

บทนำ

Banlangen เป็นชื่อของตัวยาสุมุไพรจีนที่มีสรรพคุณแก้ไข้ ลดความร้อนในร่างกาย แก้ บวม และดับอักเสบ มีการเตรียมเป็นยาจีนแผนโบราณในรูปยาขงจำหน่ายทั่วไปในประเทศจีนเพื่อ ใช้เป็นยาแก้หวัด และลดความร้อนในร่างกาย นอกจากนี้ยังเป็นสมุนไพรที่ใช้เข้าเป็นส่วนประกอบ ในตำรับยาจีนหลาย ๆ ตำรับ (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, 1979) Banlangen ได้จากพืช 2 ชนิด คือ *Isatis tinctoria* L. วงศ์ Cruciferae ซึ่งให้ตัวยาสุมุไพรที่เรียกว่า North Banlangen และ *Strobilanthes cusia* (Nees) Bremk วงศ์ Acanthaceae ให้ตัวยาสุมุไพรที่เรียกว่า South Banlangen ในการนำมาใช้ทางยานั้น North Banlangen จะเป็น ที่นิยมมากกว่า

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของ Banlangen ที่ได้จาก *Isatis tinctoria* L. มีรายงาน ก่อนข้างมาก ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรชนิดนี้มีฤทธิ์เป็น antibacterial, antifungal, antiviral, antihepatitis, และ cytotoxic (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, 1979) มีรายงานการพบสาร indole-type glucosinolates และสาร indigo หลาย ชนิดจากเมล็ดและใบของ *Isatis tinctoria* L. (Frechard et al., 2002; Maugard et al., 2001; Kokubun et al., 1998) สาร indirubin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม indigo ที่พบใน *Isatis tinctoria* L. มีฤทธิ์ ต่อระบบภูมิคุ้มกันในการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Mak et al., 2004) จากการนำตัวอย่างสมุนไพร มาตรวจสอบเบื้องต้นทาง TLC และด้วยวิธีการทางพิษเคมี พบว่ายังมีสารกลุ่มอื่นใน North Banlangen นอกเหนือจากสารในกลุ่ม glucosinolates และ indigo ที่เคยมีรายงานไว้ โดยจากการศึกษาเบื้องต้น ได้แยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบด้วย petroleum ether ได้ 1 ชนิด และอยู่ในระหว่างการศึกษาโครงสร้างทางเคมี ซึ่งสารที่แยกได้นี้ไม่ใช่สารในกลุ่ม glucosinolates และ indigo และจากการค้นคว้าทางเอกสารพบว่า ยังไม่มีการทดสอบฤทธิ์ในการเป็น antibacterial และ antifungal ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก North Banlangen ดังนั้นการศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบ ใน North Banlangen เพิ่มเติมและการทดสอบฤทธิ์ทางด้าน antibacterial และ antifungal ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จึงเป็นงานวิจัยที่จำเป็น ทั้งนี้เพื่อนำผลการวิจัยไปสนับสนุนสรรพคุณในการ รักษาของ Banlangen

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อทำการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดอย่างหยาบของ North Banlangen ในชั้น ethyl acetate ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ของโครมาโตกราฟี
2. เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ผู้วิจัย

1. รศ. ดร.สนั่น ศุภธีรสกุล

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่

จ. สงขลา 90110

โทรศัพท์และโทรสาร 074-428220

E-mail : ssanan@ratree.psu.ac.th

2. Miss Wu Yuqiu

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

3rd year of master degree student, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Kunming Medical College, Kunming, Republic of China.

E-mail : w-wilma@etang.com

วิธีการวิจัยและผลการวิจัย

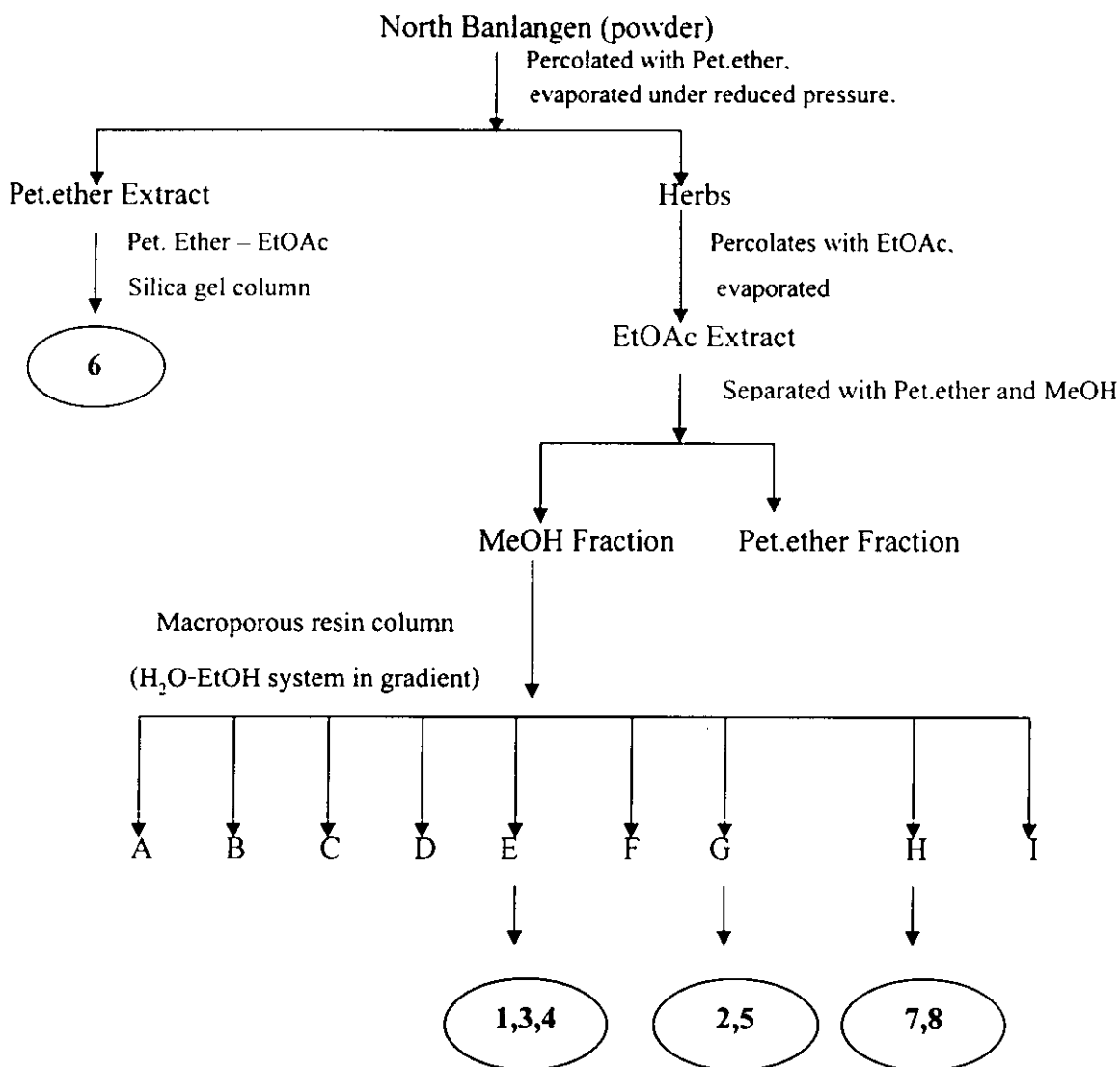
1. การเตรียมตัวอย่าง

นำรากของ *Isatis tinctoria* L. ที่ซื้อมาจากร้านขายยาสมุนไพรในตัวเมืองคุนหมิง ประเทศจีน แล้วนำมาอบให้แห้ง บดเป็นผงหยาบ ๆ แฉกสกัดด้วย petroleum ether เป็นเวลา 3 วัน กรองและระเหยแห้งภายใต้การลดความดัน กากสมุนไพรนำมาแฉกสกัดต่อด้วย petroleum ether อีก 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้รวมกันได้เป็นสารสกัดหยาบด้วย petroleum ether จากนั้นนำกากสมุนไพรมาสกัดต่อด้วย ethyl acetate และ ethanol ด้วยวิธีการสกัดเช่นเดียวกัน จนได้สารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate และ ethanol

2. การแยกสารบริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางด้าน column chromatography และ preparative thin-layer chromatography ซึ่งในโครงการวิจัยนี้จะทำการแยกสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate เท่านั้น เพราะสารสกัดหยาบด้วย petroleum ether ในเบื้องต้นได้ทำการแยกให้บริสุทธิ์แล้ว 1 ชนิด และอยู่ในระหว่างการหาสูตรโครงสร้างทางเคมี และจาก TLC พบ spot ของสารจากสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate หลายชนิด ซึ่งพอจะแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ได้

แผนภูมิในการแยกสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบด้วย petroleum ether และ ethyl acetate มีจำนวน 8 ชนิด ดังนี้



3. การหาสูตรโครงสร้างทางเคมี

หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยข้อมูลทางด้านสเปกโทรสโคปี เช่น NMR, MS, UV, IR เป็นต้น และตรวจสอบด้วย TLC กับสารตัวอย่างที่เคยแยกได้ คือ indigotin (compound 7) และ indirubin (compound 8) ซึ่งสามารถจำแนกสารที่แยกได้ดังต่อไปนี้

Compound 1 : 3-hydroxy-1-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-propan-1-one.
 $C_{10}H_{12}O_4$, colorless granular crystal. EI-MS (70ev) m/z (%) : 196[M]⁺ (26) , 178 (22) , 151 (100) , 123 (18) , 108 (7) ; ¹H-NMR (500.13MHz, CDCl₃) δ : 2.81 (s, 1H, OH-3) , 3.19 (t, 2H, J=5.0Hz, H-2) , 3.96 (s, 3H, OMe-3') , 4.02 (t, 2H, J=5.0Hz, H-3) , 6.23 (s, 1H, OH-4') , 6.95 (d, 1H, J=8.5Hz, H-5') , 7.53 (d, 1H, J=1.5Hz, H-2') , 7.55 (dd, 1H, J=8.5, 1.5Hz, H-6') ; ¹³C-

NMR (100.6MHz CDCl₃) δ : 199.1 (s, C-1), 39.7 (t, C-2), 58.3 (t, C-3), 129.6 (t, C-1'), 114.0 (d, C-2'), 150.8 (s, C-3'), 146.7 (s, C-4'), 109.6 (d, C-5'), 123.7 (d, C-6'), 56.1 (q, OMe).

Compound 2: 3, 4-dihydroxy-1-benzoic methyl ester, C₈H₈O₄, colorless powder. EI-MS (70ev) m/z (%): 168[M]⁺ (100), 153 (92), 136 (9), 125 (67), 108 (27), 97 (58); ¹H-NMR (500.13MHz, CDCl₃) δ : 3.88 (s, 3H, OMe), 6.83 (d, 1H, J=10.0Hz, H-5), 7.55 (dd, 1H, J=10.0, 2.0Hz, H-6), 7.54 (d, 1H, J=2.0Hz, H-2); ¹³C-NMR (100.6MHz CDCl₃) δ : 123.1 (s, C-1), 114.0 (d, C-2), 148.7 (s, C-3), 152.7 (s, C-4), 115.9 (d, C-5), 125.3 (d, C-6), 170.0 (s, COO-), 56.5 (q, OMe).

Compound 3: 3-ethoxyl-4-methyl-1-benzoic methyl ester, C₁₁H₁₄O₃, white needle crystal. EI-MS (70ev) m/z (%): 194[M]⁺ (42), 161 (51), 147 (79), 120 (19), 91 (6), 77 (13); ¹H-NMR (500.13MHz, CDCl₃) δ : 1.31 (s, 3H, Me), 2.28 (s, 3H, Me-4), 2.31 (s, 3H, OMe) 4.17 (m, 2H, -O-CH₂-), 7.18 (d, 1H, J=8.5Hz, H-2), 7.49 (d, 1H, J=2.0Hz, H-5), 7.19 (dd, 1H, J=2.0, 8.5Hz, H-6); ¹³C-NMR (100.6MHz CDCl₃) δ : 138.7 (s, C-1), 131.6 (d, C-2), 157.0 (s, C-3), 127.3 (s, C-4), 116.8 (d, C-5), 117.7 (d, C-6), 62.1 (q, -O-CH₂-), 17.3 (q, Me-4), 15.0 (q, Me), 40.5 (q, OMe).

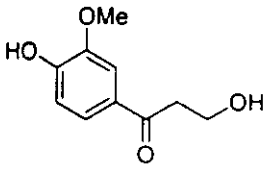
Compound 4: *p*-Hydroxybenzoic acid, C₇H₆O₃, brown needle crystal. EI-MS (70ev) m/z (%): 138[M]⁺ (82), 121 (100), 93 (28), 65 (16); ¹H-NMR (500.13MHz, CDCl₃) δ : 7.86 (dd, 2H, J=11.0, 1.5Hz, H-2, H-6), 6.82 (dd, 2H, J=10.5, 1.5Hz, H-3, H-5); ¹³C-NMR (100.6MHz CDCl₃) δ : 123.6 (s, C-1), 133.0 (d, C-2), 116.0 (d, C-3), 163.3 (s, C-4), 116.0 (d, C-5), 133.0 (d, C-6), 169.0 (s, COOH).

Compound 5: Salicylic acid, $C_7H_6O_3$, white powder. EI-MS (70eV) m/z (%): 138[M]⁺ (65), 120 (100), 92 (94), 64 (19); ¹H-NMR (500.13MHz, CDCl₃) δ: 7.85 (dd, 1H, J=8.0, 1.7 Hz, H-5), 7.43 (dd, 1H, J=8.0, 1.7 Hz, H-4), 6.93 (d, 1H, J=8.0Hz, H-6), 6.85 (d, 1H, J=8.0Hz, H-3); ¹³C-NMR (100.6MHz CDCl₃) δ: 123.3 (s, C-1), 155.1 (s, C-2), 117.3 (d, C-3), 130.6 (d, C-4), 119.2 (s, C-5), 135.7 (d, C-6), 168.0 (s, COOH).

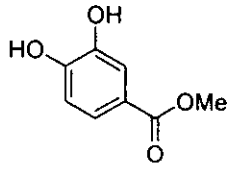
Compound 6: β-Sitosterol, $C_{29}H_{50}O$, white needle crystal. EI-MS m/z (%): 414[M]⁺ (100), 396 (56), 381 (37), 367 (15), 329 (62), 315 (25), 303 (50), 289 (21), 273 (44), 255 (54), 231 (38), 213 (63); ¹H-NMR (400.13MHz, CDCl₃) δ: 5.32 (d, 1H, J=5.2Hz, H-6), 3.50 (m, 1H, H-3), 0.66 (s, 3H, Me-18), 1.00 (s, H, Me-19), 0.92 (d, 3H, J=8.0Hz, Me-21), 0.82 (d, 3H, J=7.6Hz, Me-26), 0.80 (d, 3H, J=7.6Hz, Me-27), 0.83 (t, 3H, J=8.0Hz, Me-29); ¹³C-NMR (100.6MHz CDCl₃) δ: 37.3 (t, C-1), 31.7 (t, C-2), 71.8 (d, C-3), 42.4 (t, C-4), 140.8 (s, C-5), 121.7 (d, C-6), 32.0 (t, C-7), 32.0 (d, C-8), 50.2 (d, C-9), 36.6 (s, C-10), 21.1 (t, C-11), 39.9 (t, C-12), 42.4 (s, C-13), 56.8 (d, C-14), 24.3 (t, C-15), 28.3 (t, C-16), 56.2 (d, C-17), 11.9 (q, Me-18), 19.1 (q, Me-19), 36.2 (d, C-20), 18.8 (q, Me-21), 34.0 (t, C-22), 26.3 (t, C-23), 46.0 (d, C-24), 29.3 (d, C-25), 19.8 (q, Me-26), 19.4 (q, Me-27), 23.2 (t, C-28), 12.0 (q, Me-29);

Compound 7 and 8: Indigotin and Indirubin, were compared with the standards by TLC.

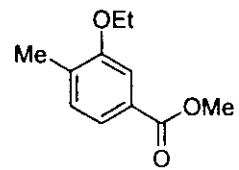
Compounds from *Radix Isatidis* (North Banlangen)



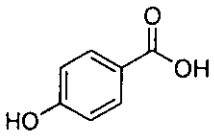
compound 1



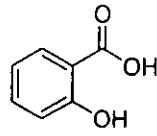
compound 2



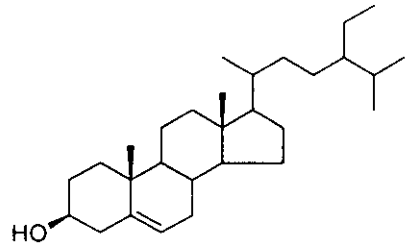
compound 3



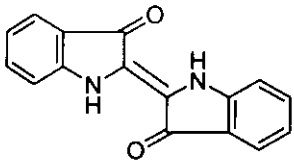
compound 4



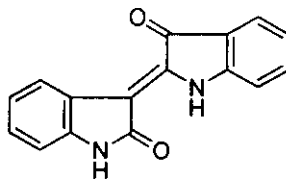
compound 5



compound 6



compound 7



compound 8

วิจารณ์และสรุป

สามารถแยกสารได้ 1 ชนิด จากสารสกัดหยาบด้วย petroleum ether คือ compound 6 (β -sitosterol) และสารอื่นอีก 7 ชนิดจากสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ในจำนวนสารที่แยกได้ทั้งหมด พบว่า มีสารเพียง 2 ชนิดที่พบซ้ำกับที่เคยมีรายงานมาแล้วจากพืชชนิดนี้ คือ indigotin (compound 7) และ indirubin (compound 8) (Maugard *et al.*, 2001) ส่วนสารที่เหลืออีก 6 ชนิด คือ สารชนิดที่ 1-6 เป็นสารที่ยังไม่มีรายงานว่าพบในพืชชนิดนี้มาก่อน สารชนิดอื่น ๆ ที่เคยมี

รายงานมาแล้ว ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารในกลุ่ม indigo เช่น isatin B, indican และ isatin C ก็ไม่พบจากการศึกษาครั้งนี้

การศึกษาฤทธิ์เกี่ยวกับการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันและการต้านเชื้อไข้หวัดของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้เหล่านี้ เป็นงานที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป ทั้งนี้เพื่อดูความสอดคล้องกับการใช้สมุนไพรชนิดนี้ในประเทศจีน ที่นำมาใช้เป็นยาแก้หวัดและลดความร้อนในร่างกาย