รายงานการวิจัย

เรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบมันขี้หนู

Chemical Constituents and Biological Activities of *Coleus parvifolius* Benth. Leaves Extract

โดย

สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์

สุภิญญา ติ๋วตระกูล

KMC
เลขหมู่ QK495.L25 ส73 2542 ฉ.1
Bib Key 219564

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ประจำปี 2541

บทคัดย่อ

การแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบมันขี้หนูและวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS พบว่าส่วนประกอบสำคัญ คือ trans-phytol, eicosatrienoate, α-humulene และ germacrene D ส่วนสารสกัดด้วย alcohol พบว่ามีสารกลุ่ม terpenoid และ condensed tannin การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี brine shrimp lethality test พบว่าสารสกัดไม่มีผลต่อ brine shrimp (LD_{50}>1000 μg/ml) สารสกัดมีฤทธิ์เป็น antioxidant ด้วยวิธี DPPH assay ดีกว่า BHT 3 เท่า ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อพบว่า สารสกัดหยาบมีผลต่อเชื้อแกรมบวก ที่ 10 mg/disc มีผลต่อเชื้อแกรมลบที่ 100 mg/disc แต่ไม่มีผลต่อเชื้อรา

Abstract

Constituents of the leaves volatile oil of *Coleus parvifolius* were studied using GC-MS. The main components were trans-phytol, eicosatrienoate, α-humulene and germacrane D. Crude alcoholic extract possed terpenoid compound and condensed tannin. Biological activities screening on brine shrimp lethality test showed no effect against brine shrimp (LD_{50}>1000 μg/ml) Crude extract have revealed antioxidant activity using DPPH assay 3 times better than BHT. Moreover, its exhibited antimicrobial activity against gram positive bacteria at 10 mg/disc and gram negative bacteria at 100 mg/disc but showed no activity against *Candida albicans*.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ	II
Abstract	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญภาพ	VI
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	4
การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหย	4
การสกัดสารจากใบมันขี้หนู	5
การทดสอบกลุ่มสาร	5
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	6
Brine Shrimp Lethality test	6
Antioxidant	6
Antimicrobial activity	7
การแยกสารโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี	8
บทที่ 3 ผลการทดลอง	9
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผล	14
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก	16

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบมันขี้หนู 15

ตารางที่2 แสดงฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ของสารสกัดจากใบมันขี้หนู 18

ตารางที่3 แสดงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัด 19

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดง GC Chromatogram of *Coleus parvifolius*	10
ภาพที่ 2 แสดงMass spectra of α-humulene	10
ภาพที่ 3 แสดงMass spectra of Germacrene D	10
ภาพที่ 4 แสดงMass spectra of trans-phytol	11
ภาพที่ 5 แสดงMass spectra of eicosatrienoate	11

บทที่ 1
บทนำ

มันขี้หนู มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Coleus parvifolius* Benth. (Synonym *C. tuberosus* Benth.) วงศ์ Labiatae เป็นพืชพื้นเมืองที่ปลูกในภาคใต้ของประเทศไทย ส่วนหัวใช้เป็นอาหาร ทั้งแกงส้ม แกงไตปลา แกงกะทิต่างๆ ดลอดจนต้มใส่เกลือกินเล่น มันขี้หนูเป็นพืชที่มีราคาดี ปลูกและดูแลรักษาง่าย โรคและแมลงน้อย ให้ผลผลิต 2-3 ตันต่อไร่ ถึงแม้ว่าเป็นพืชที่มีหัวขนาดเล็กก็ตาม ระยะเวลาเริ่มปลูกถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 6-8 เดือน เก็บเกี่ยวเมื่อต้นเริ่มแห้งตายจะเก็บรักษาไว้ได้นาน 1 เดือนโดยน้ำหนักลดลงเพียงเล็กน้อย หัวมันขี้หนูเมื่อต้มสุกจะไม่เละถึงแม้จะต้มนานและต้มหลายครั้ง

ในหัวมีแป้งมาก หมอพื้นบ้านใช้หัวแก้โรคบวมที่เกิดจากพิษลมเลือดต่างๆ ในต่างประเทศมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับพืชในสกุล *Coleus* หลาย species ซึ่งสารสำคัญจะอยู่ในส่วนของใบและน้ำมันหอมระเหย ใบมันขี้หนูมีกลิ่นหอมเล็กน้อย เมื่อนำส่วนใบมาตัดเนื้อเยื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีน้ำมันหอมระเหยอยู่ จึงคิดว่าจะนำส่วนใบมาศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอม พร้อมทั้งนำใบมาสกัดด้วยแอลกอฮอล์ แยกสารด้วยตัวทำละลายต่างๆและนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำผลที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำพืชนี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

โครงการวิจัยที่เกี่ยวข้อง [5,10,11]

พืชสกุล *Coleus* ที่มีรายงานในหนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย คือ

Coleus amboinicus Lour. เนียมหูเสือ
C. atropurpureus Benth. ฤาษีผสม
C. blumei Benth. ว่านเลือดแห้ง
C parvifolius Benth. มันขี้หนู
(*C. tuberosus* Benth.)

มีรายงานการใช้พืชในสกุล เดียวกับมันขี้หนูในทางยาคือ

เนียมหูเสือ ใบใช้ต้มกินแก้ทางเดินปัสสาวะอักเสบ ขับลม แก้ปวดท้อง กินหลังคลอดช่วยขับน้ำคาวปลา ใบทาแก้แมลงสัตว์กัดต่อย แก้คัน

ฤาษีผสม ต้นและใบต้มน้ำกินเป็นยาช่วยย่อย แก้คลื่นไส้อาเจียน แก้ปวดท้อง ดับอักเสบที่มีอาการบวมที่มือและเท้า

ว่านเลือดแห้ง ใบมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

พืชสกุล *Coleus* ชนิดอื่นๆที่มีรายงานการใช้ประโยชน์ทางยา เช่น *Coleus bartatus* , *C. scutellarioides* ใบทำให้แท้ง *C. kilimandochari, C. hybridus* ใบมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ เป็นต้น

สารประกอบทางเคมีที่มีรายงาน พบว่า

Coleus aromaticus ในใบมีน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วย carvacrol, caryophyllene, sesquiterpene, eugenol

C. bartatus พบน้ำมันที่มีองค์ประกอบเป็น borneol และในใบพบสารในกลุ่ม diterpene

C. forskolin พบสารในกลุ่ม sesquiterpene ซึ่งมีรายงานวิจัยว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต

C. bluemei ในใบมีสารกลุ่ม steroid, triterpene และ flavonoid

C. scutellarioides ในใบมีสารกลุ่ม diterpene

จากการศึกษาปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่างๆในวงศ์ Labiatae[1] พบว่ามีปริมาณดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย	%น้ำมันหอมระเหย (น้ำหนักสด)
1. *Coleus amboinicus* Lour.	เนียมหูเสือ	0.08
2. *Hyptis suaveolens* Poit	แมงลักคา	0.12
3. *Mentha arvensis* Linn. var. piperascens Malinvaud	สะระแหน่ญี่ปุ่น	0.90
4. *M. cordifolia* Opiz.	สะระแหน่	0.01
5. *Ocimum basilicum* Linn.	โหระพา	0.05
6. *O. gratissimum* Linn.	โหระพาช้าง	0.34
7. *O. sanctum* Linn.	กะเพรา	0.03
8. *O. canum* Linn.	แมงลัก	0.16
9. *Perilla frutescens* Britt	งาขี้ม้อน	0.10
10. *Pogostemon cablin* Benth	พิมเสน	0.30

จากการที่ได้ศึกษาเบื้องต้น (screening test) พบว่าสารสกัดจากใบมันขี้หนู มีสารกลุ่ม steroid สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ antioxidant และมีฤทธิ์ต่อหนอนใยผัก แต่ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพืชชนิดนี้มีน้อยมาก ยังไม่มีข้อมูลทางด้านองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นจึงควรมีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบมันขี้หนู
2. ศึกษาองค์ประกอบเคมีของสารสกัดและน้ำมันหอมในใบมันขี้หนู

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบกลุ่มสารและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบมันขี้หนู
2. ได้ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดและในน้ำมันหอมระเหย
3. เป็นข้อมูลในการนำพืชนี้มาใช้ประโยชน์ต่อไป

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบมันขี้หนูจาก อำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา น้ำหนักสด 50 กิโลกรัม นำมาล้างให้สะอาด

การกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากใบมันขี้หนู

1. ใช้ใบมันขี้หนูสด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ครั้งละ 2 กิโลกรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 2 ลิตร เติมน้ำเล็กน้อย
2. กลั่นด้วยวิธี steam distillation โดยใช้ distillation apparatus เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. น้ำมันที่กลั่นได้จะระเหยออกมาพร้อมกับไอน้ำ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนแยกชั้น
4. นำน้ำมันหอมระเหยที่แยกได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS เพื่อหาองค์ประกอบเคมี

น้ำมันหอมระเหยที่ได้มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นเฉพาะ น้ำหนัก 30 มิลลิกรัม

การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหย ด้วยเครื่อง GC-MS

น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

HP 5890 Series II Plus Gas Chromatography

HP 5972 Series Mass Selective Detector

(Hewlett-Packard)

โดยมี สภาวะการทดลองของ Gas Chromatograph ดังนี้

Column : HP 5 MS 30 M x 0.25 mm x 0.25 μM

inlet temp : 250 °C

detector temp : 280° C

flow rate : 1 ml/min

oven temp : initial temp 80°C 2 min

Split ratio : 20 :1

ramp 15 °C/min

injection mode : split

final temp 280 ° C 15 min

inject volumn : 1 μl

Mass Spectrometer : EI mode

Mass range : 25-650 amu

scan rate : 1.23 scans/sec

การสกัดสารจากใบมันขี้หนู

1. นำใบมันขี้หนูหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ 10 กิโลกรัม แช่สกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์
2. กรองสารละลายชั้นเอธิลแอลกอฮอล์ มาระเหยภายใต้ความดันจนเข้มข้น
3. กากที่เหลือแช่ซ้ำ 2 ครั้ง
4. จะได้สารสกัดหยาบ นำมาทดสอบหากลุ่มสารต่างๆและฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบกลุ่มสาร

กลุ่ม Alkaloid

นำสารสกัด 5 กรัม มาเติม 5% HCl 10 ml แล้วแบ่งมาทดสอบโดยดูการเกิดตะกอนกับ alkaloidal reagent ดังต่อไปนี้

- Dragendorff 's reagent ถ้ามี alkaloid จะได้ตะกอนสีส้ม
- Marme 's reagent ถ้ามี alkaloid จะได้ตะกอนสีขาว
- Mayer 's reagent ถ้ามี alkaloid จะได้ตะกอนสีขาว
- Hager 's reagent ถ้ามี alkaloid จะได้ตะกอนสีเหลือง
- Kraut 's reagent ถ้ามี alkaloid จะได้ตะกอนสีน้ำตาลแดง

กลุ่ม Terpenoid

นำสารสกัด 5 กรัม มาเติม 10% H_2SO_4 อุ่นใน water bath เติม $CHCl_3$ เพื่อสกัดสารพวก terpenoid ดูดชั้น $CHCl_3$ มาใส่ evaporating dish ระเหยจนแห้ง เติม acetic anhydride และค่อยๆเติม conc. H_2SO_4 ลงไป

กลุ่ม Flavonoid

นำสารสกัด 2 กรัม มาเติม conc. HCl

เติม Magnesium ribbon ที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ลงไป

ถ้ามีกลุ่ม flavonoid จะได้สารละลายสีแดง

กลุ่ม Tannin

นำสารสกัด 2 กรัม มาละลายน้ำ จะได้สารละลายสีเหลืองน้ำตาล แบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 เติม 10% $FeCl_3$ ลงไป 2 หยด ดูสีที่เกิดขึ้น

ส่วนที่ 2 เติม bromine water 2 ml

กลุ่ม Lactone

นำสารสกัด 5 กรัมมาเติม 10% Lead acetate 10 ml อุ่น 5 นาที กรอง สารละลายที่ กรองได้ นำมาเติม $CHCl_3$ ดูดชั้น $CHCl_3$ มาระเหยให้เหลือปริมาณน้อย ๆ ในถ้วยกระเบื้องนำมาทดสอบด้วย Kedde's reagent (2% 3, 5 -dinitrobenzoic acid ใน MeOH) และเติมสารละลาย 5% KOH ใน alcohol 1-2 หยด ถ้ามี unsaturated lactone ring จะเกิดสีม่วงแดงทันที

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด[2]

1. Brine shrimp lethality test[6,7]

เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) หรือเรียกว่า Brine shrimp โดยละลายสารสกัดในน้ำทะเลให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น นำมาทดสอบกับไรน้ำเค็มที่ฟักออกจากไข่หลังจากนำมาเพาะเป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง โดยนำสัตว์ทดลองใส่ใน Microwell plate หลุมละ 10 ตัว ใส่สารทดสอบความเข้มข้นละ 3 หลุม ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ดูผลของความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย นำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติโดยใช้ Finney probit analysis เพื่อหาค่า LC_{50}

1. เพาะไข่ Brine shrimp (*Artemia salina*) ในน้ำทะเลก่อนการทดลอง 36 - 48 ชั่วโมง
2. เตรียมสารสกัดหยาบในน้ำทะเลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในการทดลองเป็น 1000, 500, 100 , 50, 10 µg/ml
3. ดูดไรน้ำเค็มที่เพาะไว้ด้วย pipette จำนวน 10 - 15 ตัว ในน้ำทะเลปริมาตร 100 µl ใส่ใน 96 microwell - plate
4. ดูดสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ 100 µl ใส่ในแต่ละหลุม
5. ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง
6. ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
7. นับจำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย/จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละหลุม
8. นำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติโดยใช้ โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Finney Probit analysis เพื่อหาค่า LC_{50}

2. Antioxidant[9]

Antioxidant เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ของสารสกัด ละลายใน absolute alcohol ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ใช้แต่ละความเข้มข้นซ้ำ 3 ครั้ง ผสม

กับ $6x10^{-5}$ M DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) ที่ละลายใน absolute alcohol ปริมาตรเท่ากับสารสกัด ทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่า absorbance ที่ 520 nm โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ BHT (Butylated hydroxytoluene) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า scavenging activity

1. เตรียม DPPH (1, 1 - Diphenyl -2 -picry lhydrazyl) ความเข้มข้น $6x10^{-5}$ M ใน absolute alcohol
2. เตรียมสารสกัดหยาบให้มีความเข้มข้น 200 µg/ml เป็น stock solution
3. ดูดสารละลายจากข้อ 2 มาเตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในการทดลองเป็น 100,75,50,25,10,5, และ µg /ml
4. เตรียม standard solution คือ BHT ใน absolute alcohol เพื่อใช้เป็น positive control ให้มีความ เข้มข้น 25, 12.5 และ 6.5 µg /ml ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง
5. ดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ผสมกับ DPPH ใน absolute alcohol ปริมาตรเท่ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่า absorbance ที่ 520 nm
6. นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % scavenging และค่า ED_{50} โดยเปรียบเทียบ กับสารมาตรฐาน (BHT)

3. Antimicrobial activity[4, 8]

เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ โดยใช้เชื้อที่เป็นตัวแทนของ

เชื้อแกรมบวก : *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*

เชื้อแกรมลบ : *Salmonella* spp., *E. coli*

เชื้อรา : *Candida albicans*

1. ชั่งสารสกัดมันขี้หนู 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ml จะได้สารสกัด 10 g/ml นำ loop แตะสารแล้ว streak ลง TSA (Tryptic soy agar) เพื่อเช็คความปลอดเชื้อ
2. ชั่งสารจากข้อ 1 (10g/ml) มา 1 g เติมน้ำกลั่น 9 ml จะได้สารสกัด 1 g/ml นำ loop แตะสารแล้ว streak ลง TSA เพื่อเช็คความปลอดเชื้อ
3. แบ่งสารข้อ 1 และ 2 เข้า autoclave ความดันคงที่ 110° C 10 นาที เมื่อเสร็จแล้วนำ loop แตะสารทั้ง 2 ตัวอย่าง streak ลง TSA เพื่อเช็คความปลอดเชื้อ
4. แบ่งสารจากข้อ 2 มา 1 ml เติมน้ำกลั่น 9 ml ได้สารละลายสีน้ำตาลเข้มมีตะกอน นำไปปั่นเอาตะกอนออก แล้วกรองด้วย sterile millipore ได้สารละลายใสสีน้ำตาลเข้ม ความเข้มข้น 0.1 g (100 mg/ml) เช็คความปลอดเชื้อ

สารที่กรองได้ใช้สารที่เตรียมในข้อ 3. และ 4. ทดสอบกับเชื้อ ผลการทดสอบความปลอดเชื้อของสารสกัดในข้อ 1, 2, 3, 4 ปรากฏว่าปลอดเชื้อทุกตัว

เชื้อที่ใช้ทดสอบ subculture 3 ครั้ง โดยวิธี streak ลง TSA เพื่อให้ได้เชื้อที่แข็งแรง จากนั้น sub culture ลง TSA อบบ่ม 18 ชั่วโมง เพื่อใช้ทดสอบ ส่วน *C. albicans* streak ลงบน PDA (Potato dextrose agar) อบบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน เพื่อใช้ทดสอบเช่นกัน

ขั้นตอนการทดลอง

1. เขี่ยเชื้อ 1-2 colony ละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อ ปรับความขุ่นให้ได้ เท่ากับ 0.5 Mc farland standard
2. ใช้ sterile cotton swab แตะเชื้อในข้อ 1 พอหมาดๆ ทาให้ทั่ว plate TSA
3. ใช้ sterile disc ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm ชุบสารที่เตรียมไว้ นำไปวางบน plate ที่เตรียมในข้อ 2 และใช้ sterile disc ชุบ sterile distill water เป็น control solvent วางบน plate นี้ด้วย เนื่องจากแต่ละ disc มีความจุ 10 µl เพราะฉะนั้น จำนวนสารที่ใช้ทดสอบจะมีตัวสารประมาณดังนี้

   ถ้าสารสกัด 10 g/ml จะมีตัวสารประมาณ 100 mg/disc

   ถ้าสารสกัด 1 g/ml จะมีตัวสารประมาณ 10 mg/disc

   ถ้าสารสกัด 0.1 g/ml จะมีตัวสารประมาณ 1 mg/disc

การแยกสารโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี [12]

Thin layer chromatography

หาตัวทำละลาย ที่ใช้ในการแยกด้วยวิธี thin layer chromatography ดังนี้

TLC plate : Silica gel GF 254

Developing solvent system

1. n-hexane
2. hexane-chloroform 3:2
3. hexane-ethyl acetate 1:1
4. ethyl acetate-methanol 1:2
5. chloroform-methanol 1:1
6. ethyl acetate-chloroform 2:1
7. methanol

ตรวจสอบด้วย 1.ภายใต้แสง UV ที่ 254 nm

2.ฉีดพ่นด้วย: 2% vanillin in H_2SO_4 และ ให้ความร้อน ที่ 110 °C

Column chromatography

โดยใช้ Column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร

Silica gel 60 G 40 กรัม บรรจุใน columnให้มีความสูง 20 เซนติเมตร

เตรียมสารสกัดหยาบ 5 กรัม ผสมกับ silica gel

ใช้ ตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยเลือกจากการทำ thin layer chromatography เป็น eluent เก็บ fraction ครั้งละ 25 มิลลิลิตร นำแต่ละ fraction ที่ได้ มาตรวจสอบด้วย thin layer chromatography เพื่อรวม fraction ที่มีค่า Rf เหมือนกัน หรือใกล้เคียงกัน เพื่อนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์

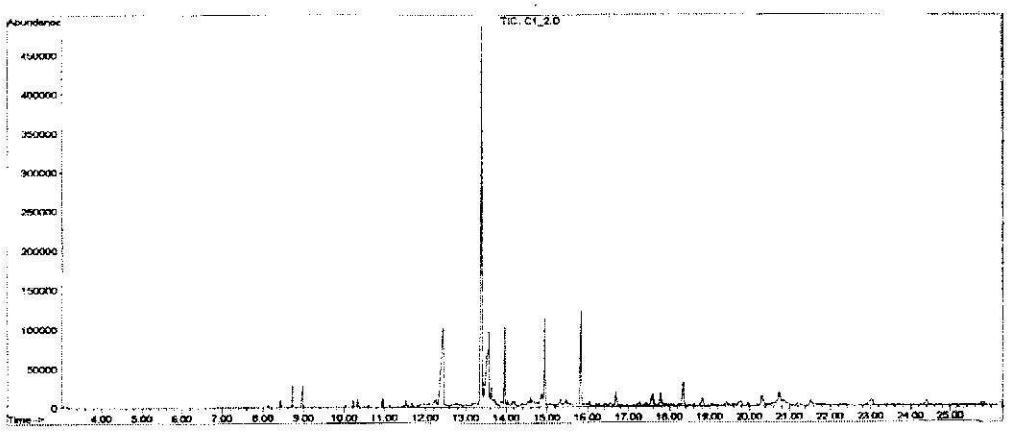
Central Library
Prince of Songkla University

บทที่ 3
ผลการทดลอง

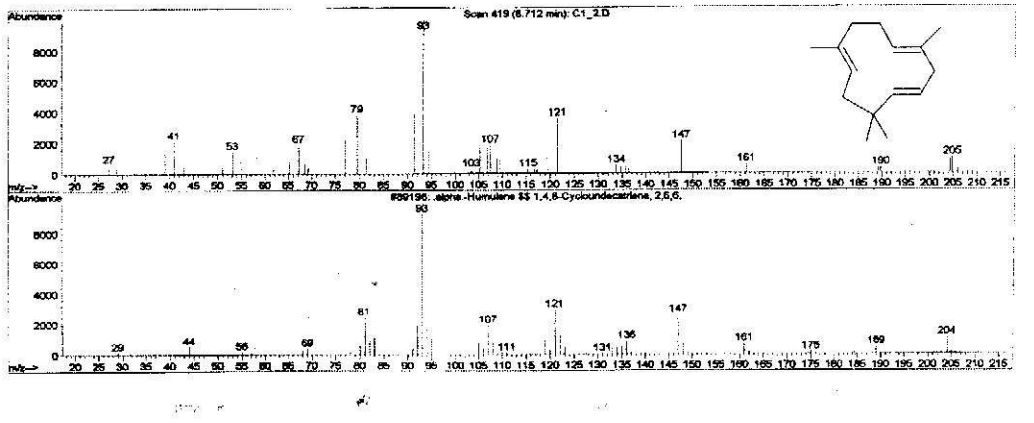
จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากใบมันขี้หนูด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า มีสารที่เป็นพวก terpene และ aliphatic hydrocarbon โดยสารที่พบในปริมาณสูงสุด คือ trans-phytol (42.77%) รองลงมาได้แก่ eicosatrienoate (16.39%) n -tetradecanoic acid (14.42%) α - humulene (7.05%) octoil (6.54%) 2 - methyl - 7 - octadecyne (5.97%) nonadecane (3.26%) germacrene D (2.19%) และ α - humulene (1.42%) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบเคมีบางชนิด เช่น n - tetradecanoic acid, 2 - methyl - 7 - Octadecyne, α - humulene, octoil และ nonadecane ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ชัดเจนว่าในใบมันขี้หนูมีสารเหล่านี้จริง เนื่องจาก % matching ของ mass spectra ของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานที่อยู่ใน library มีค่าค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่า 60)

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบมันขี้หนู

ลำดับที่	ชื่อสาร	retention time (min)	peak area %	Quality
1	α - humulene	8.72	1.42	64
2	germacrene - D	8.97	2.19	90
3	n - tetradecanoic acid	12.43	14.42	38
4	trans - phytol	13.38	42.77	72
5	eicosatrienoate	13.56	16.39	64
6	2 - methyl - 7 - cotadecyne	13.95	5.97	43
7	α - humulene	14.95	7.05	43
8	octoil	15.83	6.54	56
9	nonadecane	18.36	3.25	49
total			100.00	

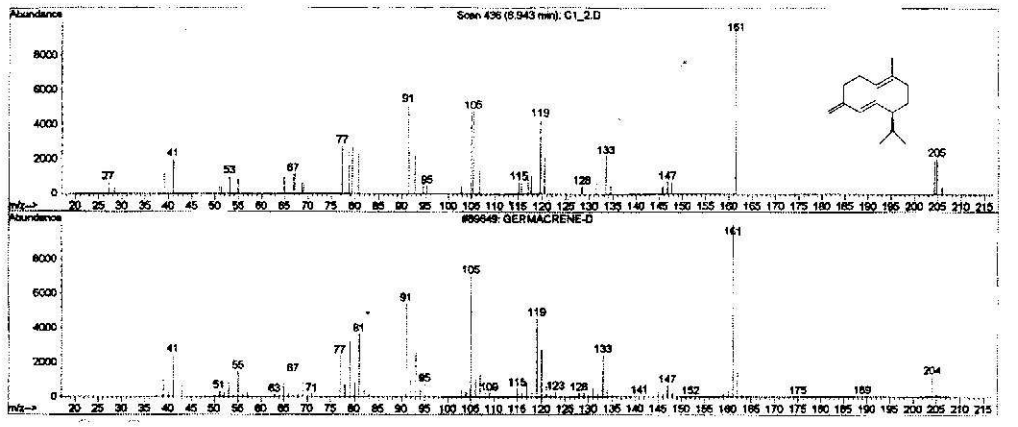


ภาพที่ 1. แสดง GC chromatogram of *Coleus parvofolius*

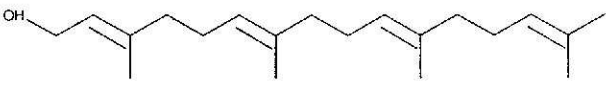


ภาพที่ 2.แสดง Mass spectra of α-humulene

(A =volatile oil component , B = authentic material)

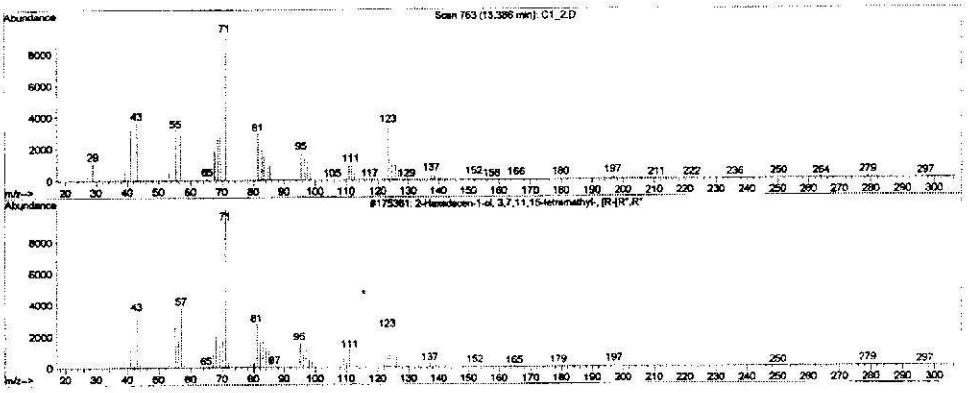


ภาพที่ 3. แสดง Mass spectra of Germacrene-D

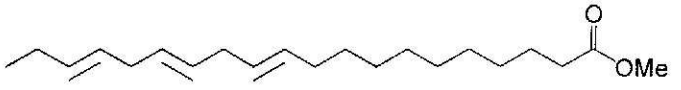


A

B

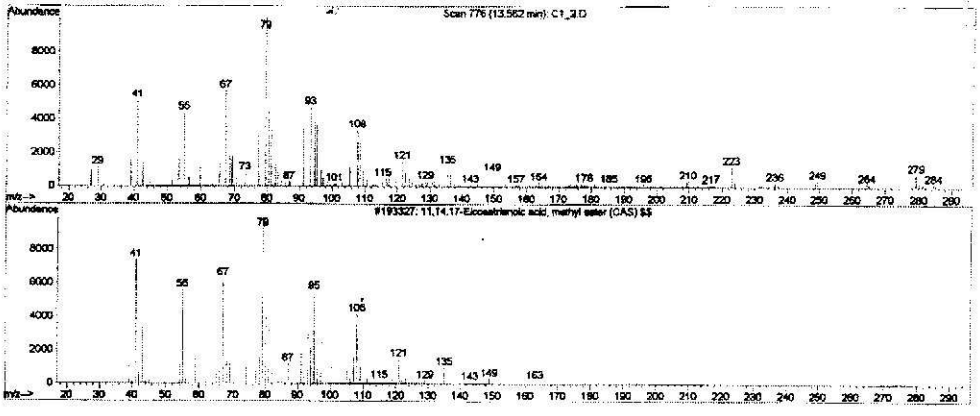


ภาพที่ 4.แสดง Mass spectra of trans-phytol



A

B



ภาพที่ 5.แสดง Mass spectra of 11,14,17-Eicosatrienoate

ผลการทดสอบกลุ่มสาร

กลุ่ม Alkaloid

Dragendorff 's reagent ผล ไม่เกิดตะกอน

Marme 's reagent ผล ไม่เกิดตะกอน

Mayer 's reagent ผล ไม่เกิดตะกอน

Hager 's reagent ผล ไม่เกิดตะกอน

Kraut 's reagent ผล ไม่เกิดตะกอน

แสดงว่าไม่พบสารกลุ่ม alkaloid

กลุ่ม Flavonoid ผลการทดลอง ได้เป็นสีเขียวอมเหลือง

แสดงว่าไม่พบกลุ่ม flavonoid

กลุ่ม Lactone ผลการทดสอบ ได้สารละลายสีเหลือง น้ำตาล

แสดงว่าไม่พบกลุ่ม lactone

กลุ่ม Tannin

ผลการทดสอบกับ $FeCl_3$ ได้สารละลายสีเขียว ผลการทดสอบกับ bromine เกิดตะกอนสีเหลืองแสดงว่ามีสารในกลุ่ม tannin ชนิด condensed tannin

กลุ่ม Terpenoid ผลการทดสอบ ได้เป็นสีเขียว

แสดงว่ามีสารที่มีโครงสร้างเป็น steroid skeleton

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด[1]

1. Brine shrimp lethality test[3,4]

สารสกัดหยาบ มีค่า LC_{50} > 1000 µg/ml แสดงว่าสารสกัดหยาบไม่มีผลต่อ Brine shrimp

2. Antioxidant

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์ในการเป็น antioxidant ของสารสกัดจากใบมันขี้หนู

sample	% scavenging ที่ 25 µg/ml	ED_{50}
BHT	59.84 %	18.08 ± 0.43µg/ml
สารสกัดหยาบจากใบมันขี้หนู	91.43 %	5.87 ± 0.03 µg/ml

สารสกัดหยาบจากใบมันขี้หนูมีฤทธิ์ antioxidant โดยวิธีการทดสอบด้วยสาร DPPH สารสกัดให้ค่า ED_{50} 5.87 ± 0.03 µg/ml ซึ่งค่า scavenging activity มีค่ามากกว่า BHT ประมาณ 3 เท่า (BHT ED_{50} = 18.08 ± 0.43 µg/ml)

3. Antimicrobial activity[5]

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของสารสกัด

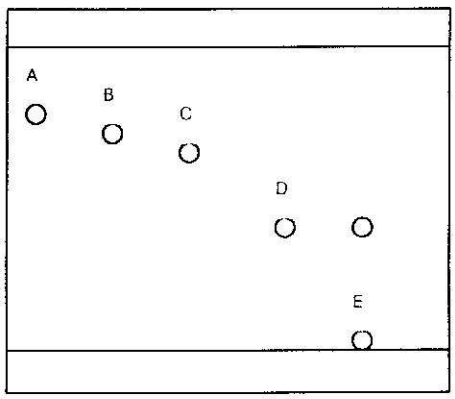
เชื้อ	100 mg/disc	10 mg/disc	1 mg/disc
1. *S. aureus* ATCC25923	+ve(ϕ 15 mm)	+ve(ϕ 8 mm)	-ve
2. *S. aureus* ATCC SK5(MRSA)	+ve(ϕ 20 mm)	+ve(ϕ 11 mm)	-ve
3. *B. subtilis* BGA	+ve(ϕ 14 mm)	+ve(ϕ 9 mm)	-ve
4. *B. cereus*	+ve(ϕ 13.5 mm)	+ve(ϕ 7 mm)	-ve
5. *Salmonella typhi*	+ve(ϕ 11 mm)	-ve	-ve
6. *Salmonella* sp. *enteridis*	+ve(ϕ 9 mm)	-ve	-ve
7. *E. coli* ATCC 25922	+ve(ϕ 10.5 mm)	-ve	-ve
8. *C. albicans*	-ve	-ve	-ve

สารสกัดหยาบจากมันขี้หนูมีผลต่อเชื้อแกรมบวก ที่ความเข้มข้น 10 mg/disc
สารสกัด มีฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมลบ ที่ 100 mg/disc แต่ไม่มีผลต่อเชื้อรา

การแยกสารโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี

พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารคือ hexane-chloroform อัตราส่วน 3:2
นำมาทำ column chromatography แยกสารได้ ดังนี้

fraction 2-5 spot A
fraction 6-10 spot B
fraction 11-18 spot C
fraction 19-23 ไม่มี spot
fraction 24-30 spot D
fraction 31-36 spot E



บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยที่แยกได้มีปริมาณ .015% v/w ของน้ำหนักสด ปริมาณใกล้เคียงกับสะระแหน่ ซึ่งมี 0.01%v/w ส่วนสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณสูงสุดคือ trans-phytol รองลงมาคือ eicosatrienoate, α-humulene และ germacrene D มีรายงานว่า α-humulene เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมจากพืชหลายชนิด รวมทั้ง Hops และ กานพลู ส่วน germacrene D พบในพืชอื่นเช่น *Pseudotsuga japonica* ส่วนประกอบในสารสกัดชั้น alcohol คือสารกลุ่ม terpenoid ที่มีโครงสร้างเป็น steroid และ tannin ในกลุ่ม condensed tannin การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดหยาบไม่มีผลต่อ brine shrimp แต่มีฤทธิ์เป็น antioxidant โดยวิธีการทดสอบด้วย DPPH ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้น เนื่องจาก DPPH เป็นอนุมูลอิสระสามารถรับ electron หรือ hydrogen radical ได้ สารทดสอบที่ทำให้สีม่วงของ DPPH จางลงได้ แสดงว่าสารนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) เมื่อเทียบกับ BHT ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ดีกว่า BHT 3 เท่า

สารสกัดหยาบมีผลในการฆ่าเชื้อแกรมบวกชนิดกลมและชนิดแท่ง สามารถฆ่าเชื้อ S. aureus ทั้งที่เป็นเชื้อมาตรฐานและชนิดที่ดื้อยา methicillin (MRSA) มีผลต่อเชื้อแกรมลบที่เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร แต่ต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่าเชื้อแกรมบวก การศึกษาต่อไปคือการแยกสารบริสุทธิ์ นำมาทดสอบกับเชื้อโดยหาค่า MIC, MBC ซึ่งจะทำให้ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ

เนื่องจากสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ จึงได้นำมาแยกด้วยวิธีทาง chromatography แต่สารที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์และมีปริมาณน้อย จึงน่าจะมีการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Choocoat, D.,Sriubolmas,N., De-Eknamkul,W. and Ruangrungsi,N. Essential Oil of *Mentha cordifolia*: Chemical Composition and Antimicrobial Activity NRCT-JSPS core university system The Fourth Joint Seminar in Pharmaceutical Sciences,Songkhla, Thailand 1998
2. Colegate, S.M., and Molyneux, R.J. Bioactive natural products. CRC Press,Inc. Florida 1993
3. Cordell,G.A. Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach. Wiley, New York,1981
4. Lorian,V. Antibiotics in Laboratory medicine 4th ed. Baltimore: Willium&Wilkins,1996
5. NAPRALERT Database
6. Meyer, B.N. *et al* Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica 45, 1982, pp. 31-34
7. Plablo N. Solis *et al* A Microwell Cytotoxicity Assary using *Artemia salina* (Brine Shrimp) Planta Medica 59, , 1993, pp. 250-252
8. Salie, F. *et al* Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species J. of Ethnopharmacology 52, 1996, pp. 27-33
9. Yamasaki, K. *et al* Electrochemical method for Estimating the Antioxidative Effects of Methanol Extracts of Crude Drugs. Chem. Pharm. Bull. 42(8) 1994, pp.1663-1665
10. ก่องกานดา ชยามฤต สมุนไพรไทย ตอนที่ 6 กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ 2540
11. เต็ม สมิตินันท์ ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ 2523
12. วีณา จิรัจฉริยากูล (บรรณาธิการ) ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 2534

ภาคผนวก

สารเคมี

Dragendorff's reagent

สารละลาย 1 ละลาย basic bismuth nitrate 1.7 กรัม ใน glacial acetic acid 20 มิลลิลิตร เติมน้ำ 40 มิลลิลิตร อุ่นให้ละลาย กรอง

สารละลาย 2 ละลาย potassium iodide 16 กรัมในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย 1 และ 2 ในอัตราส่วน 1:1

Marme's reagent

สารละลาย 1 ละลาย potassium iodide 5 กรัม ใน น้ำอุ่น 20 มิลลิลิตร

สารละลาย 2 ละลาย cadmium iodide 10 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

เติมสารละลาย 1 ลงในสารละลาย 2 ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

Mayer's reagent

ละลาย mercuric chloride 1.36 กรัม ใน น้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร

ละลาย potassium iodide 5 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

Hager's solution

ละลาย picric acid ในน้ำกลั่นจนอิ่มตัว

Kraut's reagent

ละลาย bismuth nitrate 8 กรัมใน nitric acid 20 มิลลิลิตร

ละลาย potassium iodide 2702 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด เข้าด้วยกันเติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร