได้โดยใช้ เครื่องกลั่นไอน้ำ Clevenger-type Collector

การแยกสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย

ได้ทำการแยกสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีดังต่อไปนี้คือ

1. ใช้ sephadex LH-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี
2. ใช้ แฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตามวิธีของ Still
3. ใช้ ซิลิกา เจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยทำได้โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography – Mass Spectrophotometer (GC - MS) รุ่น QP 5050 ของบริษัท SHIMADZU โดยคอลัมน์ที่ใช้ ในการวิเคราะห์ คือ HP-5 capillary column อุณหภูมิ คอลัมน์ที่ใช้ จะเริ่มจาก 50 องศาเซลเซียส ถึง 250 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้น 5 องศาเซลเซียส ต่อ นาที แก๊สพา (carrier gas) ที่ใช้ คือแก๊ส ฮีเลียม (He) โดยให้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ข้อมูลที่ได้วิเคราะห์แมสสเปกตรัมโดยใช้ฐานข้อมูล NIST98 ร่วมกับการหาค่า Retention Index โดยการเทียบกับสารมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 9 ถึง 30 คาร์บอน

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ทำได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี เช่น NMR , FT-IR เป็นต้น

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี TLC Screening

นำสารสกัดที่ได้มาจุดลงบนแผ่น TLC ด้วย capillary แล้วนำไปหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยก เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว develop แผ่น TLC ด้วยระบบตัวทำละลายนั้นๆ จากนั้นทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งของจุดที่ปรากฏบนแผ่น TLC ด้วยดินสอแล้วนำแผ่น TLC ที่ได้ไปพ่นด้วย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่

ละลายในเมทานอล สารละลาย DPPH ในเมทานอลจะมีสีม่วงเข้มในการพ่นพยายามพ่นลงแผ่น TLC ดูการฟอกจางสี DPPH บนแผ่น TLC

การทดสอบโดยวิธี Spectrophotometric assay

เตรียมสารละลายของสารที่สกัดได้และให้ผลบวกในการทดสอบด้วย TLC screening ว่ามีผลในการต้านสารอนุมูลอิสระให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 10-1000 ppm ประมาณ 5-6 ความเข้มข้นที่แตกต่างกันและเตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอล เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ในเมทานอล เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 2 มิลลิลิตร ลงในสารละลายของสารสกัด 1 มิลลิลิตร (ในแต่ละความเข้มข้น) เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 516-518 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ข้อมูลที่ได้นำไปคำนวณหา % radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{radical scavenging} = \frac{[1 - A_{\text{sample}}]}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{sample} = ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารละลายผสมระหว่าง DPPH + สารที่สกัดได้

A_{control} = ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารละลาย DPPH ที่ยังไม่มีการผสมกับสารสกัด

การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial)

แบคทีเรียและยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Escherichia coli* จากเลือดของผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาสารคาม (E.c)
2. *Enterobacter cloacae* จากเลือดของผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาสารคาม (En.c)
3. *Klebsiella pneumoniae* จากเสมหะของผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาสารคาม (K.n)
4. *Pseudomonas aeruginosa* จากเสมหะของผู้ป่วยโรงพยาบาล มหาสารคาม (Ps.a)
5. *Staphylococcus aureus* จากเลือดของผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาสารคาม (S.a)
6. *Bacillus cereus* จากผู้ป่วยโรงพยาบาล มหาสารคาม (B.c)

7. *Salmonella typhi* จากผู้ป่วยโรงพยาบาลมหาสารคาม (S.t)
8. *Candida albicans* ATCC 10231 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (C.a (s))
9. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (S.a (s))
10. *Bacillus cereus* ATCC 11778 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (B.c (s))
11. *Escherichia coli* ATCC 25922 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (E. c (s))
12. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Ps. a (s))
13. *Enterobacter cloacae* DMST 17206 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (En.c (s))
14. *Salmonella typhi* DMST 5784 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (S.t (s))

การเตรียมสารสกัด

1. นำสารสกัด ละลายด้วย (dimethylsulfoxide, DMSO) : Tween 80 ในอัตราส่วน 3 : 1
2. ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 19.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียม Paper disc ที่มีสารสกัด

1. นำ Paper disc ที่ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. คูดสารสกัด 30 ไมโครลิตรหยดลงแผ่น Paper disc ที่เตรียมไว้ในข้อ 1
3. อบแผ่น Paper disc ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

1. เก็บเชื้อ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในอาหาร Nutrient Agar และ *Candida albicans* ในอาหาร Potato Dextrose Agar

2. ถ่ายเชื้อลงในอาหาร Trypticase Soy Broth นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย และถ่ายเชื้อลงใน Sabouraud Dextrose Broth บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแต่ละชนิดด้วย 0.85 % Normol saline Solution โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อแต่ละชนิด โดยวัดค่าดูดกลืนแสงของเชื้อเทียบกับความขุ่น Mcfarland standard No 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จะได้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

3. จุดเชื้อทดสอบที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Trypticase Soy Agar ที่แข็งตัวแล้วสำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Dextrose Agar ที่แข็งตัวแล้วสำหรับยีสต์ จากนั้นใช้แท่งเขี่ยเชื้อ เขี่ยให้ทั่วผิวหน้า (spread plate) ของอาหาร

4. นำ disc ที่เตรียมไว้วางบนผิวหน้าของจานเพาะเชื้อ 5 disc ต่อจานเพาะเชื้อ 1 จานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับยีสต์

4. วัดความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone ที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิเมตร

5.

การหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) โดยวิธี Tube dilution method

1. ทำการเจือจางสารสกัดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้วิธี doubling dilution series เริ่มต้นด้วยการผสมสารสกัดปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงใน Trypticase Soy Broth สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Dextrose Broth สำหรับยีสต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสารสกัดเป็น (1:2) ของสารสกัดเดิม เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. จุดสารที่ผสมกันแล้วในข้อ 1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน Trypticase Soy broth สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Dextrose Broth สำหรับยีสต์ จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น (1:4) ของสารสกัดเดิม เขย่าให้เข้ากัน ทำการเจือจางตามลำดับให้ได้ความเจือจางเท่ากับ 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128

3. จุดเชื้อที่เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองในแต่ละหลอด

4. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับยีสต์

5. นำหลอดที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ เก็บผลการทดลองโดยสังเกตความขุ่นของหลอดทดลอง โดยหลอดที่ไม่มี ความขุ่นของเชื้อแปลผลเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของการยับยั้ง

การหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

1. คัดสารละลายจากหลอดทดลองที่อ่านผลค่า MIC ที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิตร เติมน้ำอาหาร Trypticase Soy Broth สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Dextrose Broth สำหรับยีสต์ ที่มีปริมาตร 4 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับยีสต์

2. ใช้ loop และเชื้อในอาหาร Trypticase Soy Broth สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Dextrose Broth สำหรับยีสต์ ในข้อ 1 มาทำการเชยเชื้อ (Streak) ลงในอาหาร Trypticase Soy Agar ที่แข็งตัวแล้ว สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Dextrose Agar ที่แข็งตัวแล้ว สำหรับยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับยีสต์

3. นำจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ เก็บผลการทดลองโดยสังเกตการเจริญของเชือบนจานเพาะเชื้อ ถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อจะแปลผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)

การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

ได้ทำการส่งสารสกัดและสารบริสุทธิ์ไปทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ดังนี้

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง NCI-H187 (Human, small cell lung cancer)
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ (Antifungal) เป็นการทดสอบกับยีสต์ *Candida albicans*

3. COX-2 inhibition test
4. การทดสอบฤทธิ์ด้านไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ปาก (Anti-Herpes simplex virus type I)
5. การทดสอบฤทธิ์ด้านมะเร็ง (Anticancer) 2 ชนิด คือ KB(Human mouth carcinoma) และ BC (Breast cancer)

ผลการวิจัย

ผลการสกัด

ในการสกัดได้ทำการแยกส่วนของพืชในการสกัดดังนี้

1. ส่วนของใบ

การสกัดใบขนาดใหญ่โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ให้ผลการสกัดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการสกัดใบขนาดใหญ่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

วิธีการสกัด	พืชตัวอย่าง	ตัวทำละลาย/ อัตราส่วน 1: 1	เปอร์เซ็นต์ของสารสกัด	รหัส
การสกัดร้อน	ใบสด	Hexane : Ether	1.32	FH-H
		Pentane : Ether	0.63	FH-P
	ใบแห้ง	Hexane : Ether	5.44	DH-H
		Pentane : Ether	5.64	DH-P
การสกัดเย็น	ใบสด	Hexane : Ether	2.29	FC-H
		Pentane : Ether	1.96	FC-P
	ใบแห้ง	Hexane : Ether	5.19	DC-H
		Pentane : Ether	5.83	DC-P
		Hexane	4.27	THC
		CH ₂ Cl ₂	3.08	SWD1
		CH ₂ Cl ₂	5.80	SWD2
		CH ₂ Cl ₂	2.24	CD
		EtOH	7.70	CE
		CH ₃ OH	1.40	CM
		CH ₃ OH	8.13	SWM

2. ลำต้น

การสกัดลำต้นขนาดใหญ่โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ให้ผลการสกัดดังแสดงในตารางที่ 2
ตารางที่ 2 แสดงผลการสกัดลำต้นขนาดใหญ่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	เปอร์เซ็นต์ของสารสกัด	รหัส
การสกัดร้อน	CH_2Cl_2	0.22	HDS1
	CH_2Cl_2	0.69	HDS2
	CH_3OH	0.94	HMS1
	CH_3OH	4.66	HMS2
	CH_3OH	2.61	SCMY
การสกัดเย็น	CH_2Cl_2	0.013	CDS

3. ราก

การสกัดลำรากขนาดใหญ่โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ให้ผลการสกัดดังแสดงในตารางที่ 3
ตารางที่ 3 แสดงผลการสกัดรากขนาดใหญ่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	เปอร์เซ็นต์ของสารสกัด	รหัส
การสกัดร้อน	CH_2Cl_2	0.089	HDR
	CH_2Cl_2	0.69	HDS2
	CH_3OH	1.92	HMR
	CH_3OH	4.66	HMS2
การสกัดเย็น	CH_3OH	5.98	RCMW1
	CH_3OH	2.37	RCMW2
	CH_2Cl_2	0.49	CDR

ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหย

ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบขนาดใหญ่แสดงดังตารางที่ 4
ตารางที่ 4 แสดงผลการสกัดใบขนาดใหญ่ด้วยการกลั่นไอน้ำ

พืชตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหย	รหัส
ใบสด	0.27	DS-F
ใบแห้ง	0.35	DS-D

ตารางที่ 5 แสดงผลการสกัดใบผักกาดนา และ ใบสาบแร้งสาบกา ด้วยการกลั่นไอน้ำ

พืชตัวอย่าง (ใบสด)	เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหย
ผักกาดนา (LM1)	0.05
สาบแร้งสาบกา (LM2)	0.008

ผลการแยกสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย

1. ส่วนของใบ

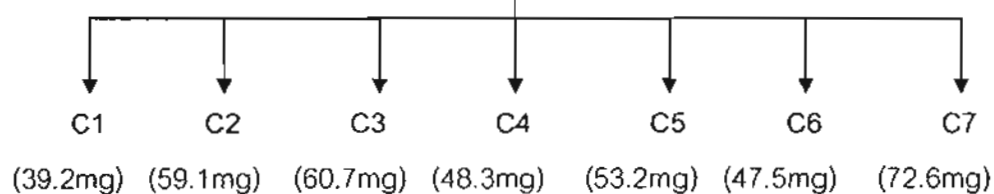
สารสกัดไดคัลโลโรมีเทน SWD2 (400 mg)

แฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี

Hexane:EtOAc(1:4,0:10)

MeOH:EtOAc (0.5:9.5,1:9,1.5:8.5,1:4,3:7)

130 fractions



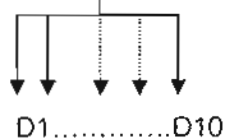
สารสกัดไคคลอโรมีเทน SWD2 (2.2889 g)

เฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี

Hexane:EtOAc (4:1,1:1,3:7,0:10)

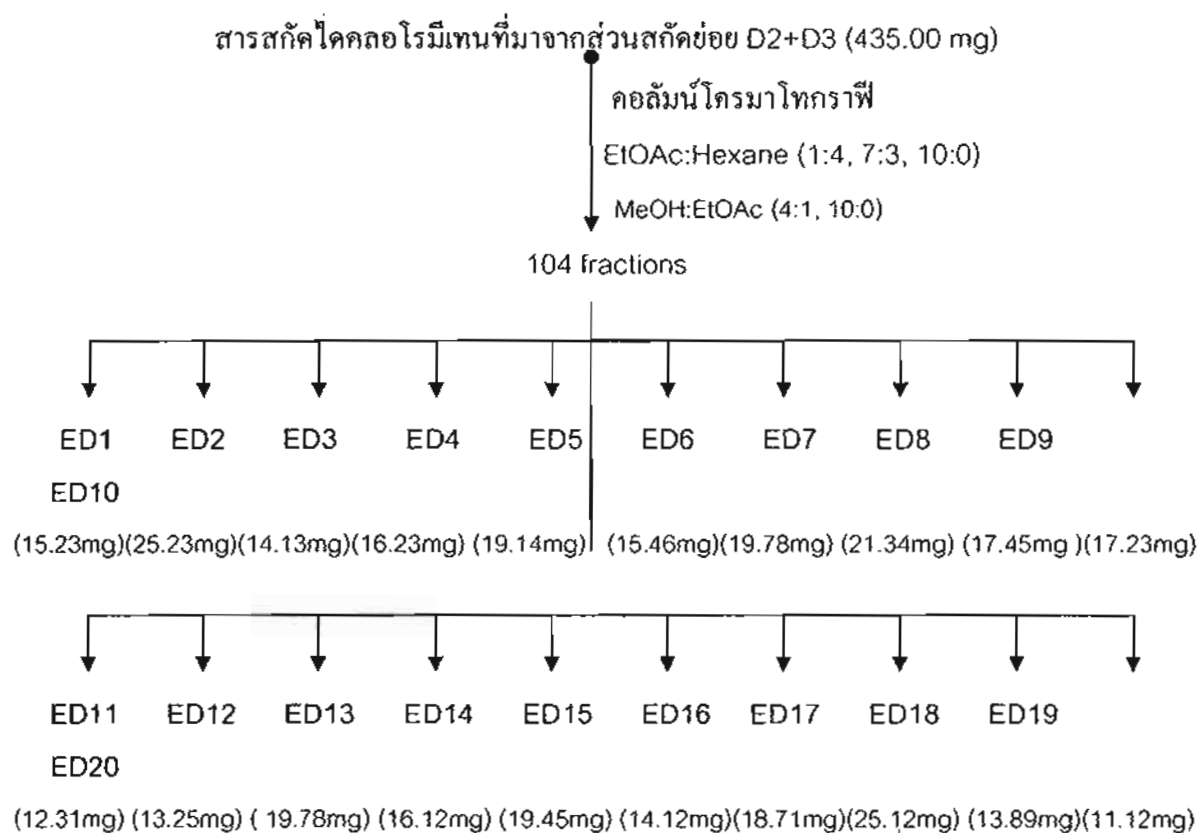
MeOH:EtOAc (0.5:9.5,1:9,1:4,10:0)

194 fractions



ตารางที่ 6 ปริมาณของส่วนสกัดที่ได้จากการแยกสารสกัดไคคลอโรมีเทน (SWD₂) 2.2889 กรัม

ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
D1	123.1
D2	211.5
D3	144.2
D4	250.5
D5	320.3
D6	153.1
D7	407.2
D8	60.7
D9	459.7
D10	92.3
D11	83.1



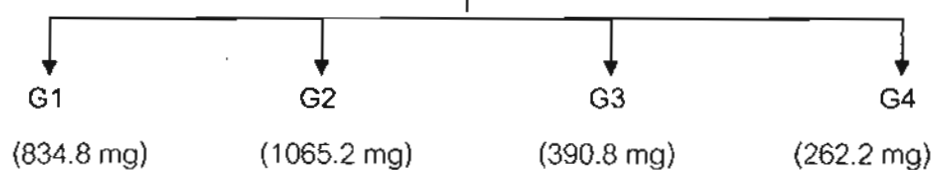
สารสกัดไคคโลโรมีเทนSWD2(2.4654 g)

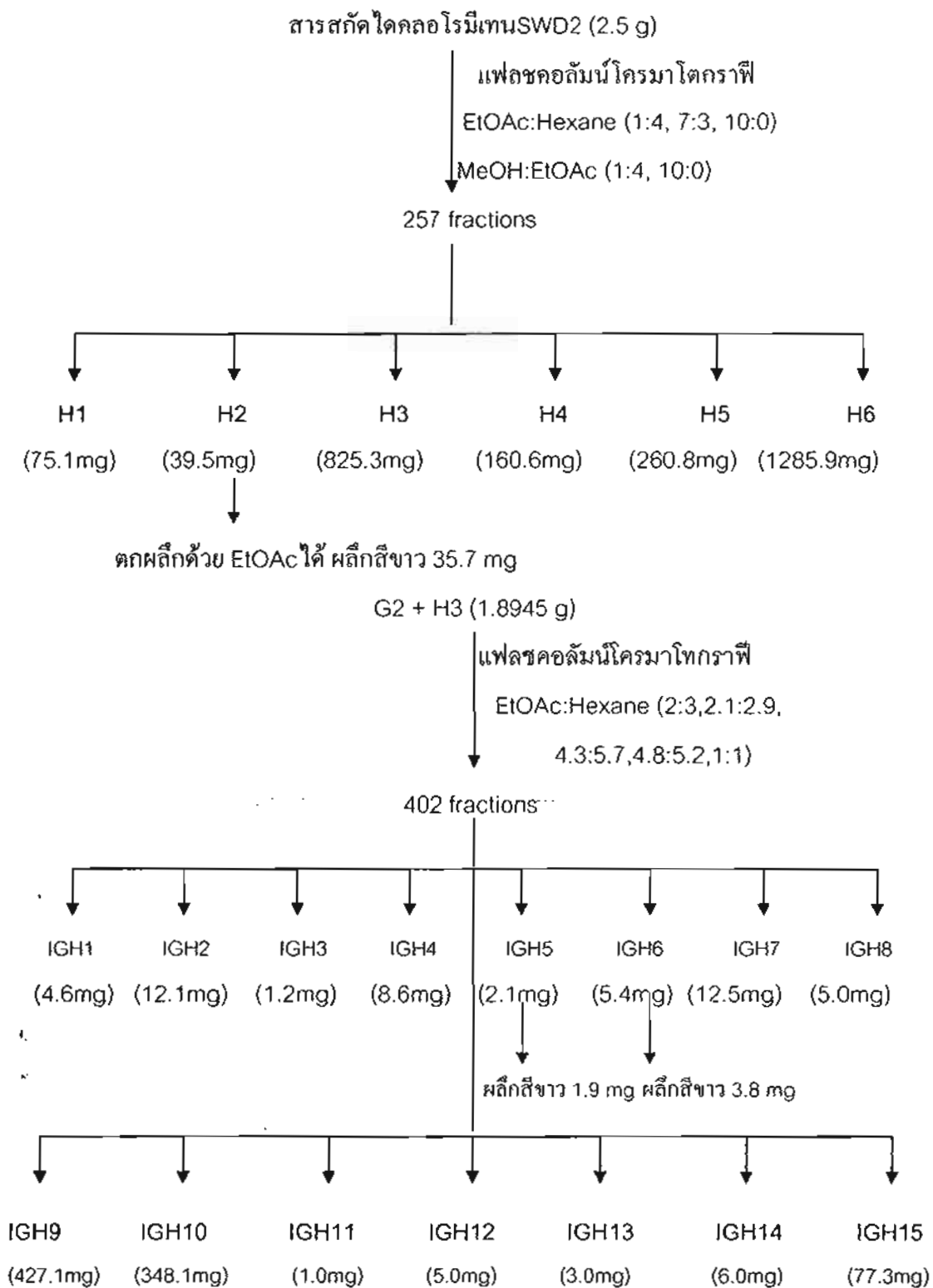
เฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี(i.d. 50 mm)

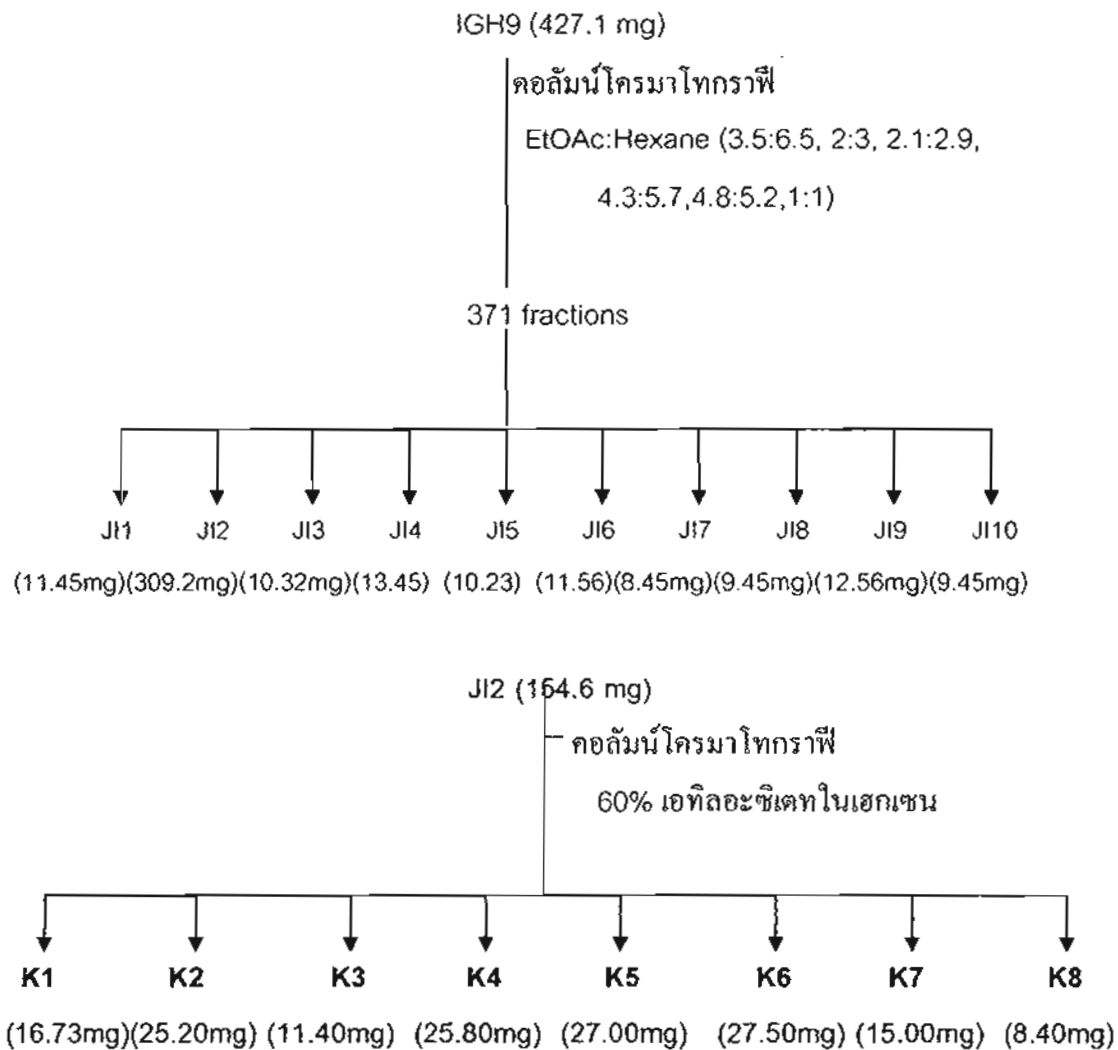
EtOAc : Hexane (1:4,7:3 ,10:0)

MeOH : EtOAc (1:4 , 10:0)

87 fractions





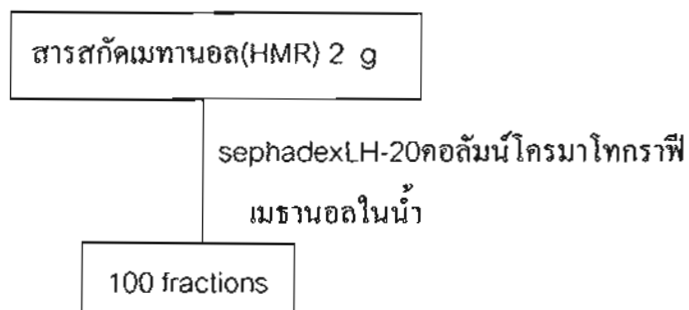


2. ส่วนลำต้น

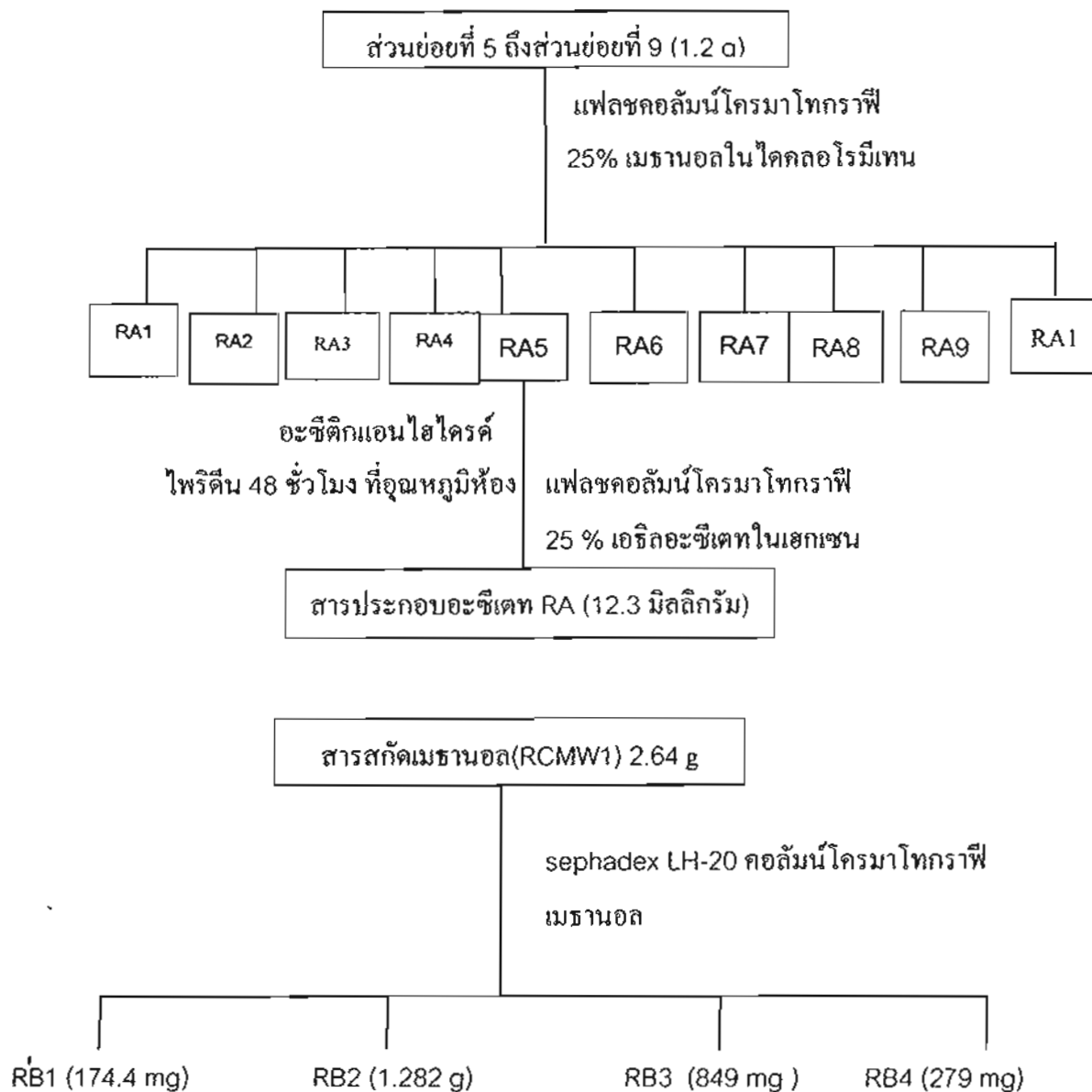
จากการตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดจากลำต้นของหนาดใหญ่ด้วย TLC พบว่ามีลักษณะและองค์ประกอบเหมือนกันกับในส่วนของใบ

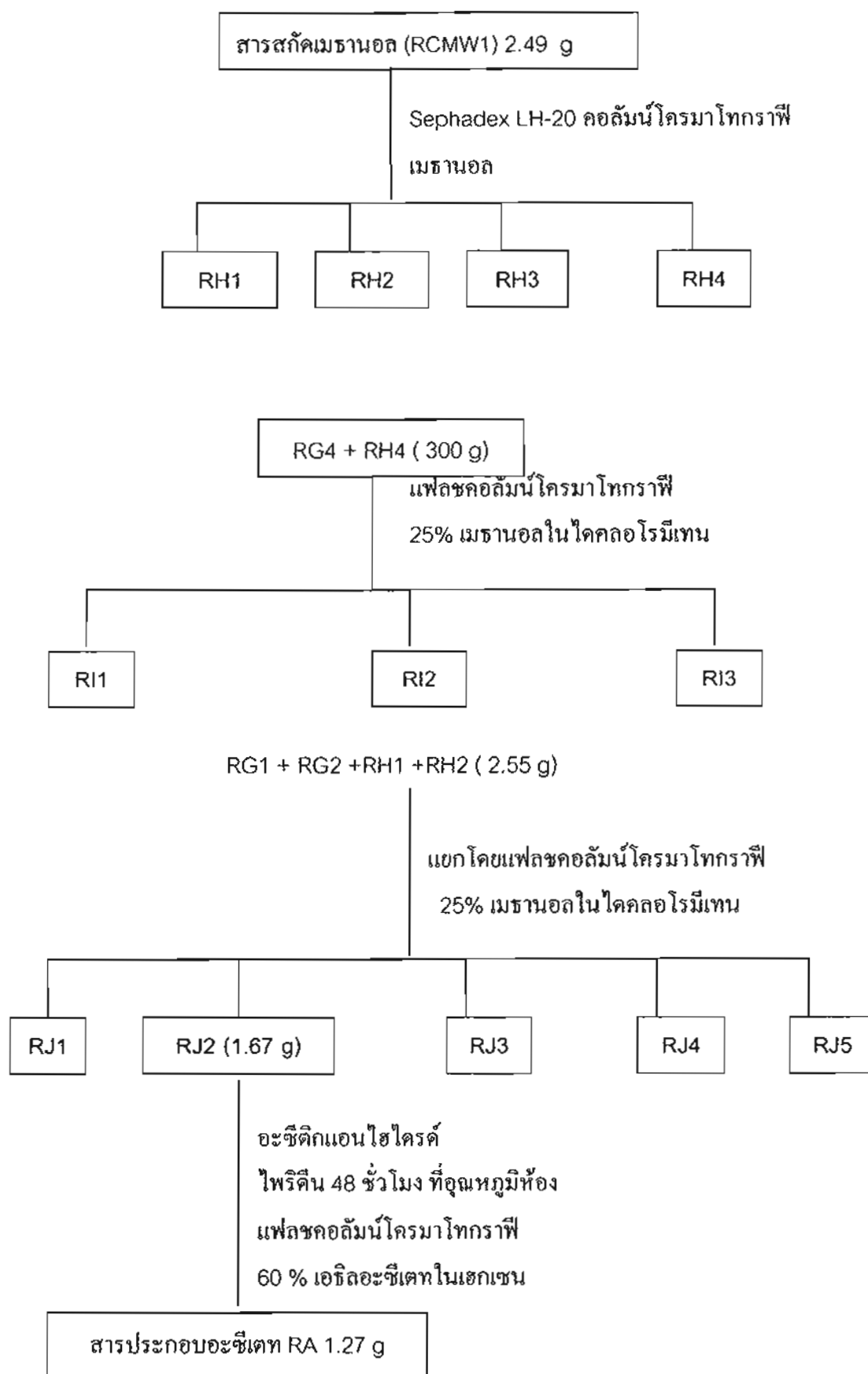
3. ส่วนราก

ได้ทำการแยกสารสกัดจากรากของหนาดใหญ่นี้



100 fractions





ผลการสกัดและการแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบหนาดใหญ่

สารสกัดเฮกเซน (THC) 53 g

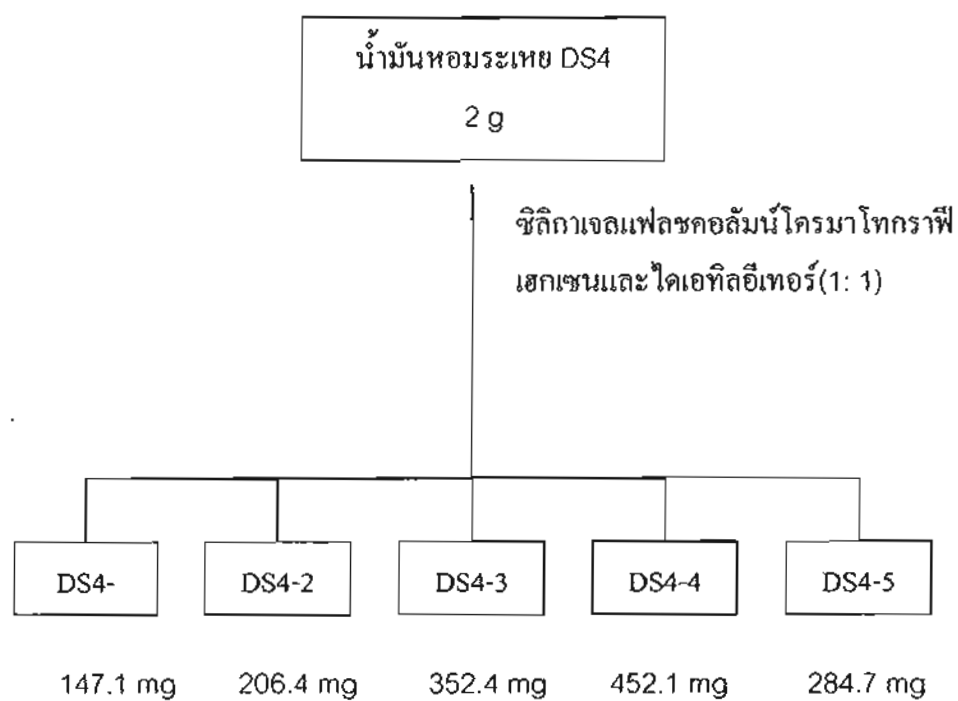


กลั่นไอน้ำโดยใช้
Clevenger type apparatus

5 fractions
(DS1-DS5)

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์ผลการกลั่นน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ Clevenger type apparatus

รหัส	น้ำหนักน้ำมันหอมระเหย (กรัม)	เปอร์เซ็นต์
DS1	10.2450	19.33
DS2	5.3271	10.05
DS3	0.1670	0.33
DS4	3.2221	6.07
DS5	1.9461	3.67

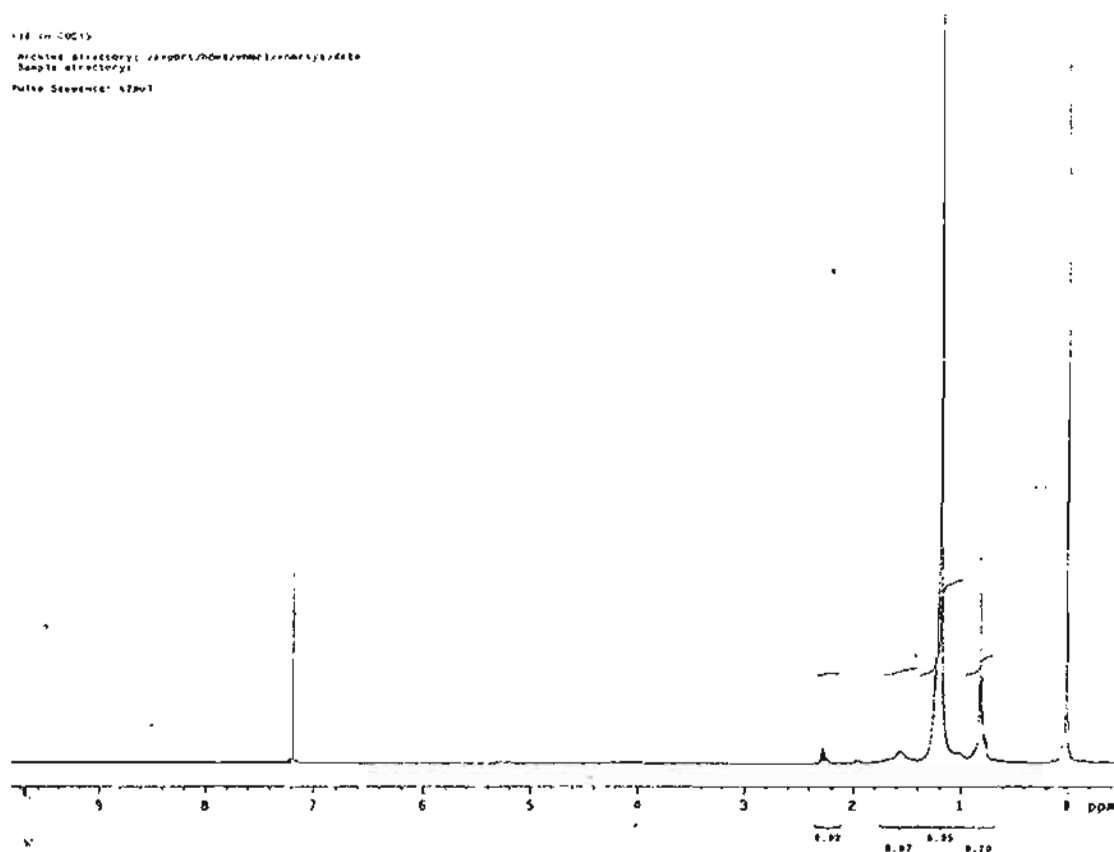


ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์

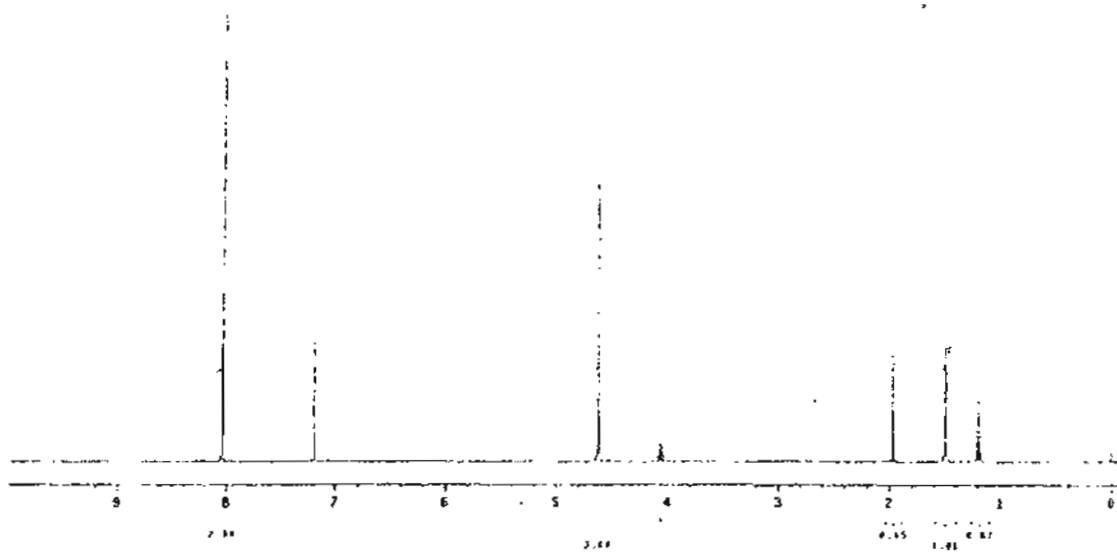
ได้นำสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยกจากสารสกัดจากหนาดใหญ่ไปตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ผลดังแสดงสเปกตรา ในรูปที่ 1 ถึง 8

ผล $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ สาร ED18 แสดงดังรูปที่1

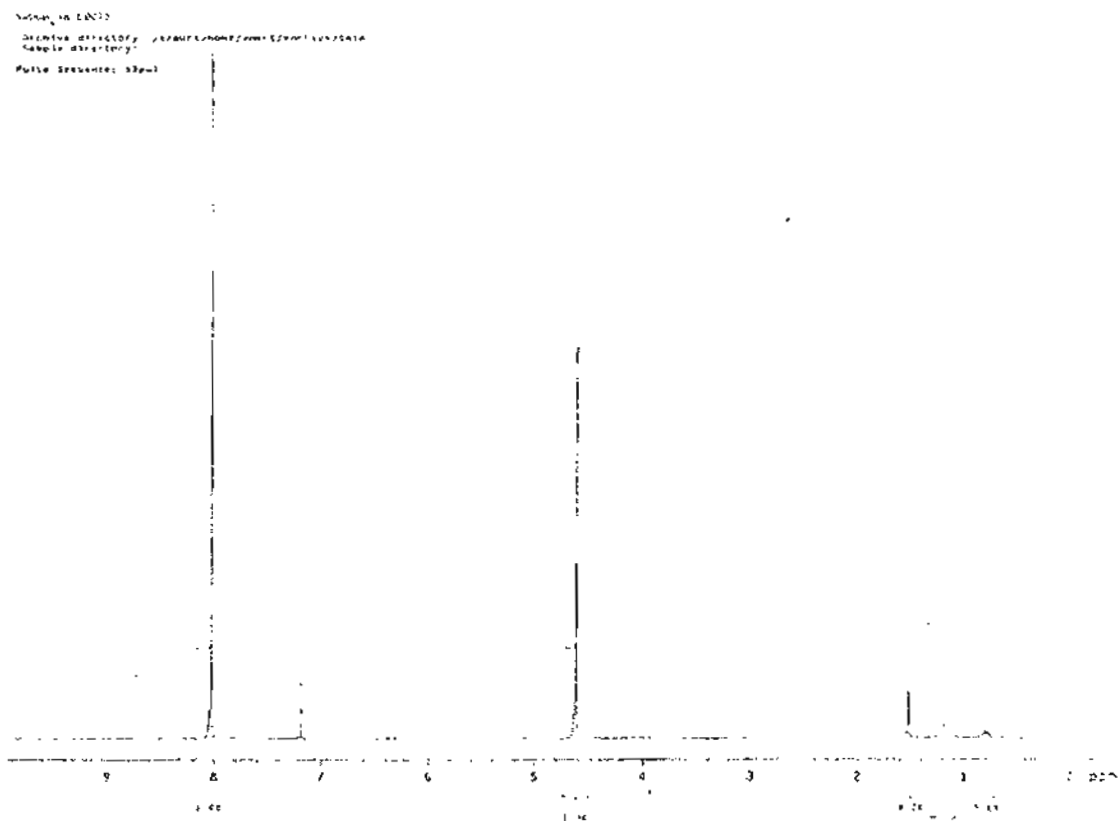


รูปที่ 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ ED18

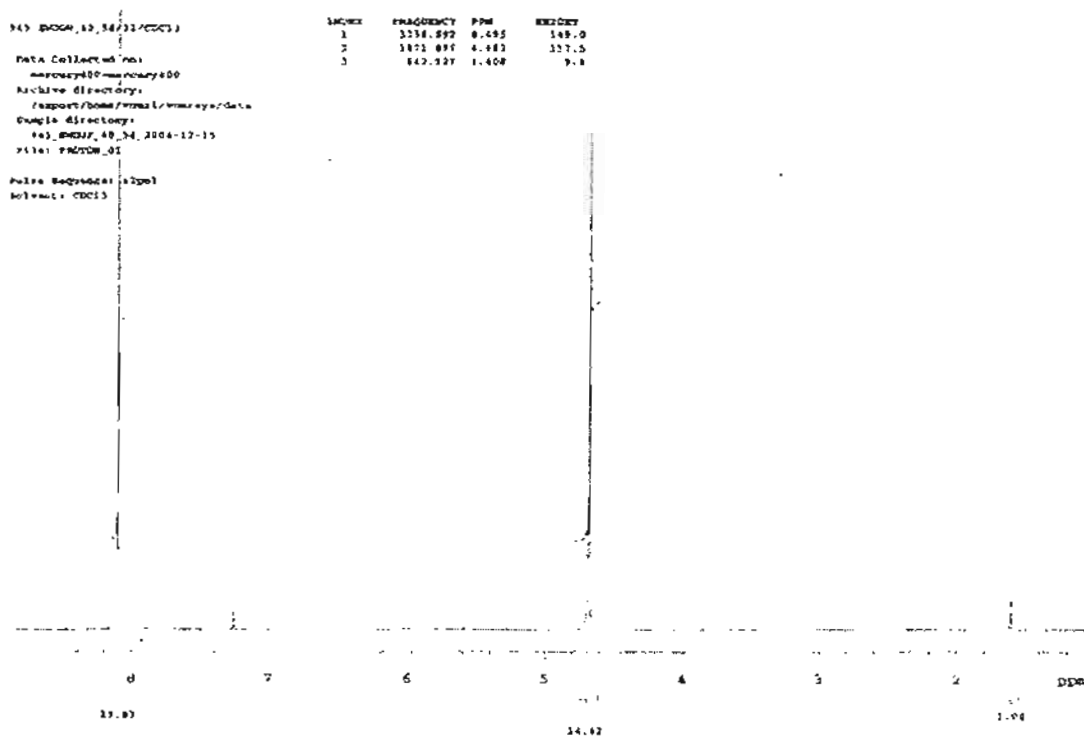
500MHz in CDCl₃
 Acquire date: 2008/08/08 13:00:00
 Sample: 10000000000000000000
 File: 10000000000000000000
 Pulse sequence: zgpg30



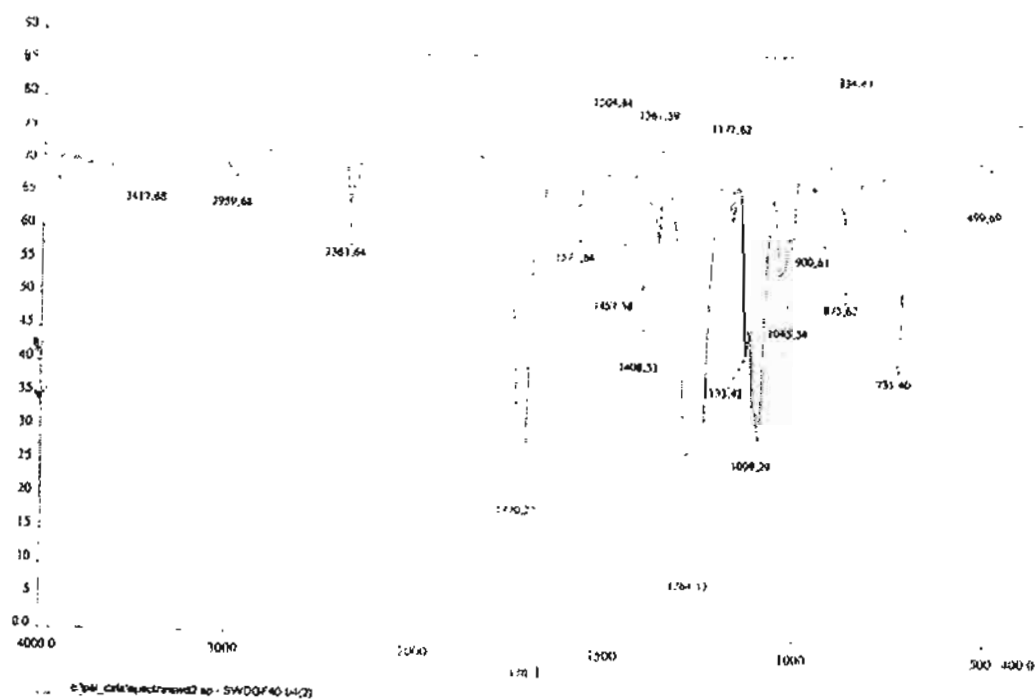
รูปที่ 2 ¹H-NMR spectrum ของ H2



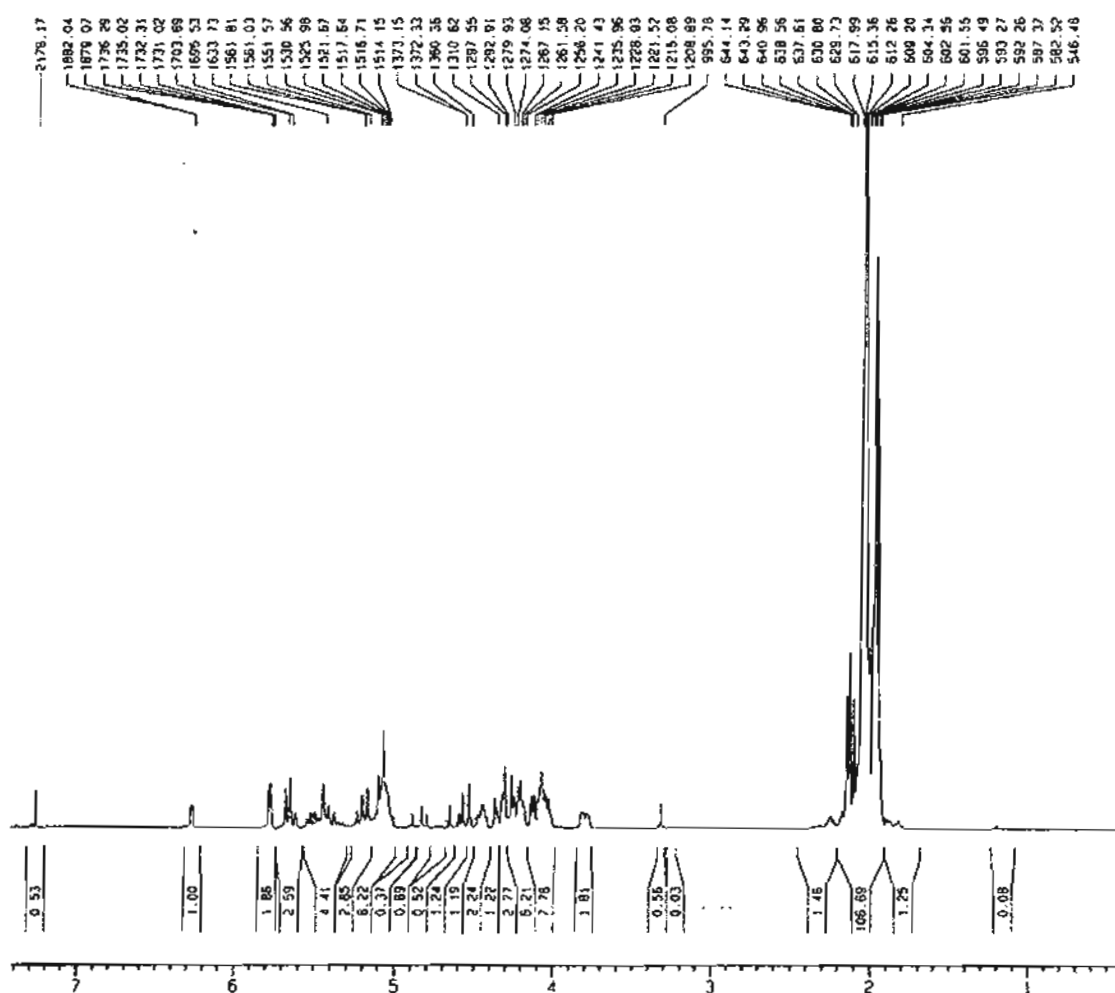
รูปที่ 3 ^1H -NMR spectrum ของ IGH5



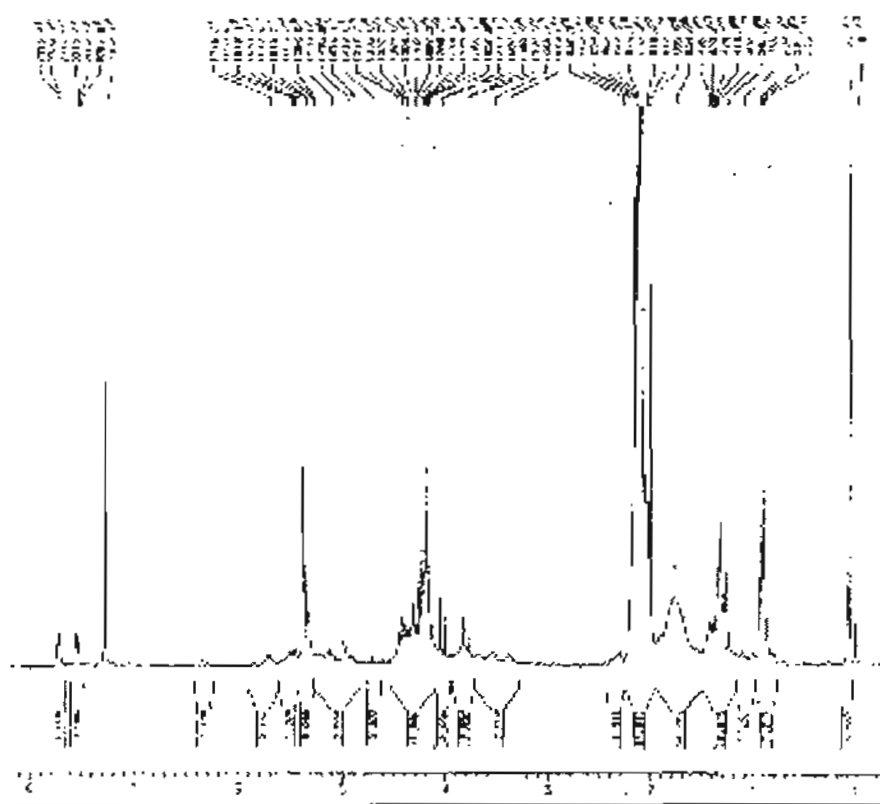
รูปที่ 4 ^1H -NMR spectrum ของ IGH6



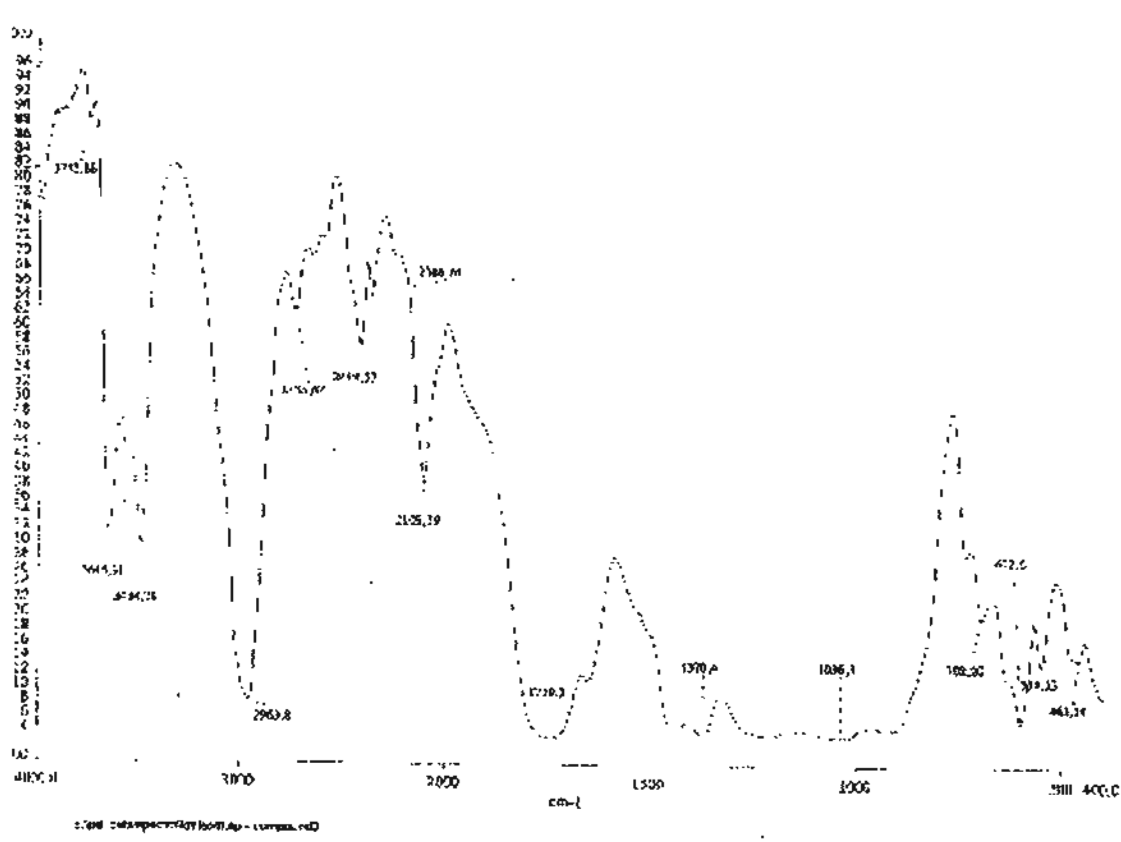
รูปที่ 5 FT-IR spectrum ของ IGH6



รูปที่ 6 ^1H -NMR spectrum ของ สารประกอบอะซีเตต RA



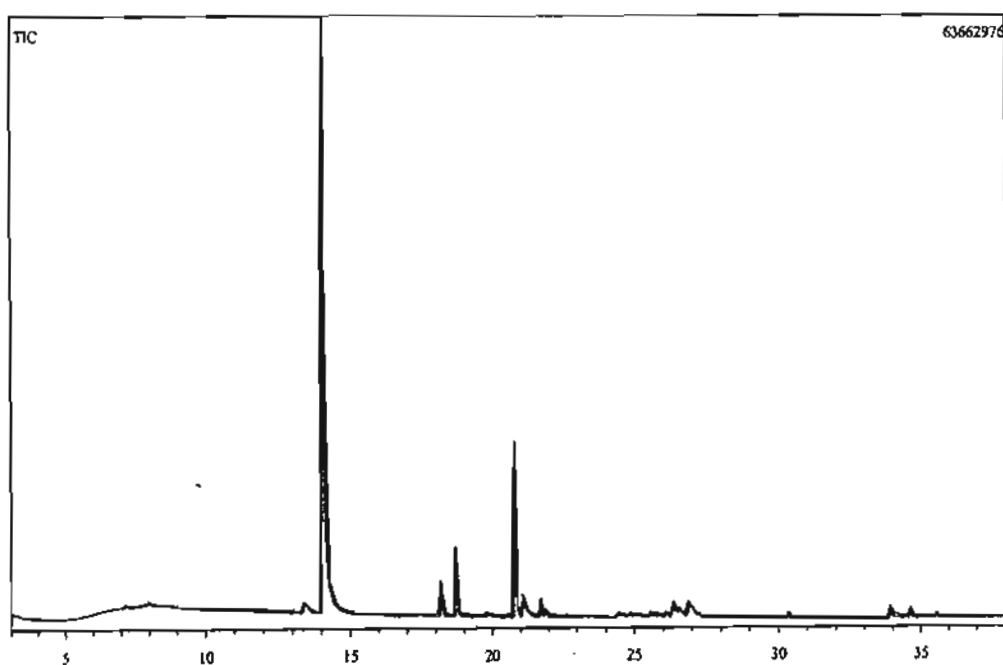
รูปที่ 7 ^1H -NMR spectrum ของสารประกอบอะซีเตท RB



รูปที่ 8 FT-IR spectrum ของสารประกอบอะซีเตต RB

ผลการศึกษองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS

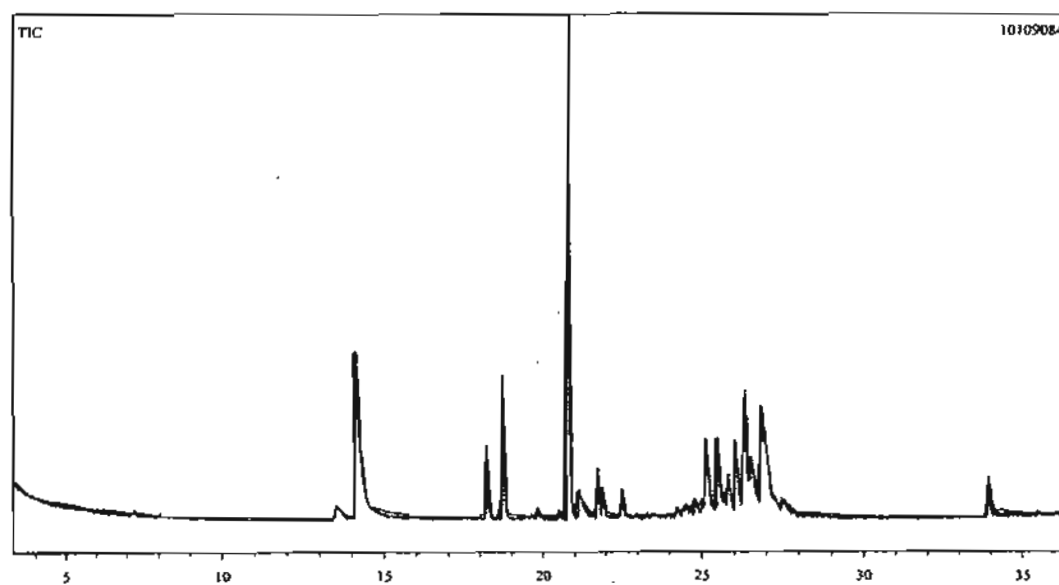
จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดได้ผลดังแสดง แก๊สโครมาโทแกรม ในรูปที่ 10 ถึง 18 และผลการวิเคราะห์องค์ประกอบได้แสดงไว้ในตารางที่ 8 และ 9



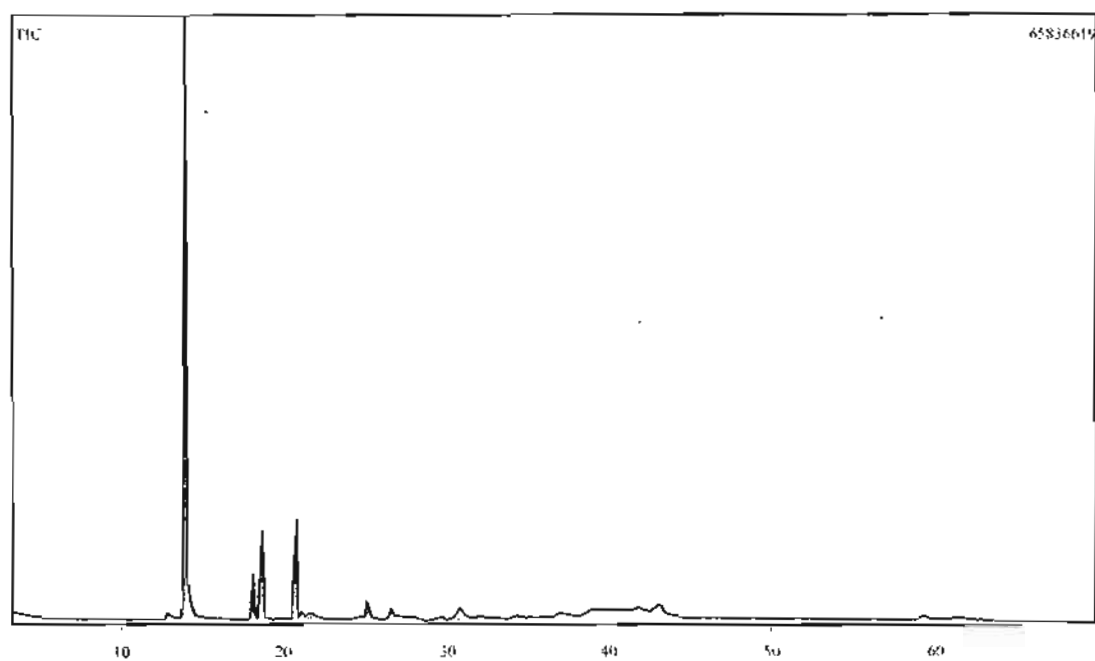
รูปที่ 9 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยของใบสดของหนาดใหญ่ (DS-F)

๙

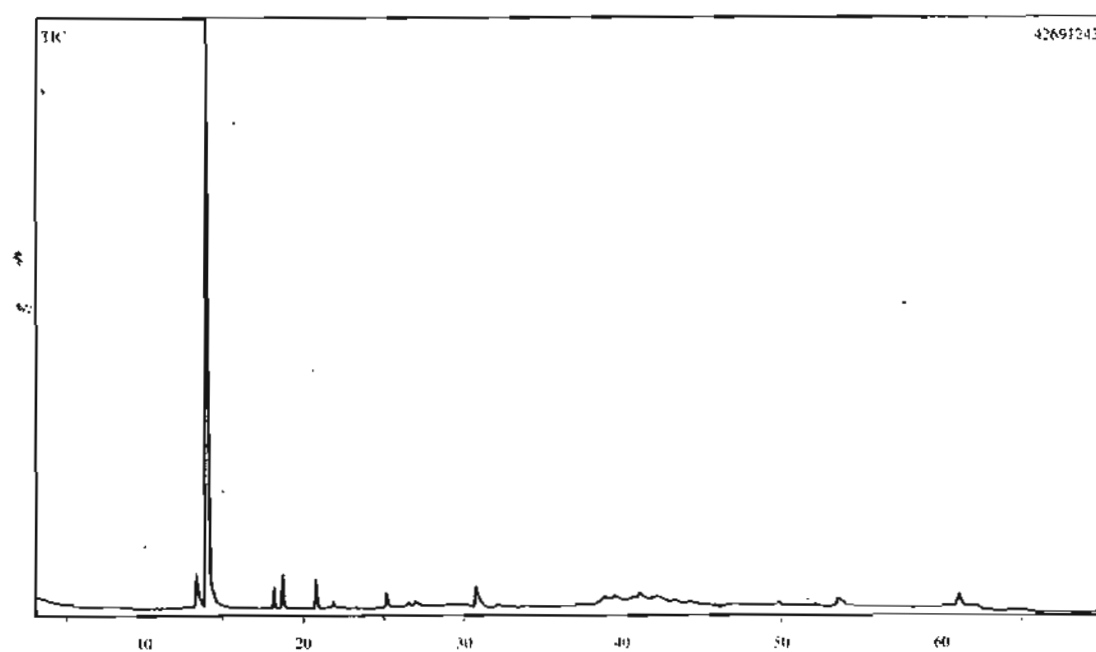
๙



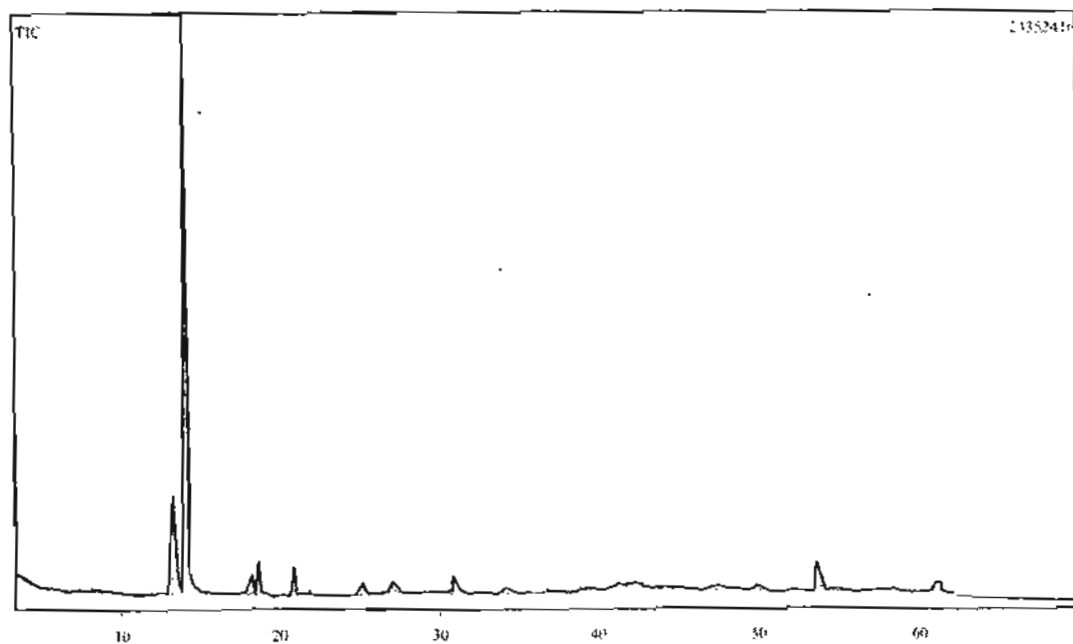
รูปที่ 10 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยของใบแห้งของหนาดใหญ่ (DS-D)



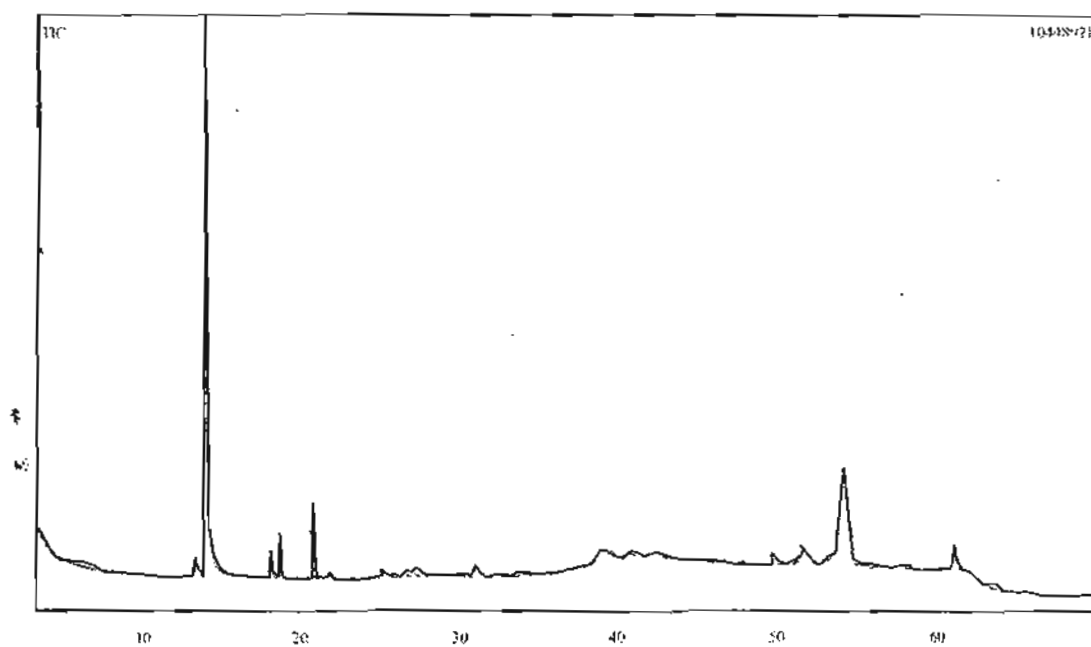
รูปที่ 11 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบแห้งสักร้อนด้วยเพนเทนของหนาดใหญ่ (DH-P)



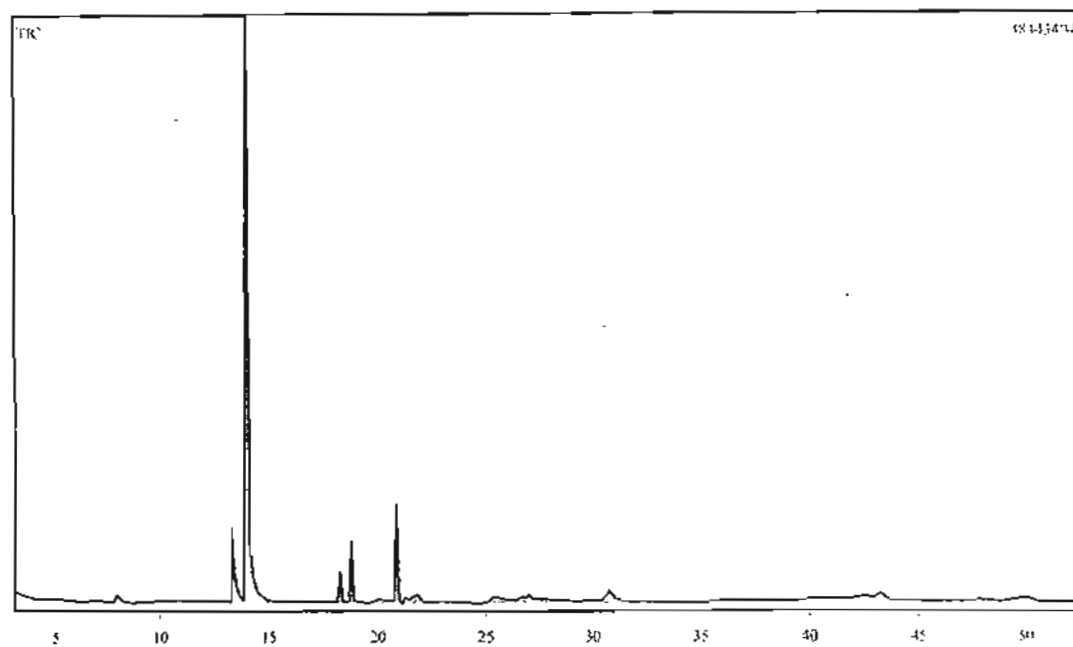
รูปที่ 12 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบสดสักร้อนด้วยเฮกเซนของหนาดใหญ่ (FH-H)



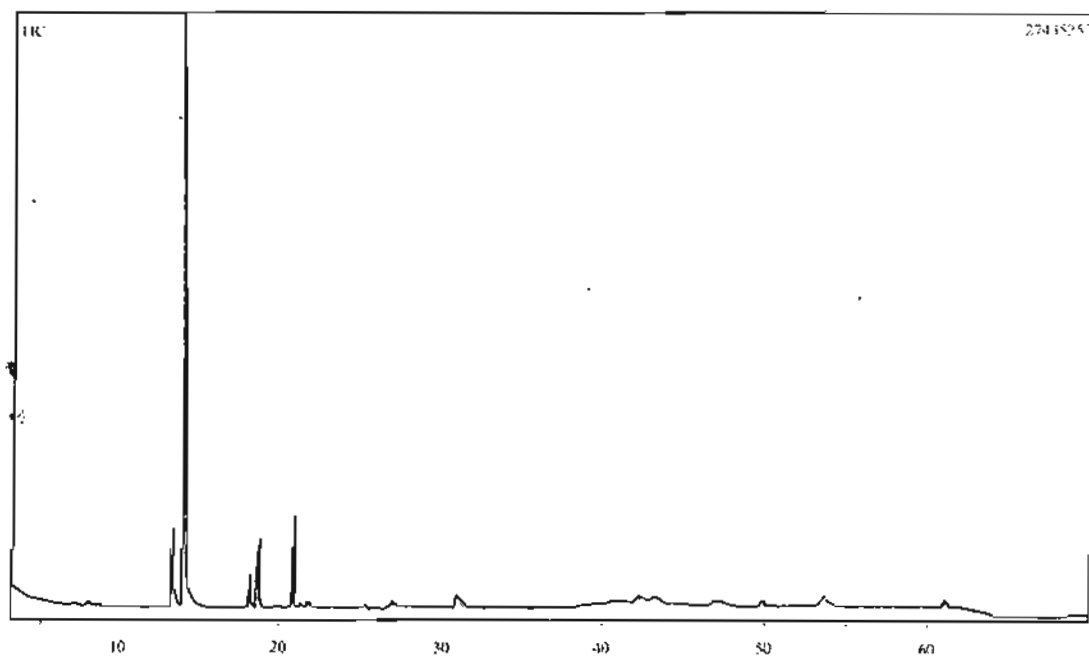
รูปที่ 15 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบสดสกัดด้วยเฮกเซนของหนาดใหญ่ (FH-H)



รูปที่ 16 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบสดสกัดด้วยเพนเทนของหนาดใหญ่ (FC-P)



รูปที่ 17 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบแห้งสกัดเย็นด้วยเพนเทนของหนาดใหญ่ (DC-P)



รูปที่ 18 แก๊สโครมาโทแกรมที่ได้จากใบแห้งสกัดเย็นด้วยเฮกเซนของหนาดใหญ่ (DC-H)

ตารางที่ 8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมมีระเหยและสารสกัดของหนาดใหญ่

No.	Compounds	% Component									
		DS - D	DS - F	FC - P	DC - P	FC - H	DC - H	FH - P	DH - P	FH - H	DH - H
1	α - terpinol	-	-	-	-	0.28	Trace	-	-	-	-
2	α - pinene	-	-	-	-	-	-	-	-	trace	0.52
3	camphene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	trace
4	myrcenol	trace	-	trace	-	-	-	-	-	trace	-
5	3,5-dimethyl-4-ethylidene-cyclohex-2-ene-1-one	-	-	0.90	-	-	-	0.66	-	-	-
6	camphor	trace	0.65	trace	2.23	11.19	14.00	4.58	7.21	12.22	11.33
7	borneol	15.44	70.48	68.56	55.30	66.90	73.81	66.82	7.31	69.00	68.33
8	isoborneol	-	-	trace	-	-	0.02	-	-	trace	0.09
9	2H-2,4a-ethanonaphthalene										
	- 1,3,4,5,6,7 -hexahydro-2,5,5 - trimethy	trace	2.22	3.33	1.38	2.34	1.88	3.44	2.00	2.54	1.59
10	azulene,2,3m3a,4,5,6,7 -- octahydro -										
	1,4 - dimethyl -7-(1-methylethynyl)	6.54	4.88	7.00	2.57	5.60	3.41	7.32	3.38	5.32	2.72
11	α - patchoulene	0.40	trace	0.26	-	trace	-	0.24	-	trace	-
12	triacontane	-	-	0.33	2.20	-	-	-	-	-	-
13	unknown (2Q4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	unknown (2Q4)	trace	trace	-	-	-	-	-	-	-	-
15	cis-caryophyllene	22.01	11.75	7.33	3.73	8.13	2.96	9.15	2.80	7.05	-

ตารางที่ 8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยและสารสกัดของหนาดใหญ่ (ต่อ)

No.	Compounds	% Component									
		DS - D	DS - F	FC - P	DC - P	FC - H	DC - H	FH - P	DH - P	FH - H	DH - H
16	1,4-dimethoxy-2,3,5,6-tetramethyl-(CAS)										
	1,4 - dimethoxyl (dimethoxyldurene)	0.71	1.88	0.83	-	trace	-	trace	-	trace	-
17	unknoen (204)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	trace
18	α - Humulene	2.13	1.14	0.47	trace	0.64	-	0.38	-	0.40	2.19
19	1 H-cyclopropeazulene-decahydro-										
	1,1,7-trimethyl-4-methylene	1.29	0.47	0.62	trace	0.59	0.65	0.42	0.57	0.43	0.57
20	aromadendrene	-	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-
21	phenol	-	-	trace	-	0.34	trace	0.79	trace	trace	trace
22	caryophyllene oxide	-	-	-	-	trace	0.88	-	-	trace	-
23	isocaryophyllene	-	-	0.24	trace	-	trace	0.26	-	-	1.03
24	patchoalene	0.39	-	1.78	trace	-	-	-	-	-	-
25	unknown	1.14	-	-	-	-	-	trace	-	-	-
26	1 H-cyclopropeazulene.decahydro										
	1,1,7-trimethylene	0.50	0.50	-	trace	trace	trace	trace	-	-	trace
27	unknown (220)	4.39	-	-	-	-	-	1.93	-	-	-
28	hedycaryol	-	-	-	-	trace	-	trace	trace	-	-
29	guaial	4.80	trace	-	trace	1.20	-	1.56	-	trace	trace

ตารางที่ 8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมสระเหยและสารสกัดของหนวดใหญ่ (ต่อ)

No.	Compounds	% Component									
		DS - D	DS - F	FC - P	DC - P	FC - H	DC - H	FH - P	DH - P	FH - H	DH - H
30	unknown	0.86	0.86	-	-	-	-	trace	trace	trace	-
31	elemol	-	0.90	-	trace	2.35	trace	2.46	3.20	1.02	2.55
32	phorphine bornyldichloro	-	-	-	-	trace	trace	-	-	-	0.24
33	2 - naphthalenemethanol	2.02	0.90	-	trace	-	-	-	-	-	-
34	2 - hexyn - ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20
35	agaruspirol	7.73	-	-	trace	-	-	-	-	-	-
36	unknown	trace	trace	-	-	-	-	-	-	trace	-
37	unknown(222)	3.46	0.91	1.28	trace	-	trace	-	-	-	trace
38	unknown(204)	0.22	-	-	trace	-	trace	-	-	-	0.04
39	β -eudesmol	4.71	1.03	-	trace	trace	-	-	-	-	-
40	unknown(220)	7.26	1.91	0.25	trace	trace	trace	-	-	-	-
41	unknown(204)	-	0.22	-	trace	trace	trace	trace	trace	trace	-
42	5-Azulenemethanol	-	trace	1.70	1.70	-	-	-	-	-	-
43	unknown(208)	-	-	trace	trace	-	-	-	-	-	trace
44	unknown(152)	1.82	0.47	trace	trace	-	trace	trace	trace	-	-
45	unknown(hydrocarbon)	-	0.62	-	-	-	-	-	-	-	-
46	unknown(hydrocarbon)	-	0.32	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมมะลิและสารสกัดของหนาดใหญ่ (ต่อ)

No.	Compounds	% Component									
		DS - D	DS - F	FC - P	DC - P	FC - H	DC - H	FH - P	DH - P	FH - H	DH - H
47	7-hexadecyne	-	-	0.46	trace	trace	trace	-	-	-	-
48	unknown	0.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	unknown(208)	-	-	-	-	-	-	trace	-	-	-
50	unknown	-	-	trace	trace	trace	trace	trace	trace	-	-
51	unknown(222)	-	-	-	0.88	-	-	-	-	0.80	0.44
52	unknown(hydrocarbon)	0.20	-	4.73	-	2.35	-	trace	trace	-	-
53	octadecane hydrocarbon(254)	-	-	0.92	trace	-	-	-	trace	0.14	6.04
54	jasmolin	-	-	1.46	trace	trace	trace	trace	trace	trace	trace
55	impurity(410)	-	-	-	-	-	-	-	-	trace	trace
56	α -Caryophyllene alcohol	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-	-
57	unknown(222)	-	-	-	0.26	trace	2.40	trace	2.66	0.71	1.92
58	juniper camphor	-	-	-	0.87	-	-	-	-	-	-
59	unknown(204)	-	-	-	4.42	-	-	-	-	-	-
60	unknown(204)	-	-	-	2.25	-	-	-	-	-	-
61	unknown(204)	-	-	-	3.55	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 9 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบผักกาดนาและสาวไร่สาบกา

No.	Compounds	% Component			
		ผักกาดนา		สาวไร่สาบกา	
		<i>Blumea napifolia</i> DC.		<i>Laggera arufa</i> Sch.-Bip. ex Schw.	
		Essential Oil	Crude hexane-ether extract	Essential Oil	Crude hexane-ether extract
1.	α - pinene	1.58	nd	nd	nd
2.	β - pinene	0.27	nd	nd	nd
3.	3 - careen	nd	nd	0.23	nd
4.	α - terpinene	nd	nd	2.89	nd
5.	γ - terpinene	nd	nd	0.45	nd
6.	Unknown (Mw. 220)	nd	nd	5.92	nd
7.	4 - terpineol	0.52	nd	11.37	nd
8.	Unknown (Mw. 136)	nd	nd	0.91	nd
9.	Unknown (Mw. 259)	nd	nd	0.45	nd
10.	Unknown (Mw. 154)	nd	nd	0.35	nd
11.	longipinene	0.14	nd	nd	nd
12.	α - ylangene	0.17	nd	nd	nd
13.	copaene	0.8	nd	tr	nd
14.	Unknown (Mw. 250)	nd	nd	0.59	nd
15.	α - cubebene	0.19	1.94	7.87	nd
16.	β - elemene	1.61	nd	nd	nd
17.	β - caryophyllene	11.8	8.61	4.41	4.6
18.	1,4 - dimethoxylet	2.76	nd	nd	nd
19.	Unknown (Mw. 222)	nd	nd	0.35	nd
20.	α - humulene	5.7	2.00	1.19	nd
21.	Unknown (Mw. 204)	nd	0.89	0.43	nd
22.	germacrene D	10.47	2.82	nd	nd
23.	γ - cadinene	4.27	nd	nd	nd
24.	Unknown (Mw. 204)	nd	nd	0.33	nd
25.	cis- farnesol	2.0	nd	nd	nd
26.	Unknown (Mw. 205)	nd	nd	0.17	nd
27.	α - zingibirene	10.12	12.82	nd	nd
28.	α - muurolene	nd	nd	2.21	nd
29.	α - amorphene	1.04	nd	nd	nd
30.	valencene	1.19	0.64	nd	nd
31.	Unknown (Mw. 287)	nd	nd	0.17	0.68
32.	copaene	nd	nd	0.77	nd
33.	aroma	0.61	nd	nd	nd

ตารางที่ 9 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบผักกาดนาและสาบแร้งสาบกา(ต่อ)

No	Compounds		%Component			
			ผักกาดนา		สาบแร้งสาบกา	
			<i>Blumea napifolia</i> DC.		<i>Laggera aruita</i> Sch.-Bip.ex Schw.	
			Essential Oil	Crude hexane-ether extract	Essential Oil	Crude hexane-ether extract
34.	α - cedrol	1357	2.62	nd	nd	nd
35.	Unknown (Mw. 220)	1359	0.19	nd	0.38	1.70
36.	capellane - alphaol	1361	3.49	nd	nd	nd
37.	Unknown (Mw. 218)	1361	nd	nd	0.39	nd
38.	spathulenol	1363	0.22	nd	nd	nd
39.	Unknown (Mw.220)	1365	tr	nd	nd	nd
40.	Unknown (Mw. 239)	1366	nd	nd	0.57	nd
41.	ledenoxide	1367	1.84	nd	nd	nd
42.	elemol	1369	nd	nd	1.32	nd
43.	Unknown (Mw. 220)	1369	0.31	nd	1.31	nd
44.	Unknown (Mw. 220)	1371	0.1	nd	nd	nd
45.	Unknown (Mw. 220)	1372	0.08	nd	0.25	nd
46.	Unknown (Mw. 220)	1374	0.42	nd	tr	nd
47.	geranyl propionate	1376	2.01	nd	0.23	nd
48.	Unknown (Mw. 220)	1378	3.47	nd	1.08	nd
49.	Unknown (Mw. 220)	1381	2.13	nd	nd	nd
50.	Unknown (Mw. 220)	1382	0.54	nd	nd	nd
51.	caryophyllene oxide	1384	0.16	nd	nd	nd
52.	Unknown (Mw. 220)	1385	0.31	nd	0.59	nd
53.	caryophyllene oxide	1387	0.82	nd	0.82	nd
54.	$C_{15}H_{26}O$	1388	0.27	nd	0.74	nd
55.	Unknown (Mw. 220)	1389	1.05	nd	nd	nd
56.	Unknown (Mw. 220)	1390	nd	nd	0.32	nd
57.	$C_{15}H_{24}O$	1392	1.46	nd	1.73	0.38
58.	Unknown (Mw. 223)	1393	nd	nd	2.83	nd
59.	Unknown (Mw. 204)	1396	2.56	nd	4.40	nd
60.	Unknown (Mw. 222)	1397	2.34	nd	5.70	nd
61.	β - eudesmol	1400	1.26	nd	9.27	nd
62.	Unknown (Mw. 222)	1400	3.1	nd	nd	nd
63.	torrey	1401	3.1	nd	1.77	nd
64.	Unknown (Mw. 222)	1401	nd	nd	15.05	3.83
65.	Unknown (Mw. 220)	1405	0.31	nd	0.56	nd
66.	aromadendrene	1405	0.68	nd	3.09	nd

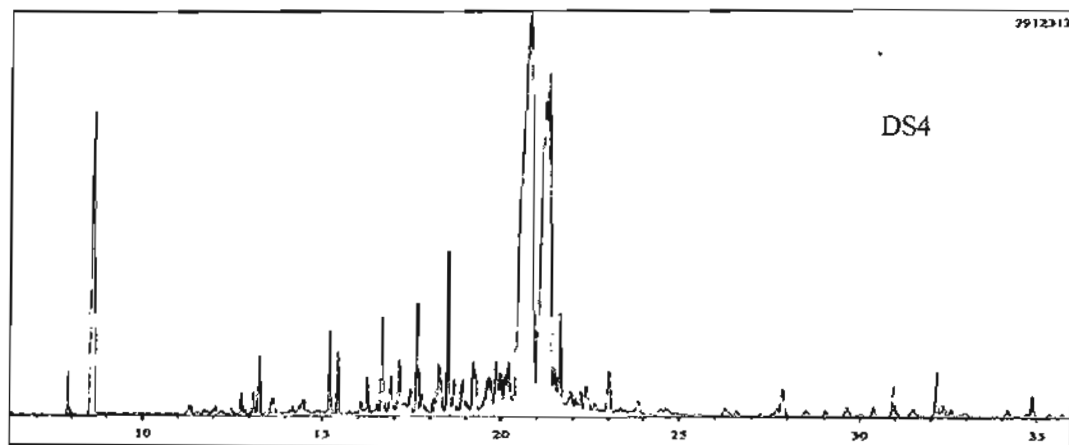
ตารางที่ 9 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบผักกาดนาและสาบแร้งสาบกา(ต่อ)

No.	Compound	KI	% content			
			<i>Blumea napifolia</i> DC.		<i>Laggera aruila</i> Sch.-Bip ex Schw.	
			Oil	Crude	Oil	Crude
67.	aromadendrene poxide	1410	1.35	nd	nd	nd
68.	Unknown (Mw. 222)	1413	0.23	nd	nd	nd
69.	Unknown (Mw. 235)	1415	0.13	nd	0.47	nd
70.	Unknown (Mw.238)	1421	0.24	nd	nd	nd
71.	Unknown (Mw. 264)	1431	0.18	nd	nd	nd
72.	Unknown (Mw. 309)	1445	0.15	0.46	nd	13.03
73.	Unknown (Mw.234)	1447	2.61	nd	nd	1.72
74.	Unknown (Mw. 234)	1458	0.42	nd	nd	2.81
75.	C ₁₈ H ₃₈	1524	0.07	nd	nd	0.28
76.	Unknown (Mw. 256)	1537	0.06	nd	nd	nd
77.	C ₂₅ H ₅₂	1540	1.01	nd	0.06	nd
78.	octadecane	1551	nd	4.40	tr	nd
79.	pentacosane	1552	nd	nd	nd	2.54
80.	Unknown (Mw. 281)	1579	0.18	2.03	nd	5.90
81.	Unknown (Mw. 288)	1593	nd	nd	nd	2.51
82.	Unknown (Mw. 288)	1600	nd	0.2	nd	nd
83.	Unknown (Mw. 231)	1604	nd	3.75	nd	8.97
84.	Unknown (Mw. 304)	1605	nd	14.95	nd	nd
85.	Unknown (Mw. 304)	1612	nd	7.94	nd	nd
86.	Unknown (Mw. 309)	1618	nd	4.72	nd	8.71
87.	Unknown (Mw. 299)	1636	nd	nd	nd	0.67
88.	Unknown (Mw. 286)	1655	nd	3.75	nd	nd
89.	Unknown (Mw. 281)	1670	nd	16.42	nd	2.08
Total			96.71	88.34	93.99	60.41

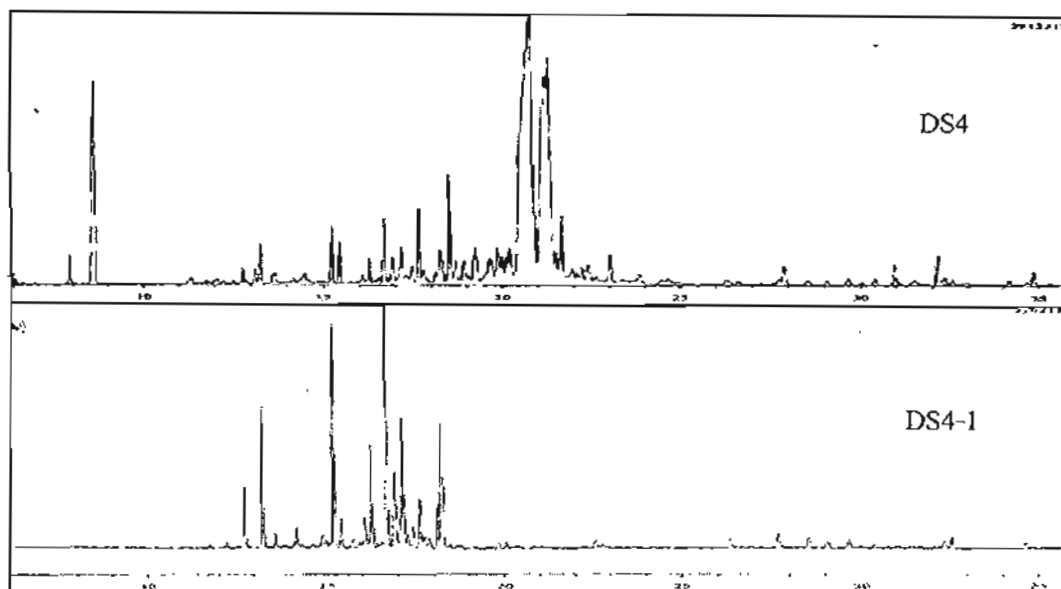
tr = Trace (concentration < 0.01 %)

nd = Not detected

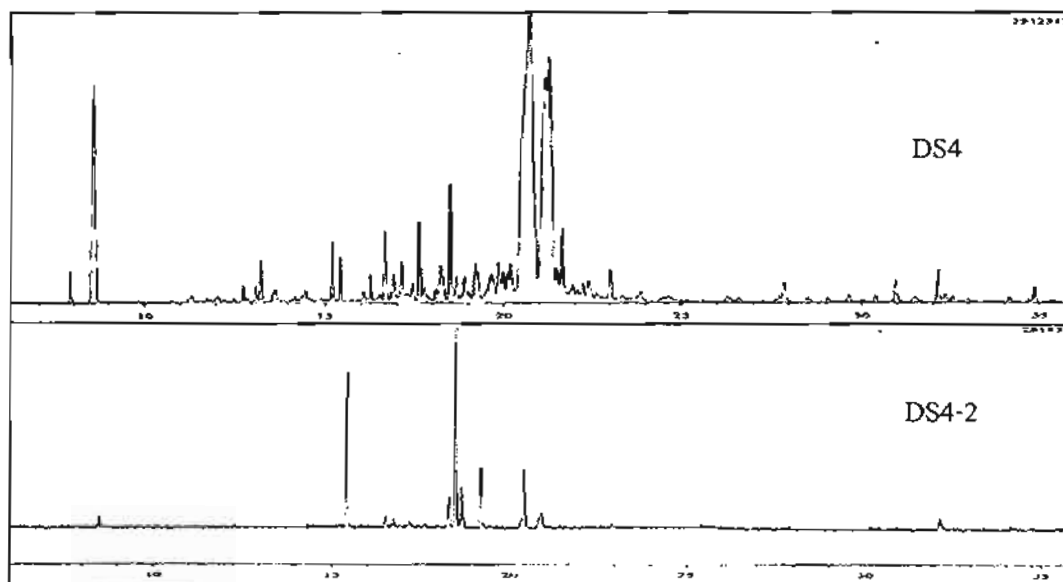
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อยของน้ำมันหอมระเหยจากหนาดใหญ่ซึ่งผ่านกระบวนการแยกโดยใช้เฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวิเคราะห์ประกอบโดยใช้ GC-MS ได้ผลดังแสดงเป็น แก๊สโครมาโทแกรมในรูปที่ 18 ถึง 23 และเปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 10



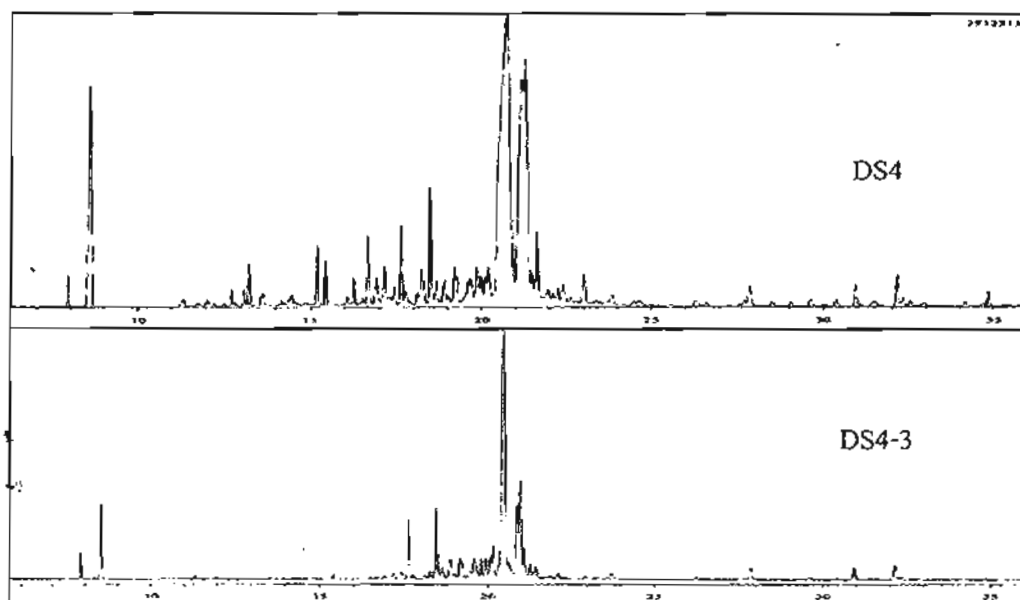
รูปที่ 19 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนย่อยที่ 4 (DS4)



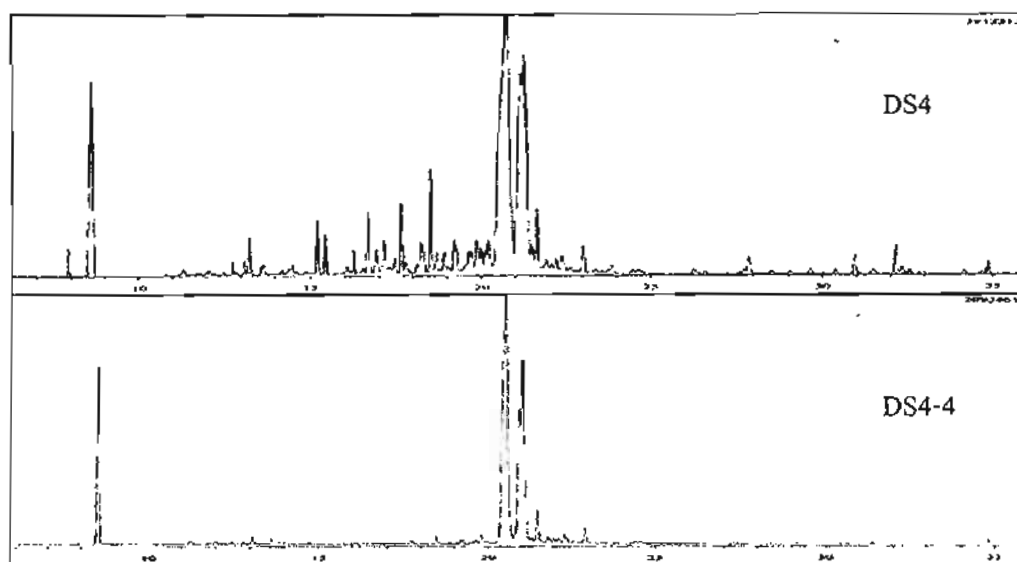
รูปที่ 20 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 1 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-1)



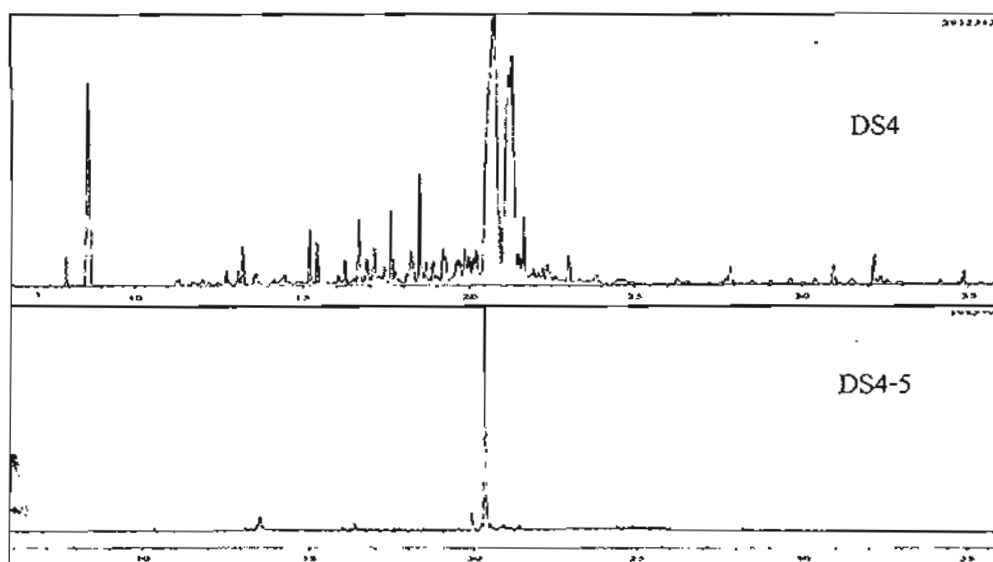
รูปที่ 21 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 2 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-2)



รูปที่ 22 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 3 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-3)



รูปที่ 23 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 4 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-4)



รูปที่ 24 แก๊สโครมาโทแกรมของน้ำมันหอมระเหยส่วนที่ 5 ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (DS4-5)

ตารางที่ 10 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของ DS4 และตัวอย่าง (DS4-1 ถึง DS4-5)

Components	% component					
	DS4	DS4-1	DS4-2	DS4-3	DS4-4	DS4-5
camphor	0.50	-	-	1.40	-	-
borneol	7.85	-	1.60	3.90	12.00	-
citronellol	0.12	-	-	0.22	-	-
1,2,4-tripropyl benzene	0.30	3.48	-	-	-	-
2-bata-farnesene	0.80	8.55	-	-	-	-
1-(1,5-dimethyl-4-methyl) benzene	0.20	0.90	-	-	-	-
bata-caryophyllene	1.20	14.60	-	-	-	-
2,4-dimethoxy-6-methyl benzoic acid, methyl ester	1.00	1.50	21.20	0.30	-	-
muurolene	0.17	2.00	-	-	-	-
aromadendrene	0.60	6.40	-	-	-	-
unknown(Mw202)	0.11	0.63	0.92	-	-	-
bata-guaiene	1.48	16.20	-	-	-	-
germacrene D	0.70	7.24	-	-	-	-
valencene	1.00	10.20	-	-	-	-
unknown(Mw218)	0.26	1.14	-	0.36	-	-
unknown(Mw203)	0.48	1.56	-	-	-	-
unknown(Mw220)	1.66	3.11	-	4.00	-	-
azulene	1.50	11.35	-	-	-	-
unknown(Mw220)	0.60	3.40	4.72	0.60	-	-

ตารางที่ 10 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของ DS4 และตัวย่อย (DS4-1 ถึง DS4-5) (ต่อ)

Components	% component					
	DS4	DS4-1	DS4-2	DS4-3	DS4-4	DS4-5
caryophylleneoxide	3.60	-	36.40	5.70	-	-
unknown(Mw220)	0.60	-	8.00	1.00	-	-
unknown(Mw220)	1.30	-	2.30	-	-	-
unknown(Mw220)	1.20	-	1.60	-	-	6.10
3,7,11-trimethyl-1,6,11-dodecatriene	0.70	-	-	1.40	-	-
unknown(Mw220)	35.60	-	-	40.10	43.60	88.60
unknown(Mw218)	1.80	-	4.00	-	-	-
2-naphthalenemethanol	14.80	-	10.20	15.00	31.60	-

ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดจากใบหนาดใหญ่โดยใช้ *Artemea salina* Leach ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่า LC_{50} ของสารสกัดไคคลอโรมีเทน เอทานอล และเมทานอล โดยทดสอบกับ กุ้งน้ำเค็ม (Brine shrimp; *Artemea salina* Leach)

สารตัวอย่าง	LC_{50} (mg/l)
$K_2Cr_2O_7$	50.12 ± 0.130
CD	891.25 ± 15.460
CE	251.19 ± 51.66
CM	100.00 ± 20.567

ผลการทดสอบการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบหนาดใหญ่ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดไคคลอโรมีเทน เอทานอล และเมทานอลจากใบหนาดใหญ่ ที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

สารตัวอย่าง	IC_{50} (mg/l) $\pm$ SD
L-ascorbic (std.)	1.244 ± 0.0594
BHT (std.)	2.278 ± 0.178
CD	101.175 ± 2.547
CE	33.654 ± 0.958
CM	36.1754 ± 1.223

ผลของการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นและรากของหนาดใหญ่แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลของการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากลำต้นและรากของหนาดใหญ่

ชื่อสาร	IC ₅₀ ±SD (µg/ml)
Vitamin C	1.1604 ± 0.0016
BHT	5.3629 ± 0.03212
HMS1	61.0753 ± 0.1608
HMS2	506.1697 ± 0.7234
CDS	353.5503 ± 0.0068
HMR	22.6728 ± 0.0017

Vitamin C = สารละลายมาตรฐานวิตามินซี

BHT = สารละลายมาตรฐานบีเอชที

ผลการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากใบหนาดใหญ่แสดงในตารางที่ 14

๕

๖

ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์แสดงดังตารางที่ 15 16 17 และ 18

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากใบหนาดใหญ่

สารตัวอย่าง	รหัส	IC ₅₀ ± SD (ppm)
สารสกัดของใบสด สกัดเย็นด้วยเฮกเซน	FC-H	inactive
สารสกัดของใบสด สกัดเย็นด้วยเฮกเซน	FC-P	inactive
สารสกัดของใบสด สกัดเย็นด้วยเพนเทน	FH-H	123.67 ± 1.86
สารสกัดของใบสด สกัดร้อนด้วยเฮกเซน	FH-P	271.29 ± 0.12
สารสกัดของใบแห้ง สกัดเย็นด้วยเฮกเซน	DC-H	80.82 ± 0.07
สารสกัดของใบแห้ง สกัดเย็นด้วยเพนเทน	DC-P	141.54 ± 0.08
สารสกัดของใบแห้ง สกัดร้อนด้วยเฮกเซน	DH-H	92.03 ± 0.03
สารสกัดของใบแห้ง สกัดร้อนด้วยเพนเทน	DH-P	160.38 ± 0.13
น้ำมันหอมระเหย ของใบสด	DS-F	inactive
น้ำมันหอมระเหย ของใบแห้ง	DS-D	inactive

ตารางที่ 15 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ด้วยวิธี Agar disc diffusion ที่ 24 ชั่วโมง

สารสกัด	ความเข้มข้น μg/ml	บริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibitionzone: mm)													
		เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ													
		S.a	B.c	E.c	En.c	S.t	K.n	Ps.a	S.a(s)	B.c(s)	E.c(s)	En.c(s)	S.t(s)	Ps.a(s)	C.a(s)
HMR	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RCMW1	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
THC	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FC- H	1.92x10 ⁴	-	-	-	6.5	-	-	-	7	-	-	-	9	-	-
DC- P	1.92x10 ⁴	6.5	-	-	6.5	-	-	-	8	-	-	-	7	-	-
DH- H	1.92x10 ⁴	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-
SWD1	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SWM	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillin disc	10 U	11	12	12	12	-	13	-	12	12	13	14	19	-	-
Chloramphenicol	30μg	22	24	24	11	27	22	26	21	23	26	7	26	23	9
Tetracycline	30μg	28	32	21	7	26	21	15	22	29	23	7	20	24	8
Gentamycin	10μg	21	22	18	7	18	14	20	20	22	15	10	14	24	8

ตารางที่ 16 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ด้วยวิธี Agar disc diffusion ที่ 48 ชั่วโมง

สารสกัด	วามเข้มข้น µg/ml	บริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibitionzone: mm)													
		เชื้อที่ใช้ในการทดสอบ													
		S.a	B.c	E.c	En.c	St	K.n	Ps.a	S.a(s)	B.c(s)	E.c(s)	En.c(s)	St(s)	Ps.a(s)	C.a(s)
HMR	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDR	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RCMW1	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
THC	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FC- H	1.92x10 ⁴	-	-	-	7	-	-	-	7	-	-	9	-	-	-
DC- P	1.92x10 ⁴	7	-	-	8	-	-	-	8	-	-	7	-	-	-
DH- H	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-
SWD1	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SWM	1.92x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillin disc	10 U	11	12	11	11	-	13	-	12	12	13	14	19	-	-
Chloramphenicol	30µg	22	22	24	11	27	22	26	19	23	24	7	20	23	9
Tetracycline	30µg	29	32	21	7	26	21	23	20	30	23	11	20	24	8
Gentamycin	10µg	20	24	18	7	18	13	20	20	22	15	8	12	20	8

ตารางที่ 17 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

สารสกัด	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ $\mu\text{g/ml}$				
	เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ				
	<i>En.c(s)</i>	<i>S.a(s)</i>	<i>B.c(s)</i>	<i>E.c(s)</i>	<i>C.a(s)</i>
DH- H	9.6×10^3	n	n	n	n
FC- H	4.8×10^3	n	n	n	n
DC- P	4.8×10^3	9.6×10^3	n	n	n
DS1	n	1.2×10^3	n	n	n
DS2	n	2.4×10^3	n	n	1.2×10^3
DS3	n	n	1.5×10^2	n	n
DS4	n	4.8×10^3	1.5×10^2	n	n
DS5	n	n	1.5×10^2	n	n
DS6	n	n	9.6×10^3	n	n

ตารางที่ 18 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

สารสกัด	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ $\mu\text{g/ml}$				
	เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ				
	<i>En.c(s)</i>	<i>S.a(s)</i>	<i>B.c(s)</i>	<i>E.c(s)</i>	<i>C.a(s)</i>
DH- H	—	n	n	n	n
FC- H	—	n	n	n	n
DC- P	9.6×10^3	—	n	n	n
DS1	n	1.2×10^3	n	n	n
DS2	n	2.4×10^3	n	n	1.2×10^3
DS3	n	n	1.5×10^2	n	n
DS4	n	9.6×10^3	1.5×10^2	n	n
DS5	n	n	1.5×10^2	n	n
DS6	n	n	9.6×10^3	n	n

ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

ผลทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ แสดงดังตารางที่ 19 ถึง ตารางที่ 23

ตารางที่ 19 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans*

สารตัวอย่าง	Antifungal	
	Activity	IC ₅₀ (μg/ml)
DS-F	Weakly active	37.68
(+) borneol	Inactive	-
(-) borneol	Inactive	-

ค่า IC₅₀ (μg/ml) > 50 Inactive, >20-50 weakly active, = 5-20 Moderately active, < 5 Strongly active

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง NCI-H187 (Human, small cell lung cancer)

สารตัวอย่าง	Antifungal	
	Activity	IC ₅₀ (μg/ml)
HMR	Inactive	-
HMS1	Inactive	-
CD	Inactive	-
LM2	Inactive	-

ตารางที่ 21 ผลการทดสอบ anti-COX-2 activity at 10⁻⁷ – 10⁻⁵ g/ml

สารตัวอย่าง	Activity against COX-2
	enzyme
	(10 ⁻⁵ g/ml)
HMR	Inactive
CD	Inactive
DS-F	Inactive
LM2	Inactive

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริมชนิดที่ปาก (Anti-Herpes simplex virus type I) และ
ผลทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero (Cytotoxicity against vero cell)
ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 50 $\mu\text{g/ml}$

สารตัวอย่าง	Cytotoxicity (IC_{50} ; $\mu\text{g/ml}$)	Anti-HSV-1	Anti-HSV-1 (IC_{50} ; $\mu\text{g/ml}$)
HMR	>50	inactive	-
FC-P	>50	active	14.9
DS-D	>50	inactive	-
CD	>50	active	12.5
LM2	>50	inactive	-

For cytotoxicity test, ellipticine is used as positive control ; $\text{IC}_{50} = 0.4 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$

For cytotoxicity test, acyclovir is used as positive control ; $\text{IC}_{50} = 1.4 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer)

แบ่งเป็นการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด ดังนี้

1. KB(Human mouth carcinoma)
2. BC (Breast cancer)

ตารางที่ 23 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer)

สารตัวอย่าง	Anti-KB		Anti-BC	
	Activity	IC_{50} ; $\mu\text{g/ml}$	Activity	IC_{50} ; $\mu\text{g/ml}$
HMR	Moduratlly active	10.56	inactive	-
HMS1	inactive	-	inactive	-
CD	inactive	-	inactive	-
LM2	inactive	-	inactive	-

Anti-cancer Breast cancer: BC

ใช้ Ellipticine เป็น positive control มีค่า $\text{IC}_{50} = 0.26 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$

Doxorubicine เป็น positive control มีค่า $\text{IC}_{50} = 0.11 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$

Anti-cancer Human mouth carcinoma: KB

ใช้ Ellipticine เป็น positive control มีค่า $IC_{50} = 0.36 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$

Doxorubicine เป็น positive control มีค่า $IC_{50} = 0.12 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การสกัดด้วยการกลั่นไอน้ำ

การกลั่นด้วยไอน้ำ (ตารางที่ 1) พบว่าการกลั่นด้วยไอน้ำของใบขนาดใหญ่ในส่วนที่เป็นใบแห้งจะให้เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าสารที่สกัดได้ด้วยการกลั่นไอน้ำของใบขนาดใหญ่ในส่วนที่เป็นใบสด เนื่องจากใบแห้งของหนาดใหญ่มีปริมาณความชื้นต่ำกว่าใบสดน้ำหนักของใบแห้งจึงน้อยกว่าใบสด ปริมาณของใบแห้งที่ใช้ในการกลั่นจึงมีปริมาณมากกว่าทำให้เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าของใบสด ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยของใบแห้งจากหนาดใหญ่คิดเป็น 0.35% และปริมาณของน้ำมันหอมระเหยของใบสดจากหนาดใหญ่คิดเป็น 0.27%

การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดเย็น

การสกัดด้วยตัวทำละลายโดยการสกัดเย็น (ตารางที่ 2) ส่วนที่เป็นใบสดพบว่าการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-อีเทอร์(1:1) จะให้ปริมาณของสารสกัด 2.29% ซึ่งสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายผสมของเพนเทน-อีเทอร์(1:1) เนื่องจากระบบของตัวทำละลายผสมที่ใช้ทั้งสองระบบความมีขั้ว (polarity) จะมีความแตกต่างกัน โดยเฮกเซนจะมีความมีขั้วมากกว่าเพนเทนทำให้การสกัดของใบสดที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบอยู่ในใบของหนาดใหญ่ ซึ่งน้ำที่เป็นส่วนประกอบนี้ก็เป็นสารที่มีขั้ว สารต่างๆที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในใบสดจึงถูกสกัดออกมาด้วยเฮกเซนได้ดีกว่าเพนเทน และการสกัดเย็นของตัวทำละลายของใบแห้งพบว่าระบบตัวทำละลายผสมของเพนเทน-อีเทอร์(1:1)จะให้ปริมาณของสารสกัด 5.83% ซึ่งสูงกว่าการใช้ระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซน-อีเทอร์ (1:1)เนื่องจากใบหนาดที่แห้งจะมีการกำจัดความชื้นออกนั่นคือปริมาณน้ำในใบหนาดก็จะมีการระเหยออกไป ทำให้องค์ประกอบต่างๆที่มีอยู่ในใบหนาดถูกแยกออกมาได้ดีด้วยตัวทำละลายผสมของเพนเทน-อีเทอร์(1:1)

การสกัดร้อน

การสกัดด้วยตัวทำละลายในการสกัดร้อน (ตารางที่ 3) ในส่วนที่เป็นใบสดพบว่าการใช้ระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) จะให้ปริมาณของสารสกัด 1.32% ซึ่งสูงกว่าการใช้ตัวทำละลายผสมของเพนเทน-อีเทอร์ (1:1) จะให้ปริมาณของสารสกัด 5.64% ซึ่งสูงกว่าการใช้ระบบตัวทำละลายผสมของเฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) การสกัดด้วยตัวทำละลายของใบหนาดใหญ่จะมีการใช้ระบบตัวทำละลายผสม ซึ่งตัวทำละลายผสมที่ใช้จะเป็นตัวทำละลายที่มีความมีขั้ว(polar) ได้แก่ เฮกเซน และเพนเทน และตัวทำละลาย

ที่ไม่มีขั้ว (non-polar) ได้แก่ อีเทอร์ การสกัดจะมีการใช้ระบบตัวทำละลายผสมเนื่องจากสารที่เป็นองค์ประกอบในใบหนาดจะเป็นสารพวก เทอร์พีน และอนุพันธ์ของเทอร์พีน ซึ่งมีทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว ความสามารถในการละลายในตัวทำละลายก็จะมีแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องมีการใช้ตัวทำละลายผสมดังกล่าวเพื่อทำการสกัดเอาองค์ประกอบทั้งมีขั้วและไม่มีขั้วออกมา โดยสารที่เป็นเทอร์พีนซึ่งเป็นสารพวกไฮโดรคาร์บอน จะถูกแยกออกมาโดยตัวทำละลายที่มีขั้ว คือ เฮกเซน และอีเทอร์ ส่วนสารที่เป็นอนุพันธ์ของเทอร์พีน (oxygenated sesquiterpene) จะถูกแยกออกมาโดยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วคือ อีเทอร์ ดังนั้นในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการสกัดทั้งสองแบบควบคู่กันไป และการสกัดด้วยตัวทำละลายนี้ยังมีการสกัดแบบเย็นและแบบร้อน เนื่องจากสารที่เป็นองค์ประกอบบางชนิดไม่สามารถละลายหรือละลายได้น้อยในตัวทำละลาย ดังนั้นจึงต้องมีการให้ความร้อนเพื่อช่วยให้การละลายของสารบางชนิดละลายในตัวทำละลายได้ดียิ่งขึ้น องค์ประกอบที่ได้จากการสกัดร้อนและสกัดเย็นจะมีความแตกต่างกัน เพราะว่าสารที่เป็นองค์ประกอบบางชนิดเมื่อถูกความร้อนจะทำให้เกิดการสลายตัว

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากหนาดใหญ่

สารบริสุทธิ์จากใบหนาดใหญ่

จาก $^1\text{H-NMR}$ spectrum พบว่า สาร ED18 คือสารประกอบไฮโดรคาร์บอน

สารประกอบ H2, IGH5 และ IGH6 เป็นสารประกอบตัวเดียวกัน และน่าจะเป็นสารประกอบอะโรมาติก ที่มีโครงสร้างสมมาตร แต่โครงสร้างที่แน่นอนยังต้องอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีอื่นๆอีก

สารบริสุทธิ์จากรากหนาดใหญ่

จากการแยกสารสกัดจากรากหนาดใหญ่ พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่มีขั้วค่อนข้างมาก หลังจากทำปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันแล้วแยกองค์ประกอบโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีจะได้สารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ สารประกอบอะซีเตต RA ซึ่งจากผลของ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ทำให้ทราบโครงสร้างคร่าวๆ ว่าโครงสร้างน่าจะประกอบไปด้วยหน่วยของน้ำตาลอย่างน้อยสองหน่วยต่อกัน และจาก FT-IR spectrum ทำให้เราทราบว่าโครงสร้างของ สารประกอบอะซีเตต RA น่าจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ

ส่วนสารประกอบอะซีเตต RB เนื่องจากแยกได้ในปริมาณน้อยและยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอที่จะวิเคราะห์โครงสร้าง

อย่างไรก็ตามการพิสูจน์โครงสร้างยังต้องมีการอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีอื่นๆ และการตรวจคุณสมบัติทางกายภาพอื่นๆอีกถึงจะสามารถวิเคราะห์โครงสร้างที่แน่นอนได้

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัด ของหนาดใหญ่

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดของหนาดใหญ่ สามารถศึกษาได้โดยการใช้เครื่อง แก๊สโครมาโตกราฟี-แมส สเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) เปรียบเทียบกับ ข้อมูลของ NIST database และค่า retention time index สารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยและ สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย มีสารที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด 61 ชนิด (ตารางที่ 5)

องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นไอน้ำของใบแห้ง (DS-D) พบว่าสาร ที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ บอร์นิอล (15.44 %) เอชูลิน (6.54 %) ซิส-คาร์โยฟีลลิน (22.01 %) ควออีออล (4.80 %) เอการ์รูสไปรอล (7.73 %) เบต้า-ยูเคสมอล (4.71 %) และ สารที่ยังไม่สามารถยืนยันโครงสร้างที่มีมวลโมเลกุล 220 (4.39 %)

องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นไอน้ำของใบสด (DS-F) พบว่า สารที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ บอร์นิอล (70.48 %) เอชูลิน (4.88 %) และ ซิส-คาร์โยฟีลลิน (11.75%)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างองค์ประกอบที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยของใบแห้งและใบสดของหนาด ใหญ่ พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นไอน้ำของใบแห้งมีปริมาณของ บอร์นิอล 15.44 % ซึ่งต่ำกว่าปริมาณของ บอร์นิอล ที่พบในน้ำมันหอมระเหยในส่วนที่เป็นใบสด โดย ปริมาณของ บอร์นิอล ที่พบในน้ำมันหอมระเหยของใบสดมีปริมาณ 70.48 % และยังพบว่าปริมาณของ ซิส-คาร์โยฟีลลิน ที่พบในน้ำมันหอมระเหยของใบแห้งมีปริมาณสูงถึง 22.01 % ขณะที่ปริมาณของซิส-คาร์ โยฟีลลิน ที่พบในน้ำมันหอมระเหยของใบสดมีปริมาณเพียง 11.75 % เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบ สารประกอบที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (oxygenated sesquiterpene) ของน้ำมันหอม ระเหยที่ได้จากการกลั่นไอน้ำของใบแห้ง ได้แก่ ควออีออล (4.80 %) เอการ์รูสไปรอล (7.73 %) และ เบต้า- ยูเคสมอล (4.71 %) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยของใบสดพบในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ที่ เป็นเช่นนั้นเพราะว่าในการกลั่นไอน้ำของใบแห้งจะมีการทำให้ใบหนาดแห้งก่อนทำการกลั่นด้วยไอน้ำ ซึ่ง ในระหว่างการทำให้ใบหนาดแห้งสารที่เป็นองค์ประกอบในใบหนาดจะมีการเปลี่ยนแปลง โดยปฏิกิริยา ออกซิเดชัน (oxidation reaction) ทำให้พบสารที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบหลายชนิดในน้ำมันหอม ระเหยที่ได้จากการกลั่นไอน้ำของใบแห้ง

ในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นไอน้ำของใบแห้งนี้ยังสามารถพบสารที่ยังไม่ทราบโครงสร้าง ที่แน่นอน (unknown 220) ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 220 จึงจัดเป็นสารพวก เซสควิเทอร์พีนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (epoxygenated sesquiterpene)

ในส่วนของสารสกัด (crude extract) ที่ได้จากการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายผสมในระบบต่างๆ พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ บอร์นียอล เอชูลิน ซิส-คาร์โยฟีลลิน ควออีออล เอการูสไปรอล เบต้า-ยูเคสมอล สารที่ยังไม่สามารถยืนยันโครงสร้างที่มีมวลโมเลกุล 222 และ สารไฮโดรคาร์บอนที่ยังไม่สามารถยืนยันโครงสร้างได้ และยังพบว่าสารสกัดที่ใช้ระบบตัวทำละลายผสมของ เฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) จะให้ปริมาณของ การบูร (camphor) ในปริมาณที่สูงกว่าสารสกัดที่ใช้ระบบตัวทำละลายอื่นๆ เพราะ การบูร (camphor) จัดเป็นสารพวกโมโนเทอร์พีน ไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นสารที่มีความมีขั้วสูง จึงทำให้สกัดออกมาได้ดีด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว โดยเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีความมีขั้วมากกว่าเพนเทน จึงสามารถสกัดเอาสารพวกเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอนออกมาได้ดีกว่าเพนเทน และในสารสกัด (crude extract) ยังพบสารที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่แน่นอน (unknown 204) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 204 ซึ่งจัดเป็นสารพวก เซสควิเทอร์พีน (sesquiterpene) สารพวกนี้ไม่สามารถพบในน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยไอน้ำ

องค์ประกอบของสารสกัด (crude extract) ยังพบสารที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่แน่นอน และเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 222 จากน้ำหนักโมเลกุลจัดเป็นสารพวกเซสควิเทอร์พีนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (oxygenated sesquiterpene)

นอกจากนั้นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย (essential oils) และสารสกัด (crude extract) ยังพบว่ามีสารที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน เช่น แอลฟา-ไพนีน แอลฟา-เทอร์พีนียอล โดยที่ แอลฟา-ไพนีน เป็นสารที่พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดร้อนของใบสด และใบแห้งโดยใช้เฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) เป็นตัวทำละลาย และ แอลฟา-เทอร์พีนียอล จะพบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดเย็นของใบสดและใบแห้ง โดยใช้เฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) เป็นตัวทำละลาย เช่นเดียวกัน องค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหย และสารสกัด มีดังนี้

บอร์นียอล เป็นสารพวกโมโนเทอร์พีนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่สามารถพบได้ทั้งในส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหย และในส่วนที่เป็นสารสกัดพบว่าปริมาณของ บอร์นียอล ที่พบนี้จะมีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระบบของตัวละลายที่ใช้ในการสกัด โดยสารสกัดที่ให้ปริมาณของ บอร์นียอล มากที่สุด คือสารสกัดจากใบแห้งที่สกัดเย็นด้วยเฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) ให้ปริมาณของ บอร์นียอล 73.81 %

ซิส-คาร์โยฟีลลิน เป็นสารประกอบเซสควิเทอร์พีนซึ่งพบทั้งในส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหยและในส่วนที่เป็นสารสกัดเช่นเดียวกับ บอร์นียอล ปริมาณที่พบ การกลั่นไอน้ำของใบแห้งพบว่ามีปริมาณสูงกว่าของใบสด โดยใบสดจะให้ปริมาณของ ซิส-คาร์โยฟีลลิน 22.01% ในส่วนของการสกัดด้วยระบบตัวทำละลายทุกระบบจะมีปริมาณ ซิส-คาร์โยฟีลลิน ใกล้เคียงกัน แต่การสกัดด้วยตัวทำละลายจะให้ปริมาณ ซิส-คาร์โยฟีลลิน น้อยกว่าส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหย

เอชูลิน

เป็นสารประกอบ อะโรมาติก พบทั้งในส่วนของน้ำมันหอมระเหยและในส่วนของสารสกัด ปริมาณที่พบนั้นจะมีปริมาณแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดและระบบตัวทำละลาย โดยสารที่สกัดได้โดยการสกัดร้อนเพนเทน-อีเทอร์ (1:1) จะมีปริมาณของ เอชูลิน มากที่สุด 7.32%

เอการูรูไปรอด เป็นสารพวกเซสควิเทอร์พีนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ พบเฉพาะในส่วนน้ำมันหอมระเหยของใบแห้งซึ่งมีปริมาณ 7.73% และพบเล็กน้อยในสารสกัดที่ได้จากการสกัดเย็นด้วยเพนเทน-อีเทอร์ (1:1) ของใบแห้ง

ควออีออล เป็นสารพวกเซสควิเทอร์พีนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ พบในส่วนของน้ำมันหอมระเหยของใบแห้งมีปริมาณมากที่สุด 4.80% และพบเพียงเล็กน้อยในส่วนของน้ำมันหอมระเหยของใบสด สารสกัดที่ได้จากการสกัดเย็นด้วยเฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) ของใบสด และสารสกัดที่ได้จากการสกัดร้อนด้วยเพนเทน-อีเทอร์ (1:1) ของใบสด

เบต้า - ยูเคสมอล เป็นสารพวกเซสควิเทอร์พีนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ พบเฉพาะในส่วนน้ำมันหอมระเหยของใบสด และใบแห้ง ในส่วนน้ำมันหอมระเหยของใบแห้งมีปริมาณ เบต้า-ยูเคสมอล 4.71% ซึ่งสูงกว่าของใบสด

แคมฟอร์ หรือการบูร ในน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำทั้งใบสดและใบแห้งจะพบในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ในสารสกัดที่ได้จากใบสดและใบแห้งที่ใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) ทั้งสกัดเย็นและสกัดร้อนจะให้ปริมาณสูงกว่าการใช้ระบบตัวทำละลายอื่นๆ โดยสารสกัดที่ได้จากการสกัดเย็นด้วยตัวทำละลายเฮกเซน-อีเทอร์ (1:1) มี แคมฟอร์ 14.00%

บรรณานุกรม

1. Fujimoto Y, Agusutein S, Mmade S. Blumealactones A, B, and C from *Blumea balsamifera* and their use as antitumor agents. Patent: Japan Kokai Tokkyo Koho 62 87, 589, 1987:7 pp.
2. Fujimoto Y, Agusutein S, Mmade S. Blumealactones A, B, and C from *Blumea balsamifera* and their use as antitumor agents. Patent: Japan Kokai Tokkyo Koho 62 87, 589, 1987:7 pp.
3. Fujimoto Y, Soemartono A, Sumatra M. Sesquiterpenelactones from *Blumea balsamifera*. *Phytochemistry* 1988; 27(4): 1109-11.
4. Ruangrunsi N, Tantivatana P, Tappayuthpijarn P, Borris RP, Cordell GA. Traditional medicinal plants of Thailand. VI. Isolation of cryptomeridiol from *Blumea balsamifera*. *J Sci Soc Thailand* 1985; 11(1): 47-50.
5. Tappayuthpijarn P. Phytochemical study of *Blumea balsamifera*. MS Thesis, Chulalongkorn Univ 1981:150 pp.
6. Tappayuthpijarn P, Ruangrunsi N, Tantivatana P, Two new flavonoids from *Blumea balsamifera*. Abstr First Conference of the Faculty of Pharmacy Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, November 23, 1983.
7. Barua NC, Sharma RP. (2R, 3R)-7,5'-dimethoxy-3, 5, 2'-trihydroxyflavanone from *Blumea balsamifera*. *Phytochemistry* 1992; 31(11):4040.
8. Deng QY, Ding CM, Zhang WH, Lin YC. Studies on the flavonoid constituents in *Blumea balsamifera*. *Bopuxue Zazhi* 1996; 13(5): 447-52.
9. Lin YC, Long KH. Studies on the chemical constituents of the Chinese medicinal plant *Blumea balsamifera*. *Chung-Shan da Hsueh Hsueh Pao, Tsi-ran K'O Hsueh Pan* 1998; 2: 77-80.
10. Ruangrunsi N, Tappayuthpijarn P, Tantivatana P, Borris RP, Cordell GA. 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* (Compositae). *J Nat Prod* 1981; 44: 541-5.

11. Tappayuthpijarn P, Ruangrunsi N, Tantivatana P, Borris RP, Cordell GA.
Calpurmenin and its 13 α -(2'-pyrrolicarboxylic acid) ester. Abstr Joint Meeting
American Society of Pharmacognosy and Society for Economic Botany, Boston
July 13-17, 1981: 64.
12. Chopra, R. N., Nayar, S. L., Chopra, J. C. (1956) Glossary of Indian Medicinal
Plants, pp. 38, CSIR, India.
13. Kirtikar, K. R., Basu, B. D. (1933) The Indian Medicinal Plants, 2nd edition, Vol.
2, pp. 1341.
14. Lalit Mohan Basu, M. B. Allahabad Perry, L. M. (1980) Medicinal Plants of East
And Southeast Asia, pp. 88, MIT Press, England.
15. Bohlmann, F., Zdero, C. (1969) Tetrahedron Letters 2, 69-71.
16. Pal, R., Moitra, S. K., Chakravarti, N. N., Adhya, R. N. (1972) Phytochemistry 11,
1855-1858.
17. Rao, C. B., Rao, T.N., Muralikrishna, B. (1977) Planta Med. 31, 235-237.
18. Rashmi, A., Rahul, S., Siddiqui, I. R., Singh, J. (1995) Phytochemistry 38, 935-
938.
19. Baslas, K. K., Deshpande, S. S. (1950) J. Indian Chem. Soc. 27, 25-27.