



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 และประเทศจีนได้ใช้ในตำรับยา 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

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

ในการวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นศักยภาพในการพัฒนาพืชชนิดนี้ให้เป็นพืชเศรษฐกิจ ในการนำมาใช้ทั้งในทางการแพทย์ การใช้สมุนไพรเพื่อสุขภาพ ตลอดจนการใช้สมุนไพรสำหรับการเลี้ยงสัตว์ในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะต่อไป

ในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้มุ่งที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบที่ระเหยได้ (volatile component) จากใบของหนาดใหญ่และใบหนาดวัว 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 เนื่องจากขนาดว้าวเป็นพืชล้มลุกที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 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* และเมื่อเร็วๆนี้ (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 ที่ยังไม่มีส่วนผสมกับสารสกัด

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 มิลลิลิตร เติมน้ำอาหาร Trypticase Soy Broth สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร Sabouraud Dextrose Broth สำหรับยีสต์ ที่มีปริมาตร 4 มิลลิลิตร 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

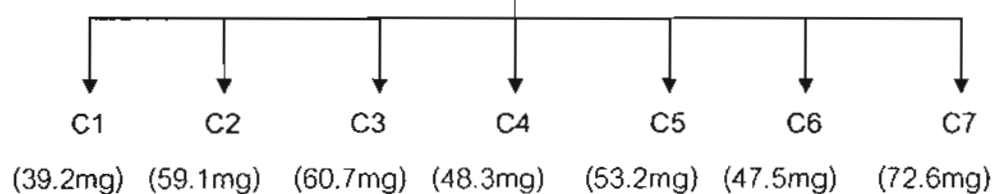
สารสกัดไดคัลโลโรมีเทน SWD2 (400 mg)

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



สารสกัดไคทอลโรมีเทน 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)

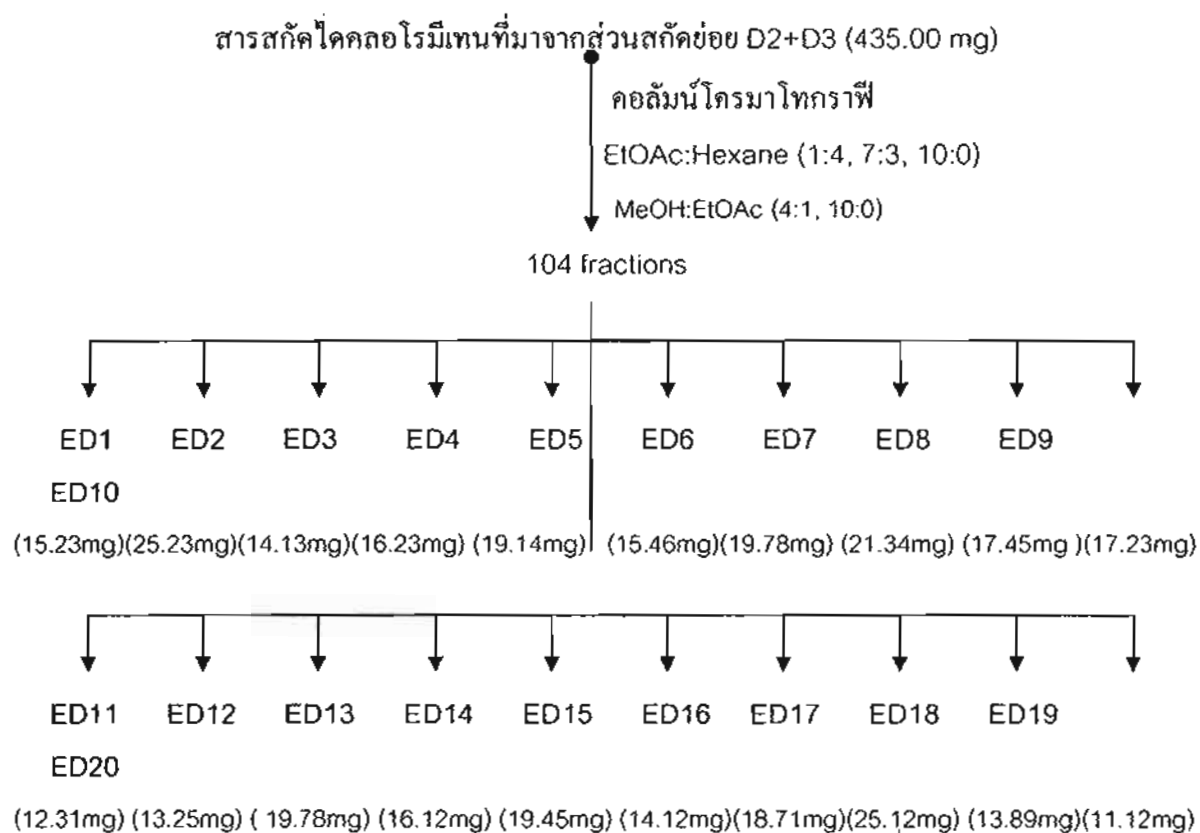
194 fractions



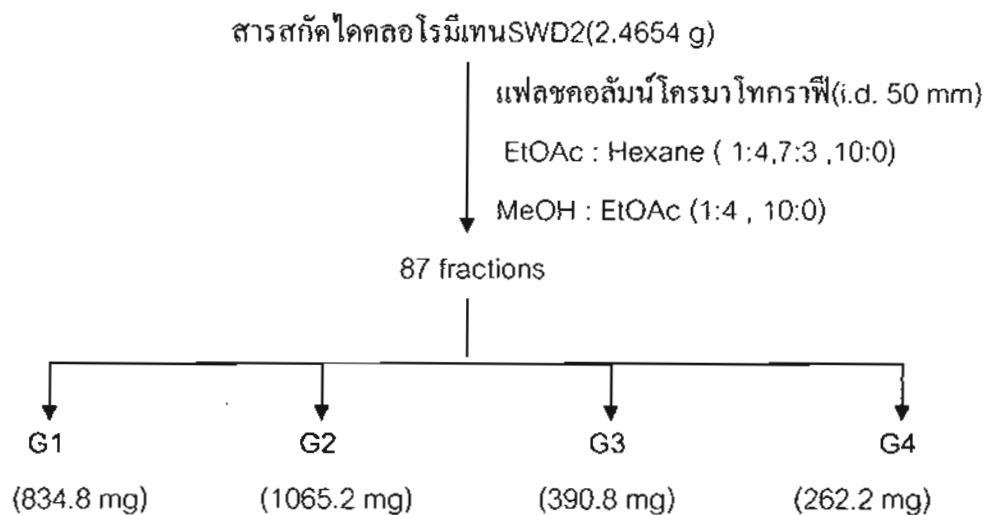
D1.....D10

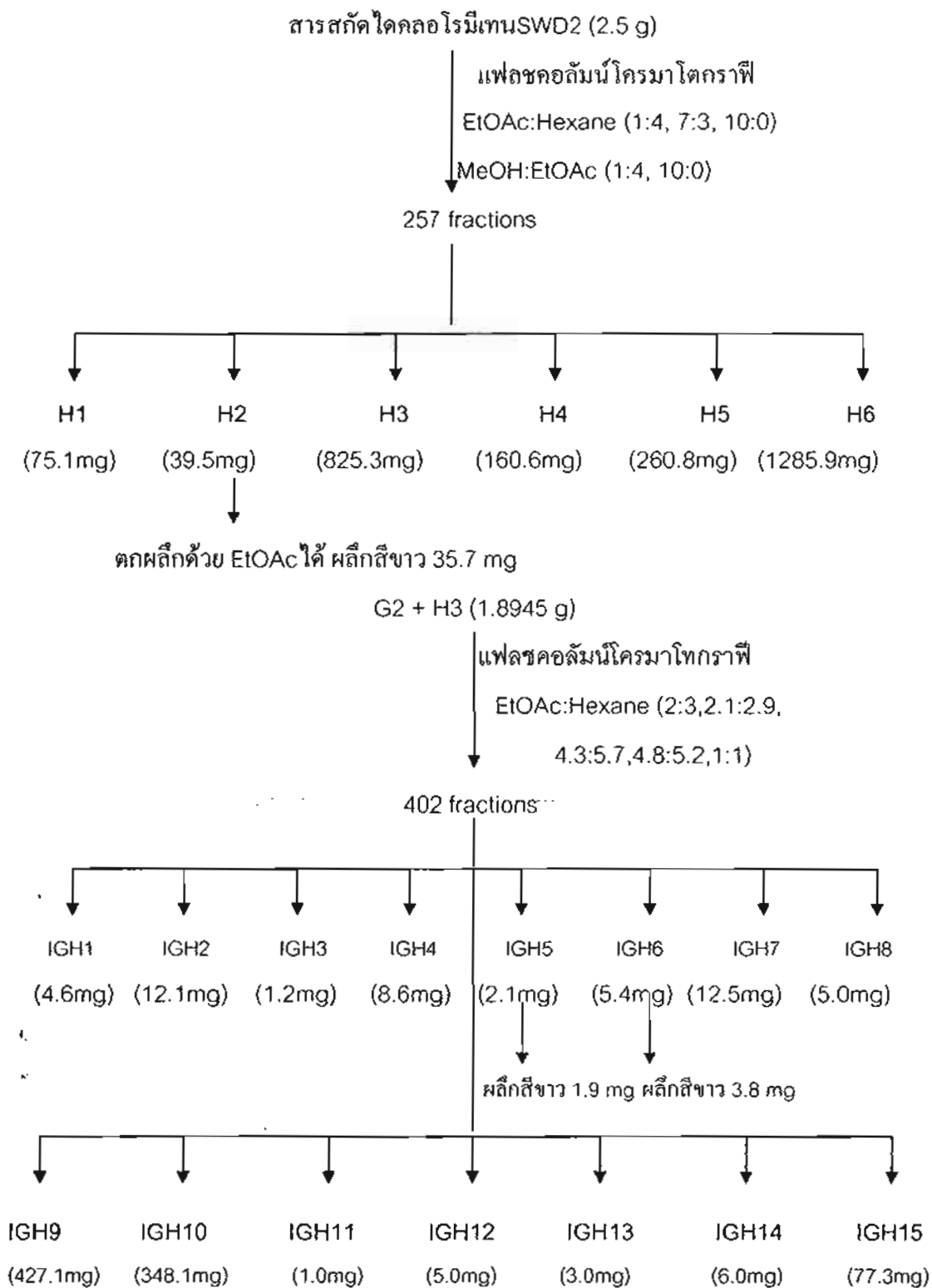
ตารางที่ 6 ปริมาณของส่วนสกัดที่ได้จากการแยกสารสกัดไคทอลโรมีเทน (SWD₂) 2.2889 กรัม

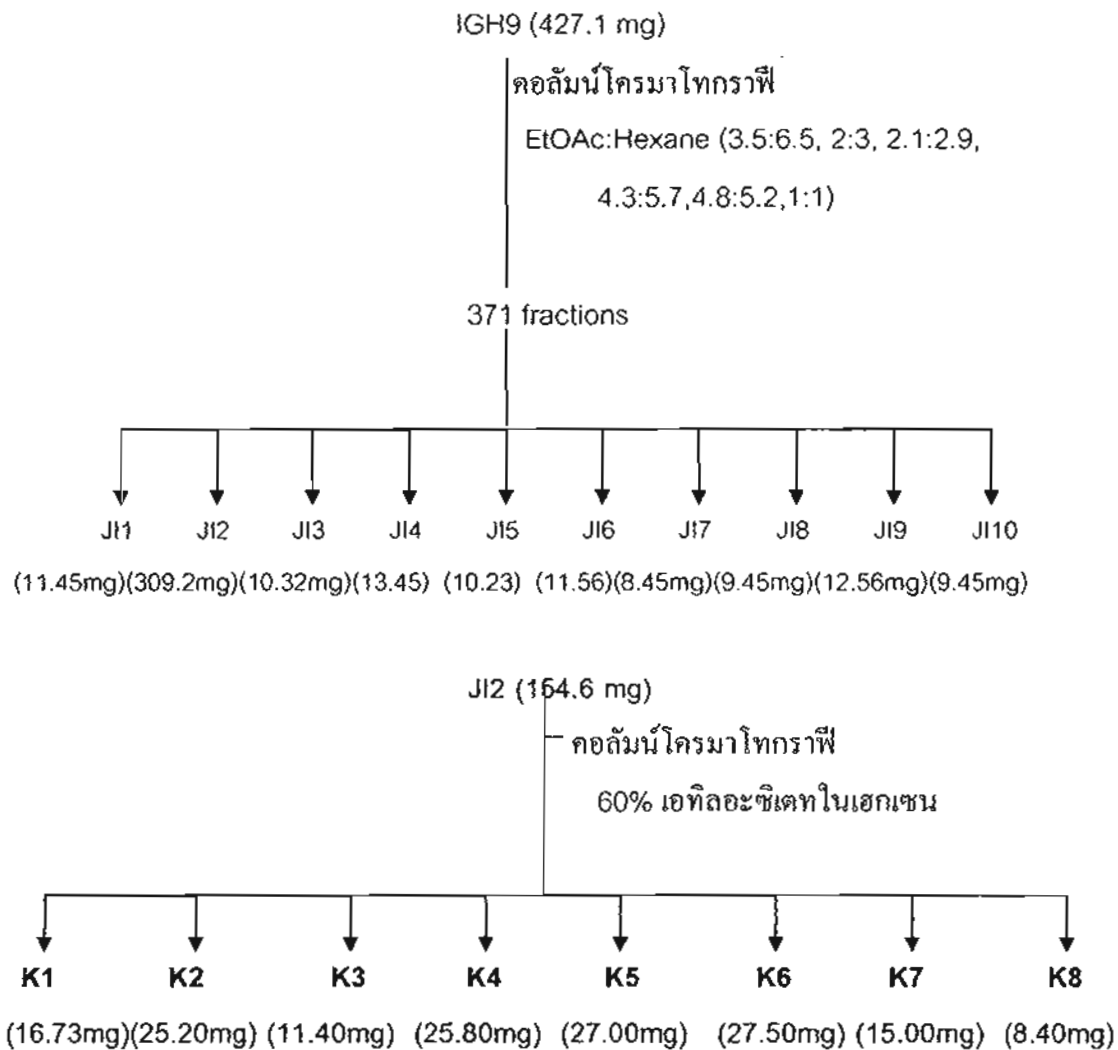
ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
D1	123.1
D2	211.5
D3	144.2
D4	250.5
D5	320.3
D6	153.1
D7	407.2
D8	60.7
D9	459.7
D10	92.3
D11	83.1



ตะกอนสีขาว 8.4 mg





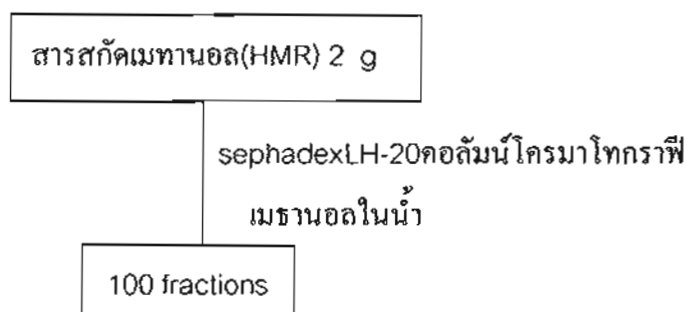


2. ส่วนลำต้น

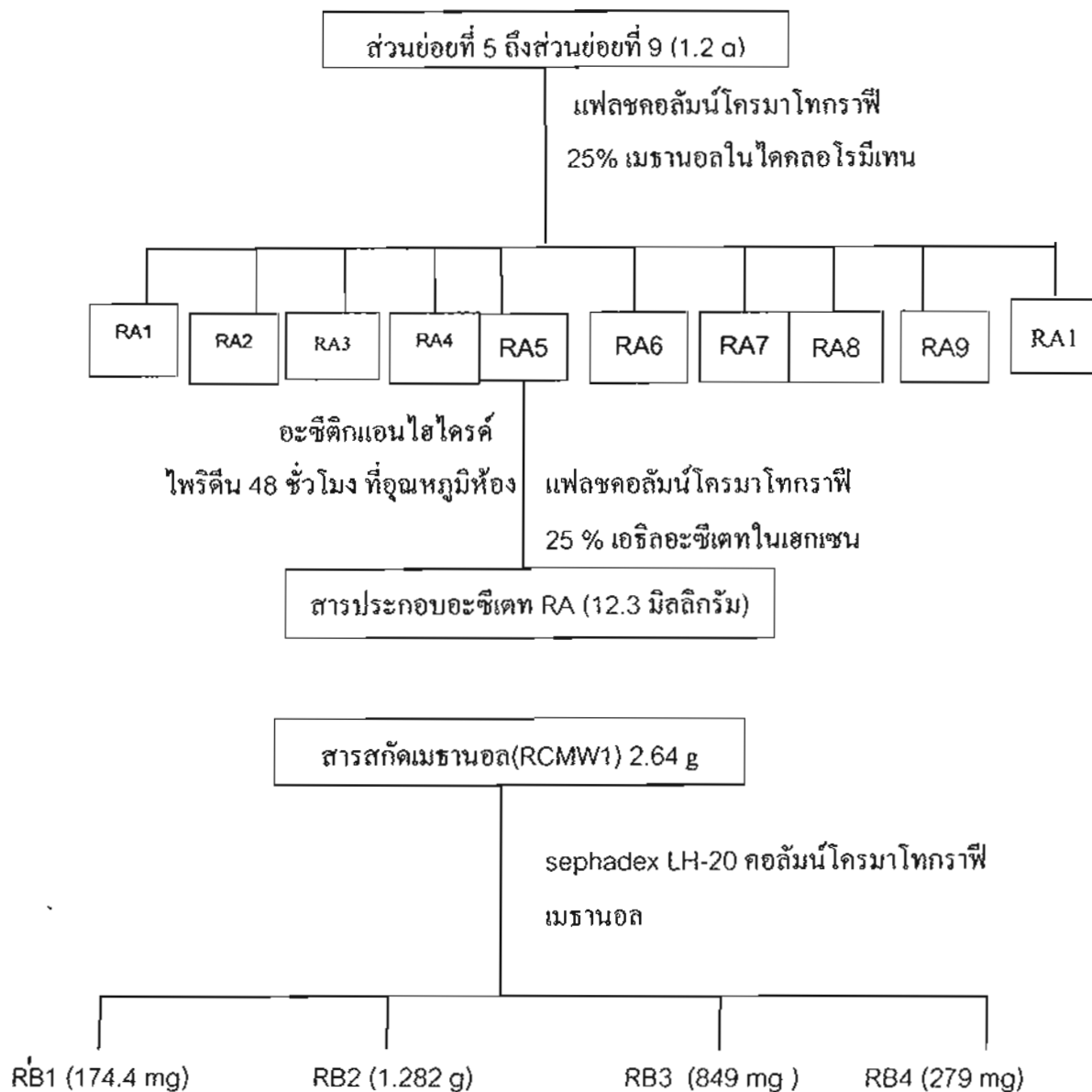
จากการตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดจากลำต้นของหนาดใหญ่ด้วย TLC พบว่ามีลักษณะและองค์ประกอบเหมือนกันกับในส่วนของใบ

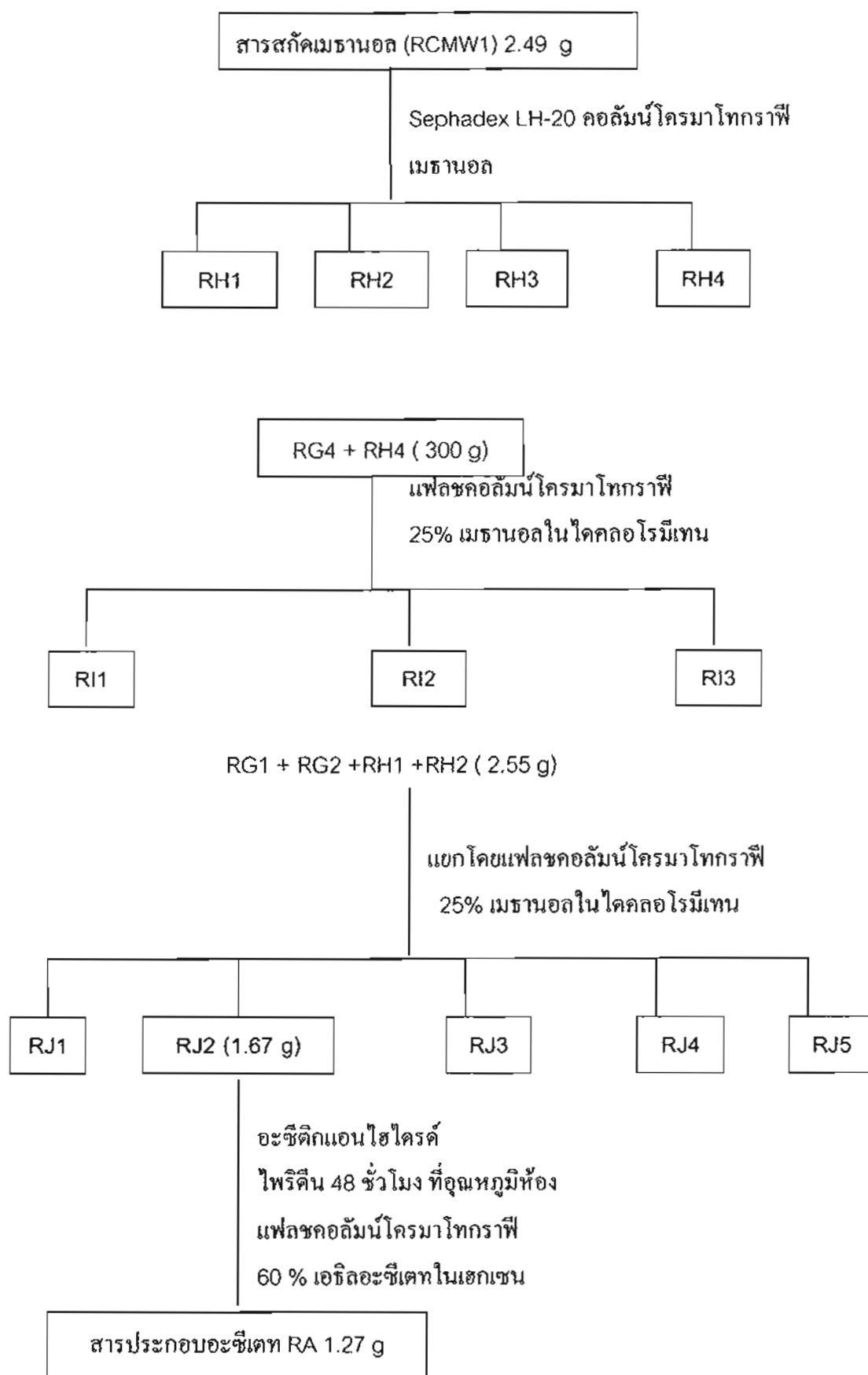
3. ส่วนราก

ได้ทำการแยกสารสกัดจากรากของหนาดใหญ่นี้



100 fractions





ผลการสกัดและการแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบหนาดใหญ่

สารสกัดเฮกเซน (THC) 53 g

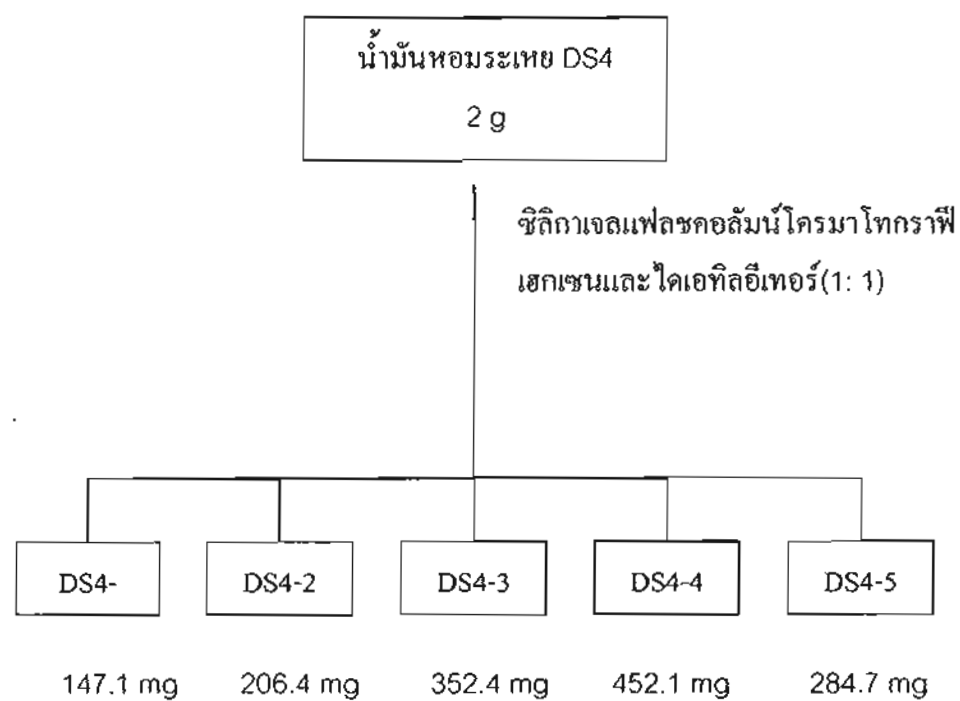


กลั่นไอน้ำโดยใช้
Clevenger type apparatus

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

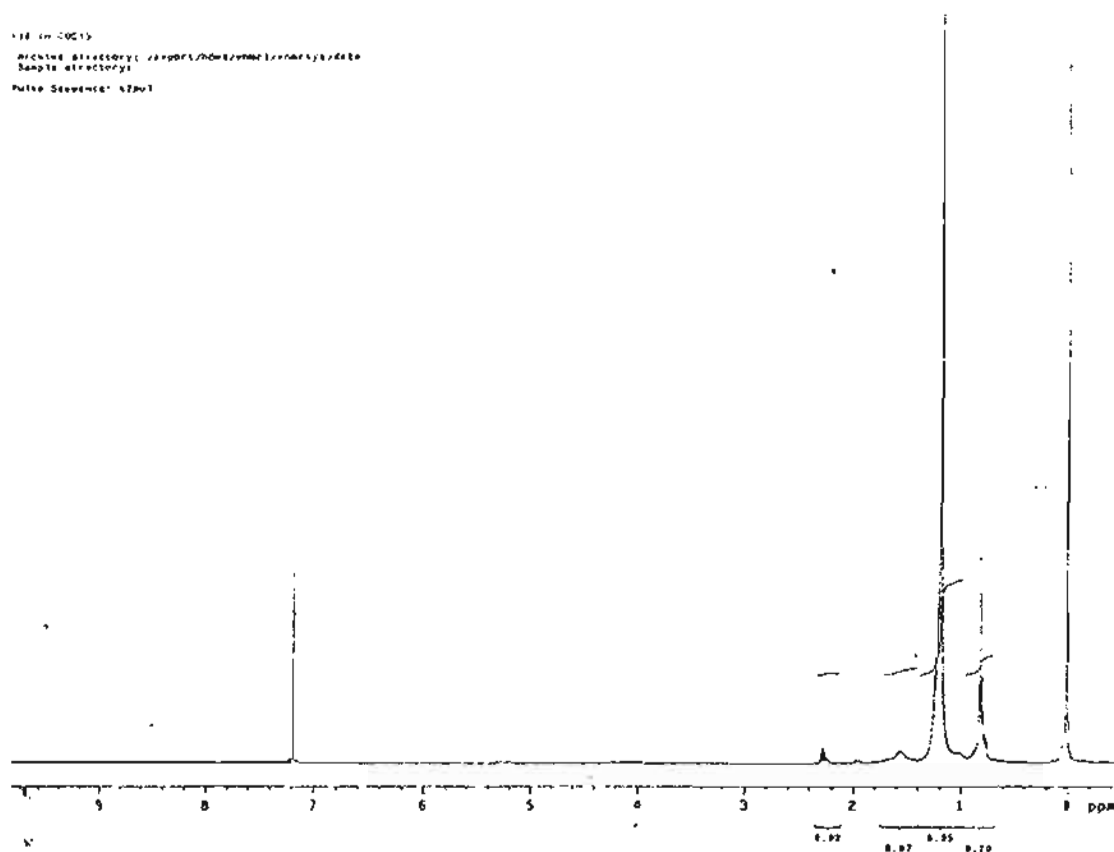


ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์

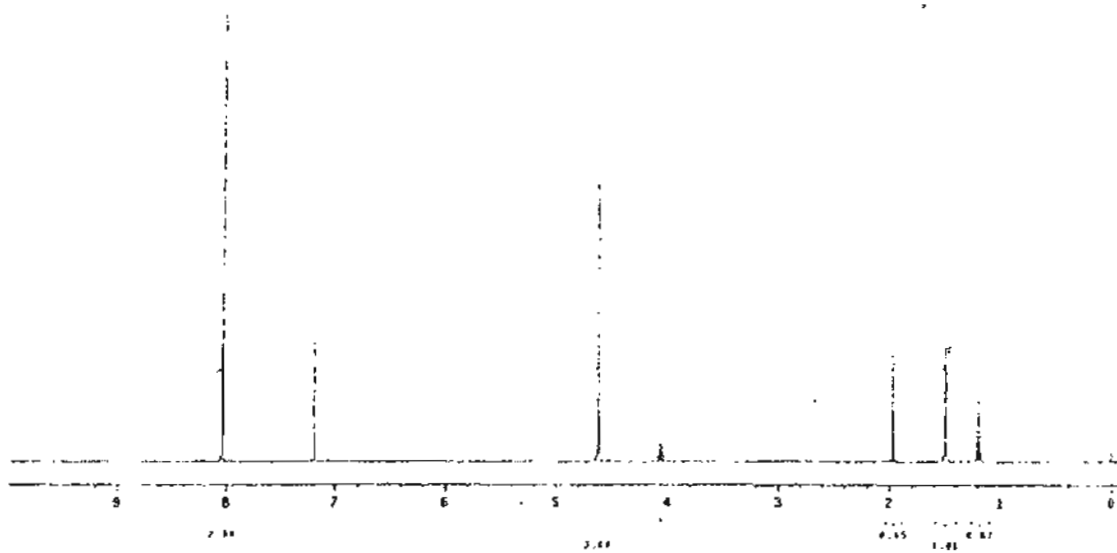
ได้นำสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยกจากสารสกัดจากหนาดใหญ่ไปตรวจวัดด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีได้ผลดังแสดงสเปกตรา ในรูปที่ 1 ถึง 8

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

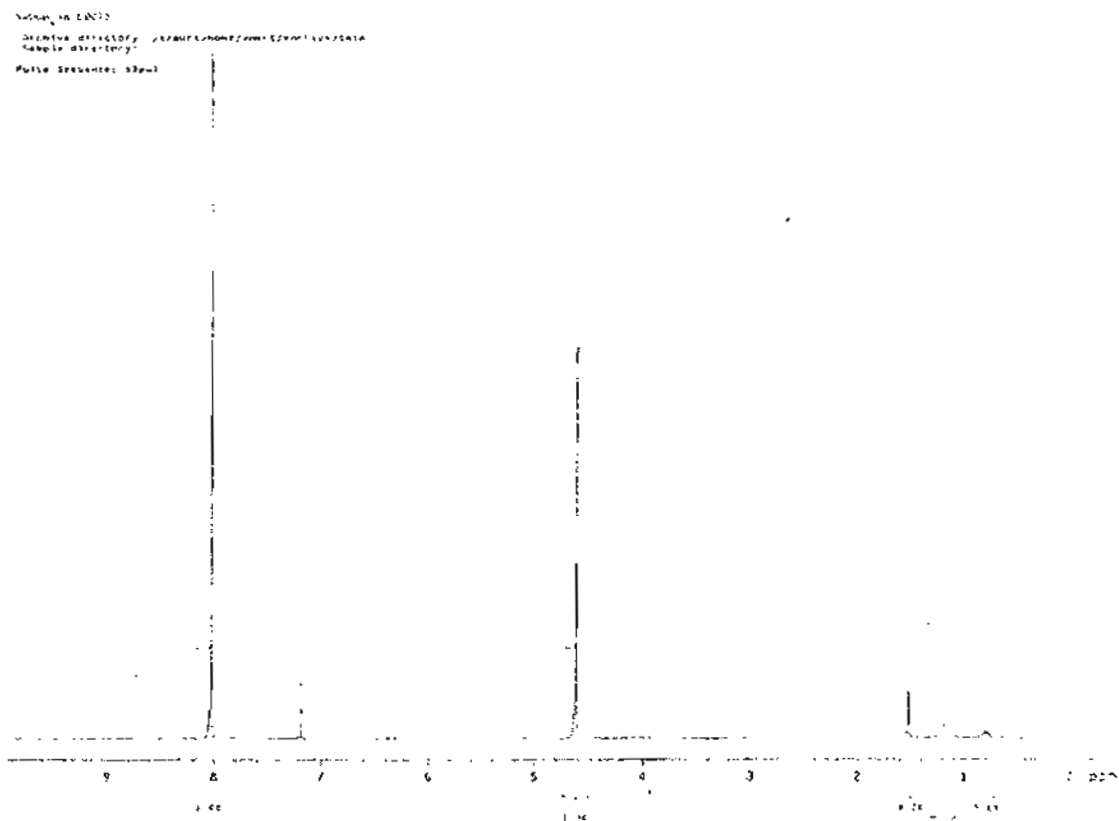


รูปที่ 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ ED18

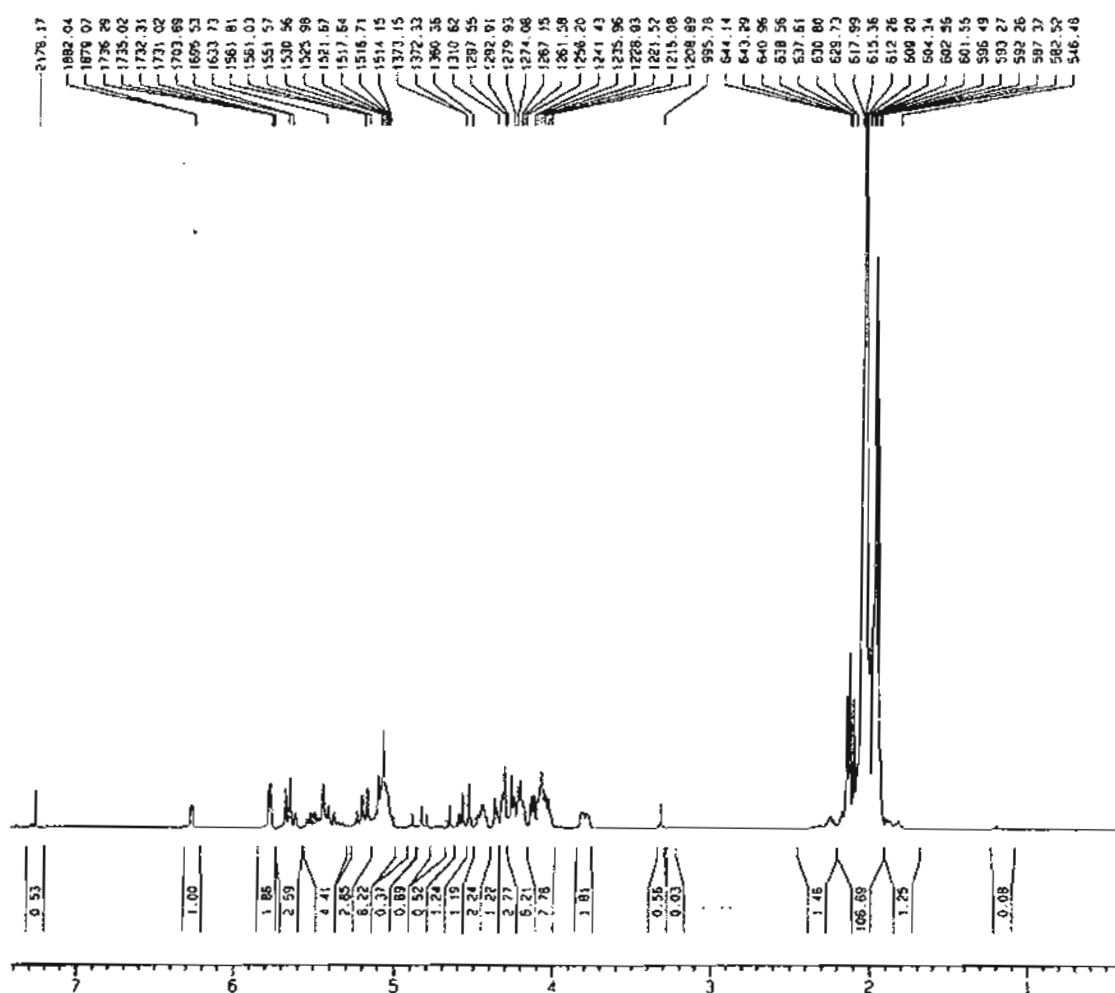
500MHz in CDCl₃
 Acquire date: 2008/08/08 13:00:00
 Sample: 10000000000000000000
 File: 10000000000000000000
 Pulse sequence: zgpg30



รูปที่ 2 ¹H-NMR spectrum ของ H2



รูปที่ 3 ^1H -NMR spectrum ของ IGH5



รูปที่ 6 ^1H -NMR spectrum ของ สารประกอบอะซีเตต RA