

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและวิธีการทั่วไป

1.1 ตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและแยกสารด้วยวิธีการโครมาโตกราฟีเป็นตัวทำละลายเกรดต่างๆไป ก่อนนำมาใช้จะทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ตกผลึกสาร ใช้เกรด AR และในการกำจัดตัวทำละลายออกจากสาร จะใช้เครื่องระเหยตัวทำละลายโดยทำภายใต้ความดันต่ำ ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง $50-60^{\circ}\text{C}$ หากจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่านี้ก็จะใช้ไม่เกิน 70°C

1.2 โครมาโตกราฟี วิธีการแยกที่อาศัยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีใช้ซิลิกาเจล (silica gel) ของ Merck เป็นตัวดูดซับ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

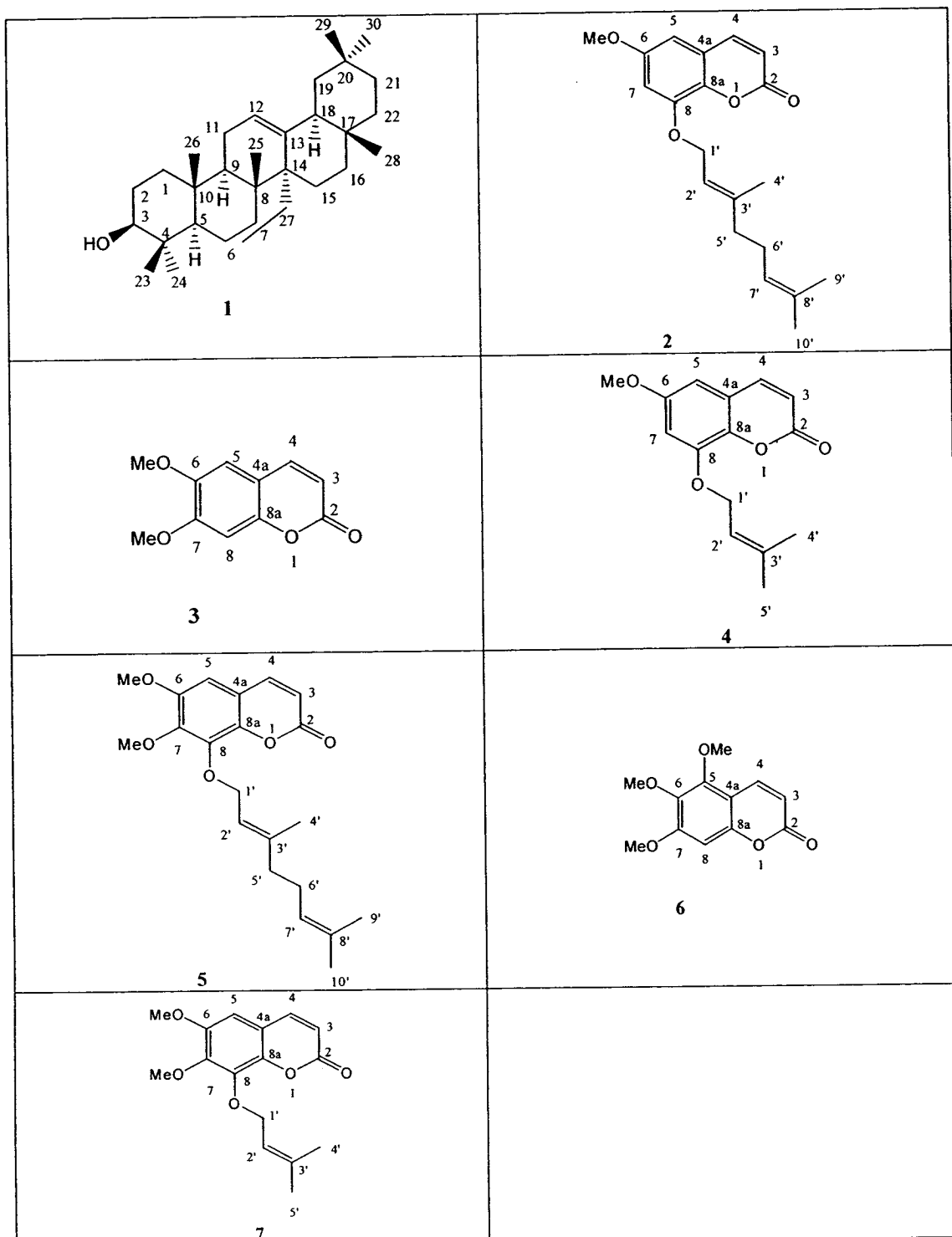
1.2.1) สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) ใช้ซิลิกาเจล สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี 2 ชนิดคือ ซิลิกาเจล ชนิดธรรมดาขนาดอนุภาคประมาณ 0.063-0.200 มิลลิเมตร และ ซิลิกาเจล ชนิดละเอียด ขนาดอนุภาคประมาณต่ำกว่า 0.063 มิลลิเมตร

1.2.2) สำหรับโครมาโตกราฟีชนิดแผ่นเคลือบบาง (thin layer chromatography, TLC) ใช้ซิลิกาเจล 60 เอฟ 254 (silica gel 60 F₂₅₄) เคลือบสำเร็จรูปบนแผ่นอลูมิเนียม มีความหนาของตัวดูดซับประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ขนาดของแผ่นเคลือบสำเร็จมีขนาด 20x20 เซนติเมตร เวลานำมาใช้มักตัดให้มีขนาดประมาณ 2x5 หรือ 4x5 เซนติเมตร

การตรวจสอบหาจุดหรือแถบของสารบนแผ่น TLC ใช้วิธีมองจุดของสารบนแผ่น TLC โดยอาศัยแสงอุลตราไวโอเลต ที่ช่วงความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และดูโดยการย้อมสีด้วยรีเอเจนต์ซึ่งประกอบด้วย anisaldehyde : กรดซัลฟูริกเข้มข้น : เอทานอล 2:3:100 โดยปริมาตร หรือ ใช้ Dragendorff's Spray Reagent เมื่อนำแผ่น TLC ที่ทาหรือสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์ดังกล่าวไปให้ความร้อน จะเกิดสีต่างๆ ตรงบริเวณที่มีสารอยู่

1.3 วัสดุอุปกรณ์ในการวิจัย

จากการนำส่วนที่สกัดด้วยเมทานอลของเปลือกต้นเครือทุเรียน (Toddalia asiatica) มาแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบต่างๆสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 7 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลจาก IR NMR (1D และ 2D) และ MS สเปกตรัม พบว่าสาร [1] นสาร triterpenoid ชื่อ β -amyrin อีก 6 ชนิดเป็นสารในกลุ่ม คูมาริน และอนุพันธ์ [2]-[7]



Handwritten text at the top of the page, possibly a title or header.

Handwritten text, possibly a date or reference.

Handwritten text, possibly a name or identifier.

Handwritten text, possibly a label.

Handwritten text: $\text{MeOH} \quad \text{H}_2\text{O}$

Handwritten text: CH_2Cl_2

Handwritten text: $\text{MeOH} \quad \text{H}_2\text{O}$

Handwritten text: Ethyl acetate

Handwritten text: ethyl acetate

Handwritten text: chromatography

PB-01-EA11 = ethyl acetate

PB-01-EA-50

Fr 1 Fr 2 Fr 3 Fr 4 Fr 5-15 Fr 16-24 Fr 28-40 Fr 41-57 Fr 58-68 Fr 69-94 Fr 95-111 Fr 112-124 Fr 125-137 Fr 138-146

PB-01-EA-54 (Cd)

Fr 3 Fr 4-7 Fr 11 Fr 12-13 Fr 14-15 Fr 16 Fr 17 Fr 18 Fr 19 Fr 20-21

UV 554 active
Acx: EAC 80% 201
UV 554, active omisaldehyde
20100

(CNMR)
PB-01-EA-54/Pr 14
Fr 1-27 Fr 28-38 Fr 39-51 Fr 52-64

Pr 147-160 Pr 161-192 Pr 193-194 Pr 180 Pr 181 Pr 182

PB-01-EA-50/Pr 180
(CNMR)
UV 554 active
Amisaldehyde
PB-01-EA-25

Fr 1-13 Fr 14-19 Fr 16-23 Fr 24-29
(NMR)
PB-01-EA-75/Pr 16-23

UV 554 PB-01-EA-59

Fr 1-25 Fr 26-35 Fr 36-52 Fr 53-70

UV 554 active
Amisaldehyde
20100
(PB-01-EA-59/Pr 36-52)
NMR

Pr 1-8 Pr 9-10 Pr 16-20 Pr 31-40 Pr 41-50 Pr 51-60

Pr 160

Pr 161-185 Pr 186-193 Pr 194-195 Pr 196-197

6881624 PB-01-CH-13

Pr 1-8 Pr 9-14 Pr 18-24 Pr 33-55 Pr 56-66 Pr 67-126

6881624 PB-01-CH-19

6881624 PB-01-CH-13/Pr 9-14

HCX: EA (100.10) Pr 114 254

Pr 1-13 Pr 14-18 Pr 19-84 HCX: EA (100.10)

PB-01-CH-03-Pr 10-12

เลขที่เก็บ PB-01-CH-29

Pr 1-3 Pr 4-5 Pr 6-10 Pr 11-13 Pr 14-22 Pr 23-30 Pr 31-43 Pr 44-54 Pr 55-71 Pr 72-80 Pr 91-100 Pr 101-105 Pr 106-124 Pr 125-131 Pr 140-150 Pr 151-174

เลขที่เก็บ PB-01-CH-39

เลขที่เก็บ PB-01-CH-29

Pr 1-13 Pr 14-43 Pr 44-44

PB-01-CH-39 Pr 1-13

(NMR) รวม 66 un Hex: EA (100:1.4)
active anisaldehyde 7.5% ของ

เลขที่เก็บ PB-01-CH-39

Pr 1-4 Pr 12-12 Pr 13-14 Pr 15-15 Pr 16-22 Pr 23-30 Pr 31-53

NMR

(PB-01-CH-39 Pr 15)

รวม 66 un Hex: EA (100:1.4)

Pr 15.54 active anisaldehyde 8.0% ของ

Pr 1-41 Pr 42-64 Pr 65-65 Pr 66

(NMR)

(PB-01-CH-39/Pr 65)

รวม 66 un Hex: EA (100:1.4)

Pr 65.54 active anisaldehyde 8.0% ของ

9.4 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของชันผึ้งจิ๋ว

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของชันผึ้งจิ๋ว สามารถทำได้โดยนำชันผึ้งมาละลายในตัวทำละลายเอธานอลหรือน้ำผสมเอธานอลอัตราส่วน (1:1) ทำการกรองส่วนที่ไม่ละลายออก หลังจากนั้นแบ่งสารละลายมาทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคที่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันคือการใช้เครื่องมือ HPLC (High pressure liquid chromatography) ทำการเปรียบเทียบสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่พบในชันผึ้งที่มีการรายงานแล้ว ในเบื้องต้นได้ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างมาตรฐานเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ก่อนหลังจากนั้นจึงได้ทำการเปรียบเทียบกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์โดยทำการเทียบสัญญาณฟลักของสารแต่ละตัวที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC ถ้าเป็นสารตัวเดียวกันจะแยกออกมาที่เวลาเท่ากัน โดยอาศัยหลักการดังกล่าวก็สามารถเปรียบเทียบสารที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง (unknown) ได้

ผลที่ได้จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมคือใช้ตัวทำละลายผสมในการแยกสาร ตัวอย่างคือ ใช้ตัวทำละลายที่เป็นน้ำ (water) กับอะซิโตไนไตรด์ (acetonitrile)

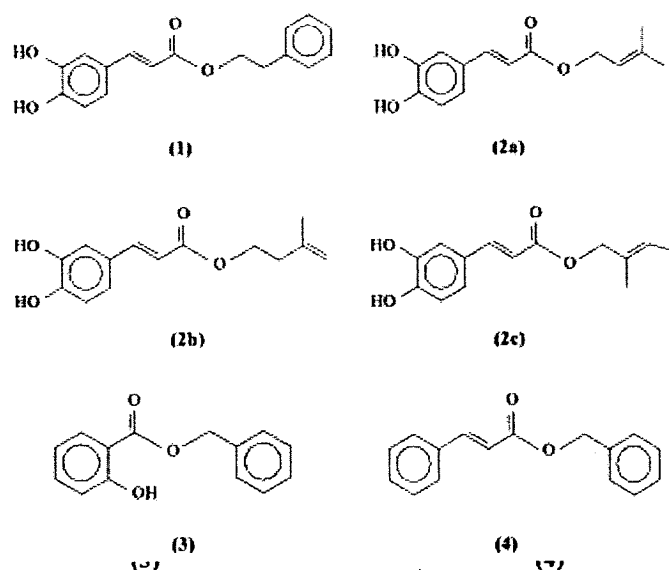
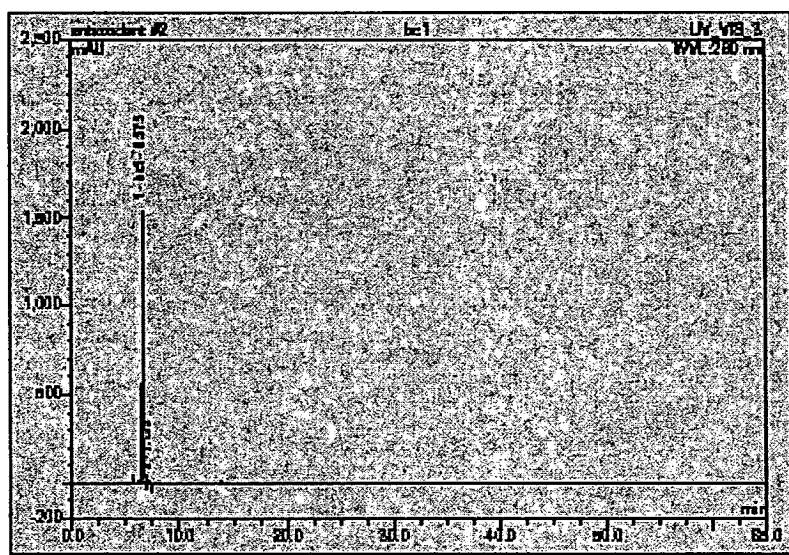
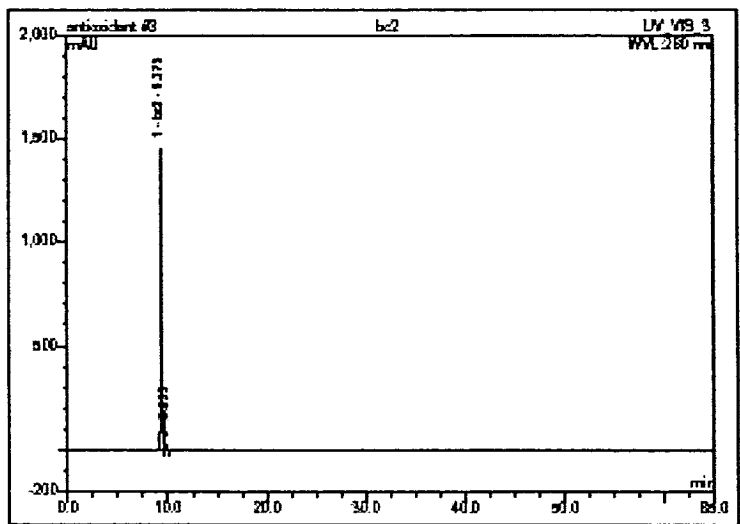


Fig. 1. Some esters responsible of allergic reactions in poplar propolis: (1) phenylethyl caffeate (2a, b, c) three isomers of prenyl caffeate (3) benzyl salicylate (4) benzyl cinnamate.

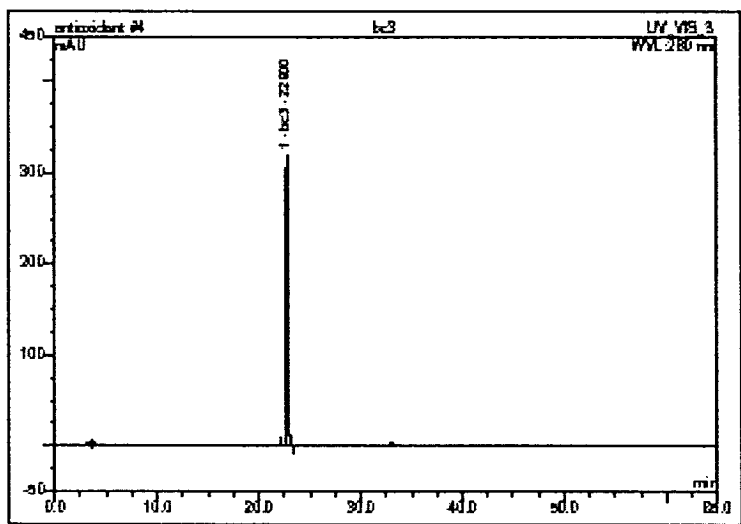
In the present paper we propose a treatment aimed at the reduction of allergenic esters charge in propolis hydroethanolic solutions. This process is based on the treatment of propolis hydroethanolic solution with a phase based on corn oil and bee wax. The use of this phase addresses the need to use a non toxic solvent and to not contaminate propolis with residues of chemicals that would alter the marketability of the final product. The proposed treatment efficiently removes a significant portion of some allergens and seems very promising towards others.



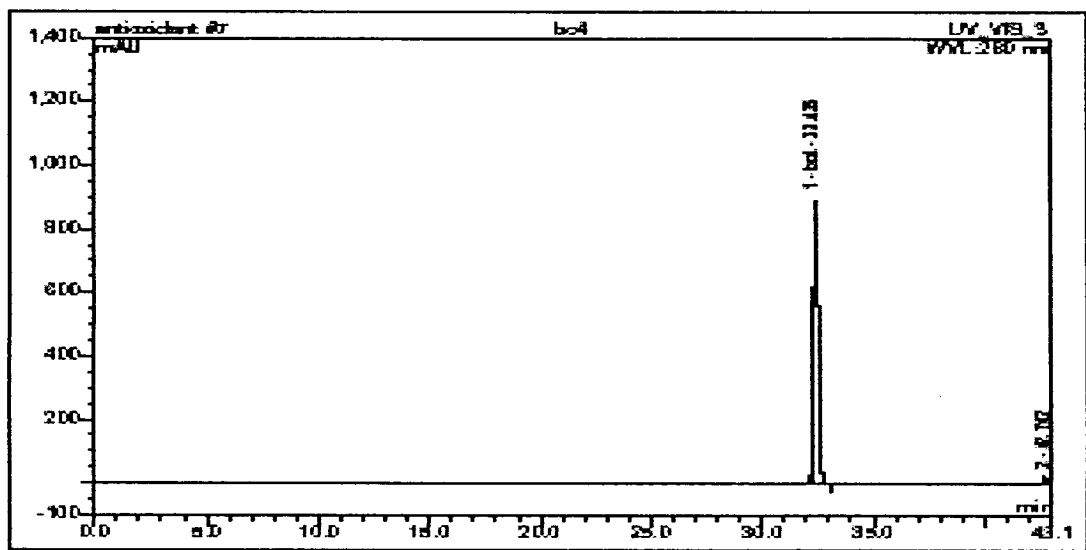
รูปที่1 สัญญาณฟีกของสาร Caffeic acid ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



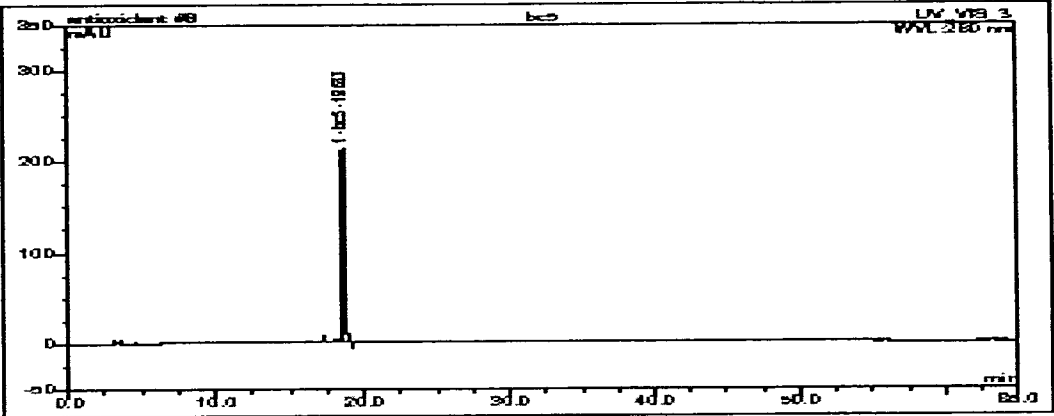
รูปที่2 สัญญาณฟีกของสาร *P*-Coumaric acid ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



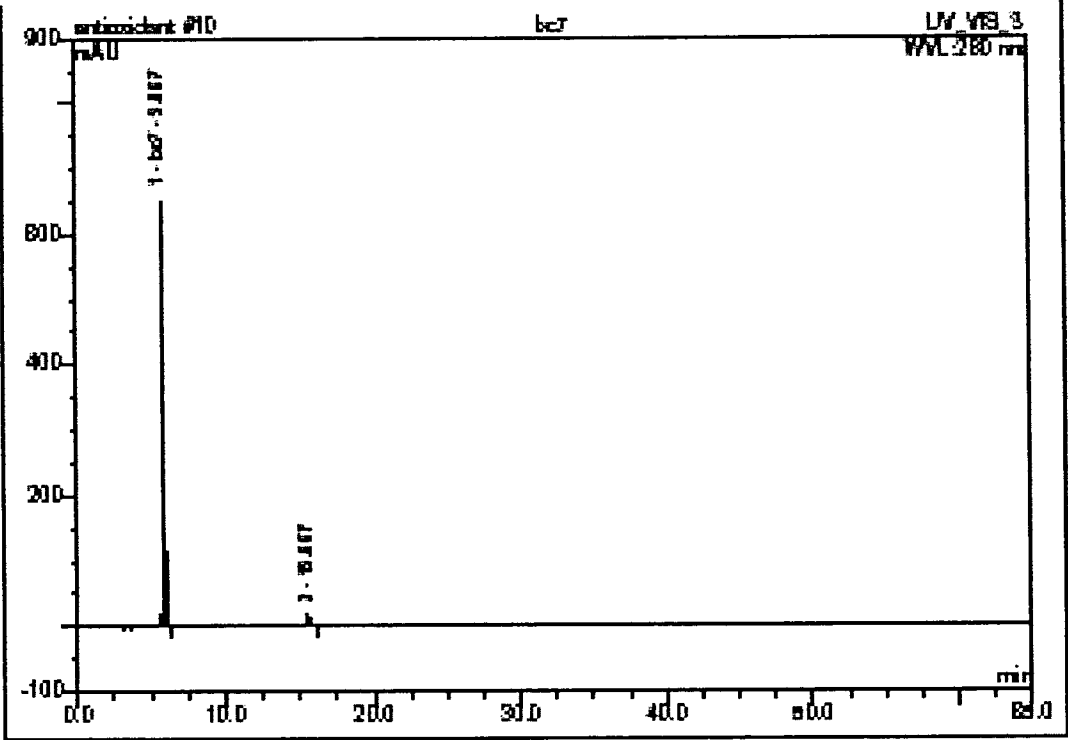
รูปที่3 สัญญาณฟีกของสาร Apiginin ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



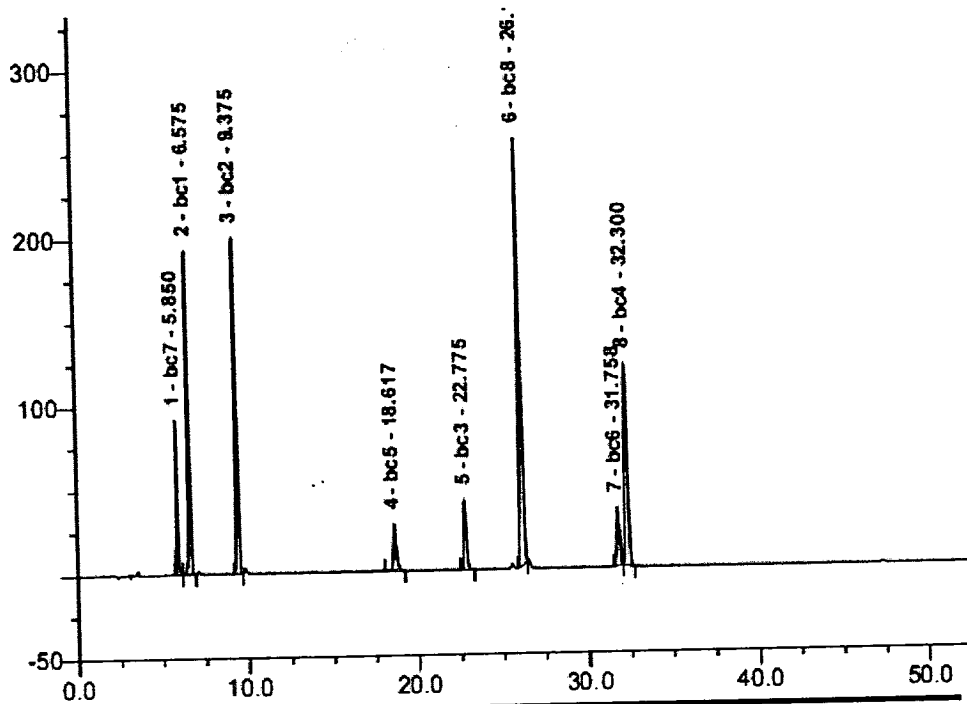
รูปที่4 สัญญาณฟีกของสาร Pinocembrine ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



รูปที่5 สัญญาณฟีกของสาร Quercetin ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



รูปที่6 สัญญาณฟีกของสาร Hydroxycaffeic acid ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %
1	5.85	bc7	92.203	9.960	6.60
2	6.58	bc1	192.902	22.858	15.14
3	9.38	bc2	200.276	26.995	17.88
4	18.62	bc5	28.047	5.527	3.66
5	22.78	bc3	41.683	7.476	4.95
6	26.13	bc8	254.230	47.137	31.22
7	31.76	bc6	35.071	6.940	4.60
8	32.30	bc4	120.267	24.103	15.96

สัญญาณฟีกของสาร Hydroxycaffeic acid bc7

สัญญาณฟีกของสาร Caffeic acid bc 1

สัญญาณฟีกของสาร *P*-Coumaric acid bc 2

สัญญาณฟีกของสาร Quercetin bc 5

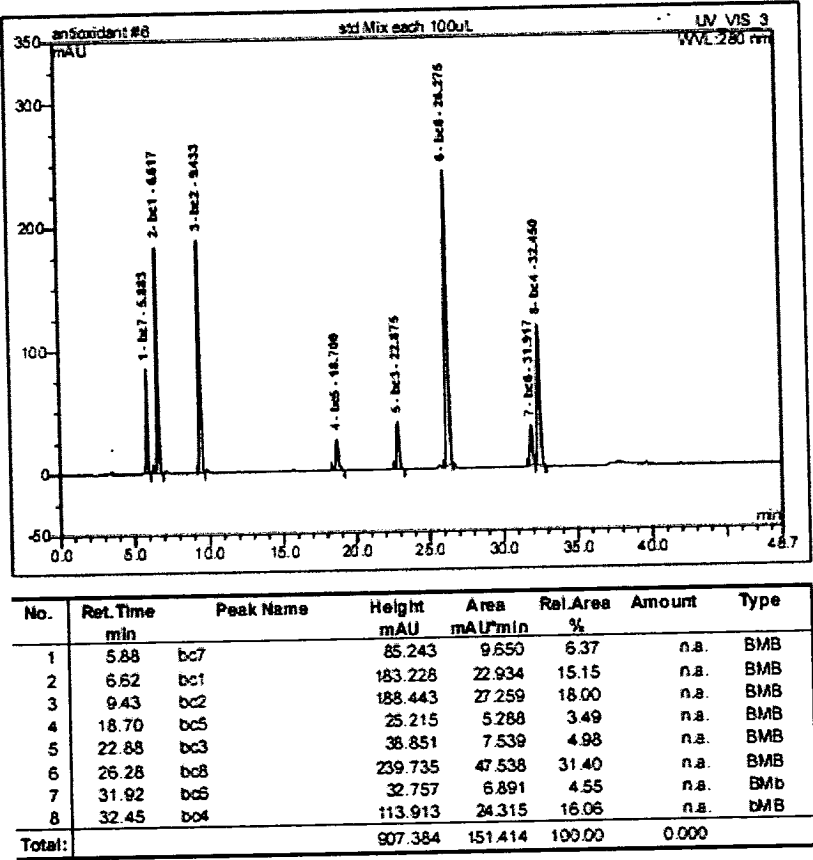
สัญญาณฟีกของสาร Apiginin bc3

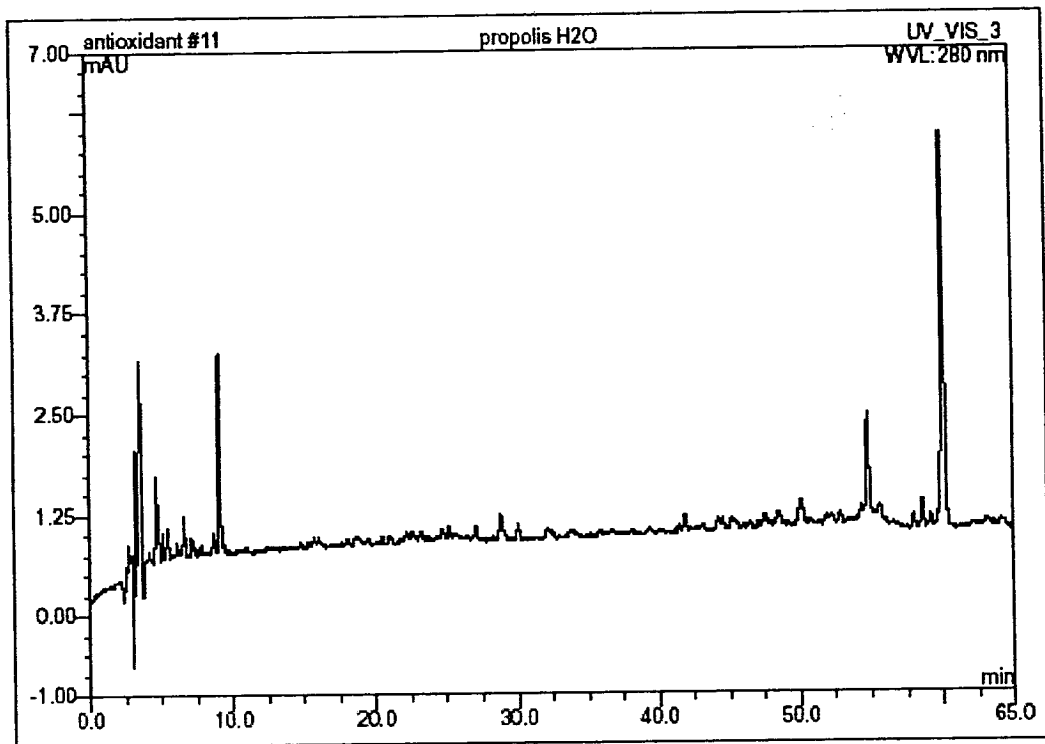
สัญญาณฟีกของสาร Cinamylideneacetic acid bc8

สัญญาณฟีกของสาร Cinamylideneacetic acid bc6

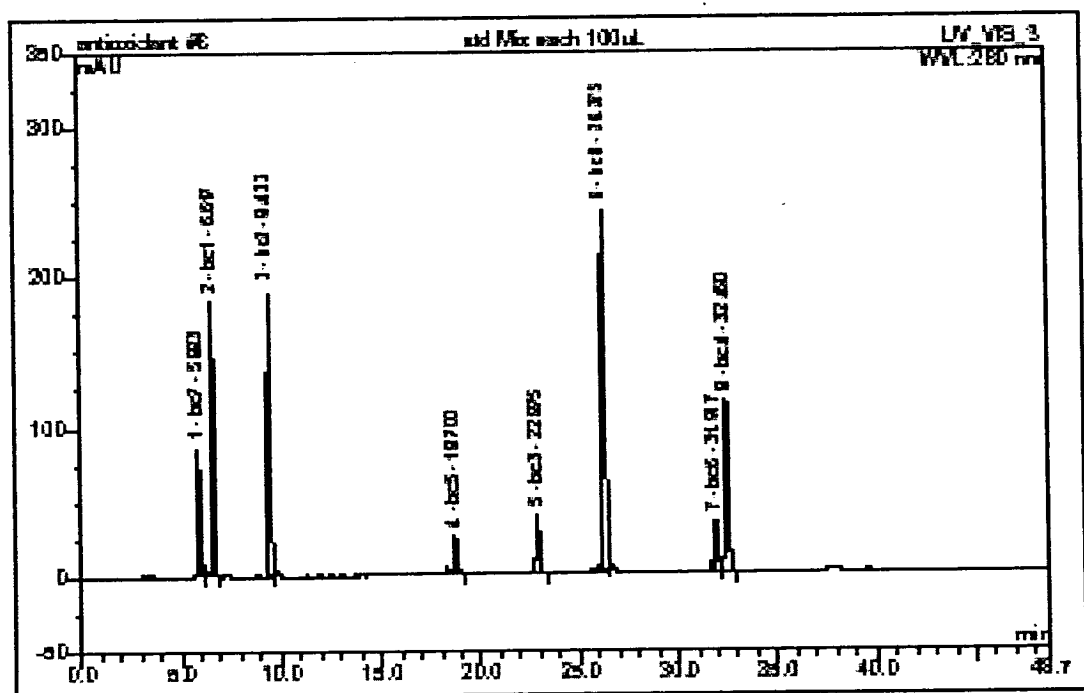
สัญญาณฟีกของสาร Pinocebrine 4

โครงการวิเคราะห์คุณภาพและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ผึ้งจิ๋วโดยการสกัดชั้นผึ้งบริสุทธิ์
คณะผู้ดำเนินโครงการได้นำชั้นผึ้งจิ๋วที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการสกัด เพื่อให้ได้สาร
ในชั้นผึ้งที่บริสุทธิ์ ผลจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่า มีสารในชั้นผึ้งที่บริสุทธิ์
1 ตัว ซึ่งตรงกับการค้นพบในชั้นผึ้งของต่างประเทศ คือ P-Coumaric Acid นอกจากนี้
ส่วนประกอบหลักในชั้นผึ้งจิ๋วจะเป็นดินและเกลือซึ่งไม่พบในผึ้งพันธุ์อื่นๆ ส่วนที่เหลือ
จะเป็นสารประเภทเทอร์ปีน (Terpene) แต่การพิสูจน์โครงสร้างยังต้องทำการวิจัยต่อไป

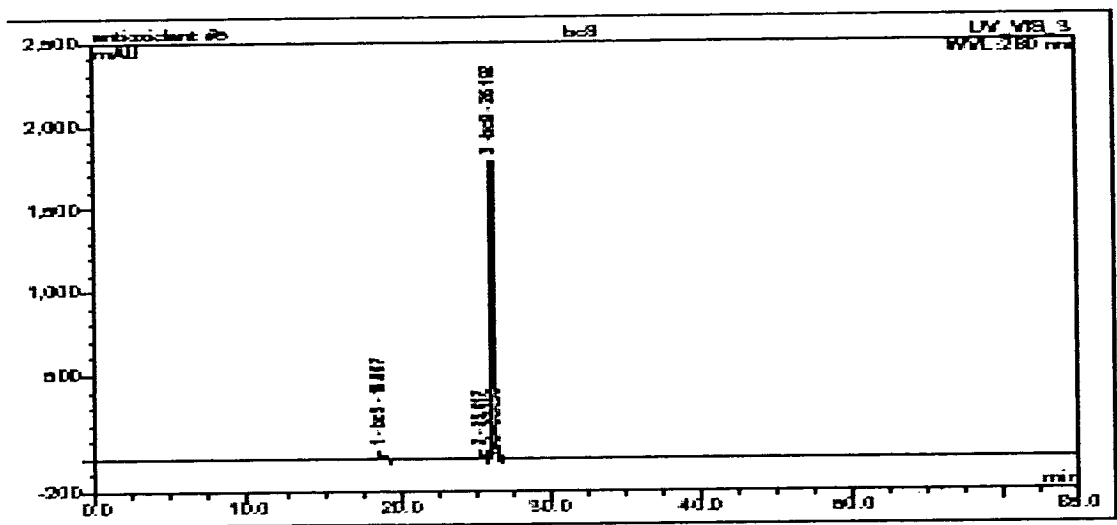




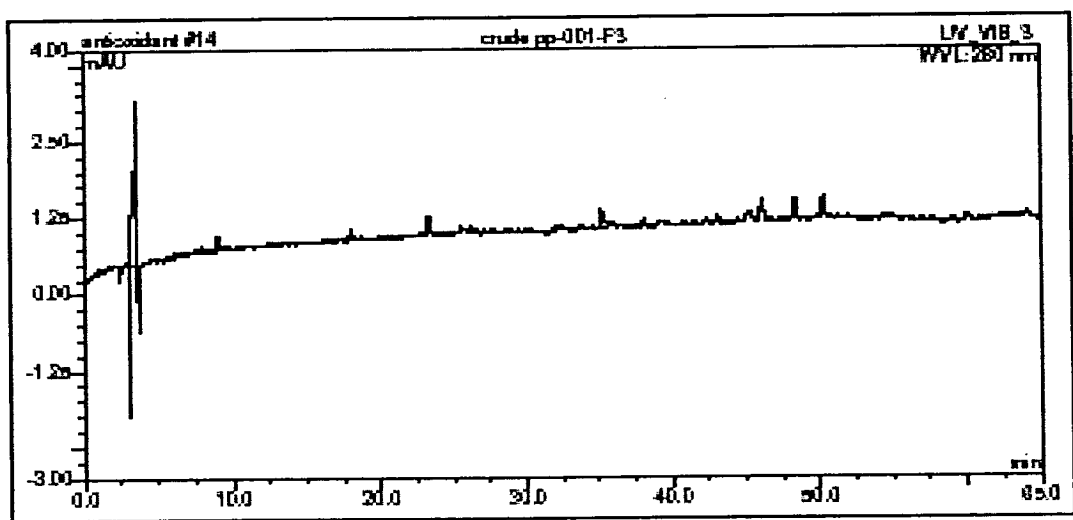
รูปที่12 สัญญาณฟลักของสารตัวอย่างชั้นผึ้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ
ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



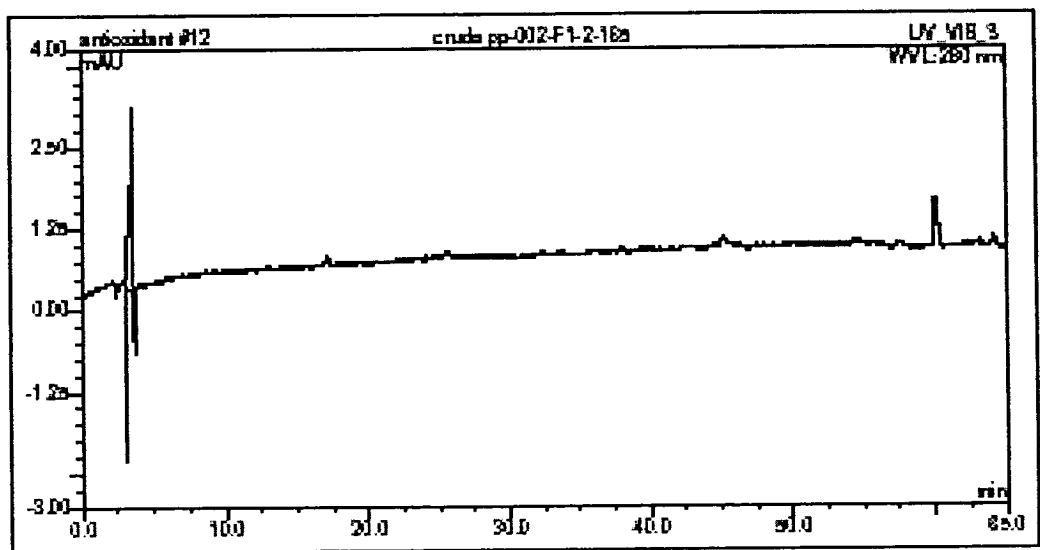
สารตัวอย่างมาตรฐานผสม



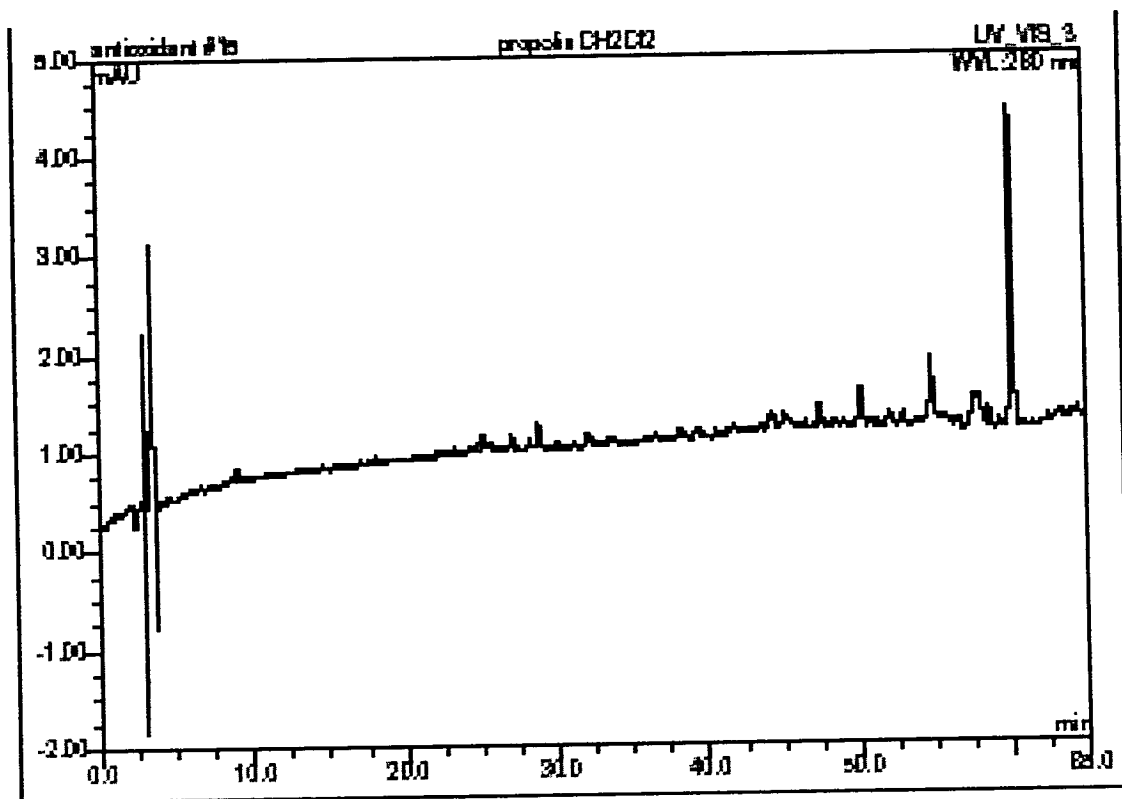
รูปที่7 สัญญาณฟีกของสาร Cinamylideneacetic acid ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



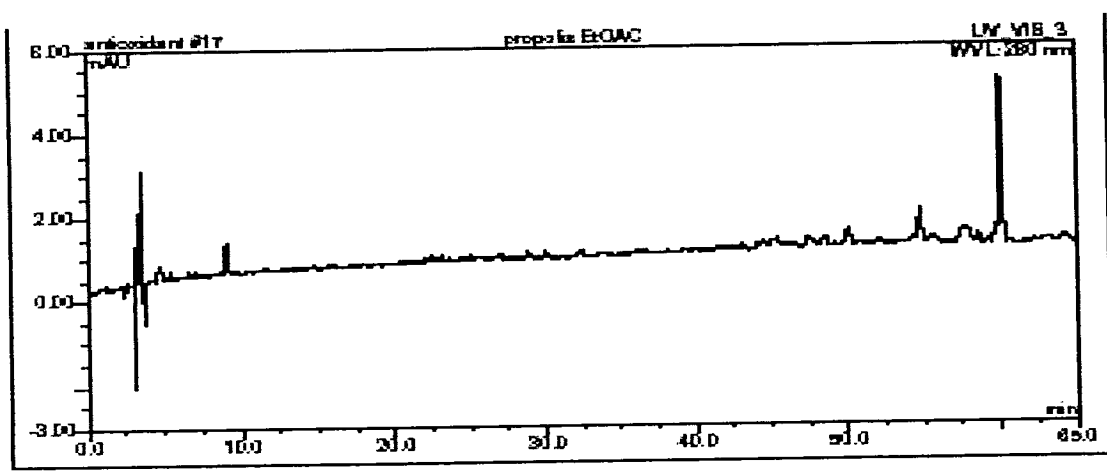
รูปที่8 สัญญาณฟีกของสารตัวอย่างชั้นผึงจากจังหวัดแพร่ ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



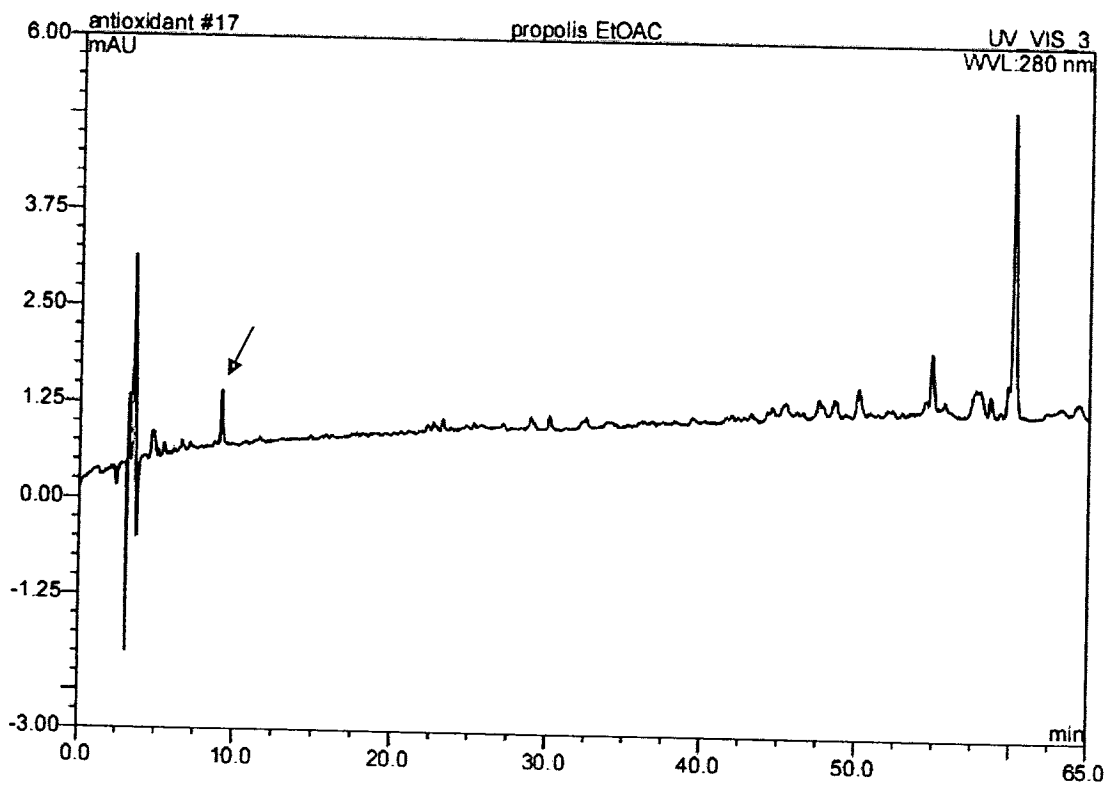
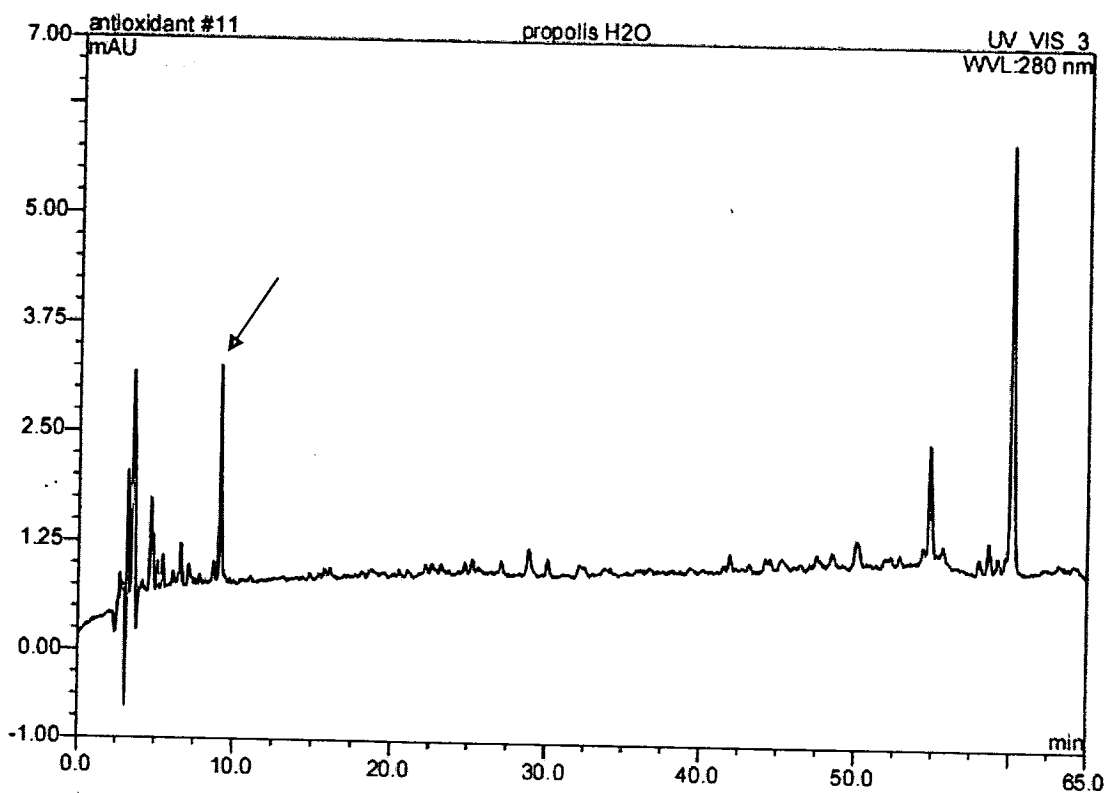
รูปที่9 สัญญาณฟีกของสารตัวอย่างชั้นผึงจากจังหวัดแพร่ ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC

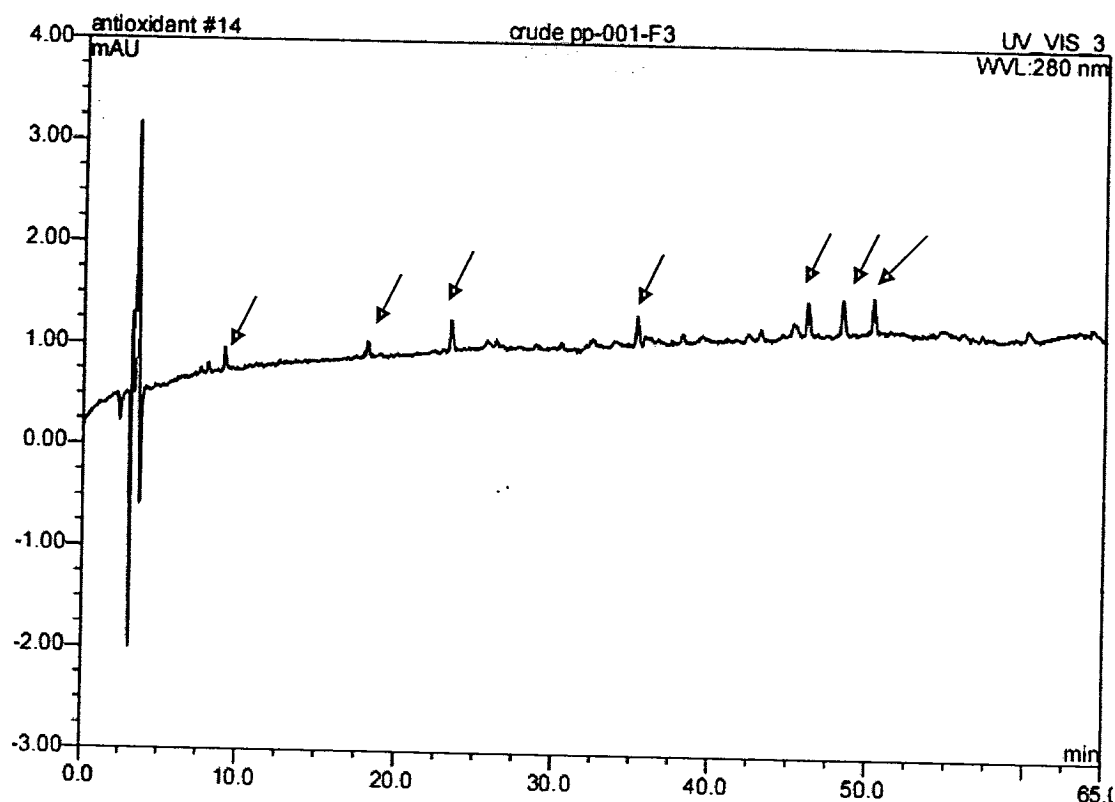


รูปที่10 สัญญาณฟีกของสารตัวอย่างชันผึ้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทิลีนคลอไรด์
ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC



รูปที่11 สัญญาณฟีกของสารตัวอย่างชันผึ้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต
ที่แยกออกมาจากเครื่อง HPLC





2.2. Phytochemical analysis of ethanolic propolis extracts by HPLC

HPLC analysis was performed by the method of Medić-Šarić et al. (2011). HPLC analysis of the ethanolic propolis extracts was run on HPLC (Agilent 1100) equipped with a diode array detector. Separation was performed on a Agilent Zorbax SB-C18 column (250 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm) with Zorbax SB-C18 guard column (12.5 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm), using mobile phases: water/methanol/formic acid (93:5:2) (A) and water/methanol/formic acid (3:95:2) (B). Elution was performed at a flow rate of 1 ml/min (volume applied 10 μl) at the temperature of 40 °C using gradient method with the following timetable (t/min, %B): (0, 20), (10, 40), (35, 50), (47, 50), (70, 80), (80, 20). Chromatograms were recorded at 270, 290, 320 and 350 nm.

Samples were made by dilution of ethanolic propolis extracts 1:99 with 80% ethanol (v/v). The components of propolis ethanol extracts were identified by the comparison of their retention times and UV-spectra with standards of phenolic acids (ferulic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid) and flavonoids (tectochrysin, galangin, pinocembrin, pinocembrin-7-methylether, chrysin, apigenin, kaempferol, quercetin) acquired commercially. Standards were dissolved in ethanol 80% (v/v) to give 1 mg/ml stock solutions. Content of polyphenol was determined using calibration curves and expressed in mg per 1 g of raw propolis.

2.3. *Cell line and culturing*

The experiments were carried out on cervix adenocarcinoma cell line (HeLa) (ATCC CCL-2) cultured in Dulbecco's modified Eagle medium – DMEM (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, EU), 2 mM glutamine, and 100 U/ml of penicillin and 0.1 mg/ml of streptomycin per 100 ml culture media. The cells were grown as monolayer in tissue culture flasks (BD Falcon, Germany) in humidified atmosphere under the conditions of 37 °C/5% of CO₂ gas in the CO₂ incubator (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The trypan blue dye exclusion method was used to assess cell viability.

Ac-bc-6/13 (F1/F2) (F3/F4)

Ac-bc-19/20-34

recolumn 39 70 6 fraction (u139)

1-4 (F1) 5-9 (F2) 10-14 (F3) 15-19 (F4) 20-34 (F5) 35-65 (F6)

recolumn 41 70 7 fraction (u142)

1-10 (F1) 11-13 F2 14-22 F3 23-35 F4 36-44 F5 45-70 F6 71-95 F7

run NMR Ac-bc-42/17-13
OK 1222
run UV

Ac-bc-6/13

recolumn 40 70 3 fraction (u140)

1-9 F1 10-19 F2 20-56 F3

recolumn 49 70 5 fraction (u148)

1-15 F1 16-54 F2 55-75 F3 76-109 F4 109-115 F5

recolumn 56

recolumn 49 70 3 fraction (u149)

1-33 F1 34-42 F2 43-70 F3

run NMR Ac-bc-49/34-42 (1232)
* (bc-rv-1231), (cosy)

run NMR Ac-bc-48/108-115
4 (bc-rv-1233)

Ac-bc-22/1-10

recolumn 43 70 5 fraction (44)

1-14 F1 15-32 F2 33-49 F3 50-105 F4 106-140 F5

run NMR Ac-bc-44/15-32

recolumn 45 70 5 fraction (u146)

1-43 F1 44-54 F2 55-90 F3 71-110 F4 111-115 F5

recolumn 57 70 3 fraction (u157)

1-39 F1 40-57 F2 58-90 F3

recolumn 50 70 5 fraction (u151)

1-46 F1 47-58 F2 59-89 F3 90-100 F4 101-150 F5

run NMR Ac-bc-51/47-58

run NMR

Ac-bc-51/90-100

recolumn 54 70 2 fraction (u154)

1-40 F1 41-90 F2

Ac-bc-48/76-109

recolumn 66 70 4 fraction (u156)

1-12 F1 13-23 F2 24-39 F3 39-60 F4

Ac-bc-319 (11-27)

recolumn 52 70 4 fraction (u153)

1-19 F1 20-35 F2 36-59 F3 60-120 F4

recolumn 66 70 4 fraction (u167)

1-30 F1 31-60 F2 61-90 F3 91-120 F4

(bc-rv-1224) (2)

27/1/60 82 E+OH

Ac-bc-19/60-83

Ac-bc-1/9 (33-60)

recolumn unit 55 to 5 fraction (unit 55)

recolumn unit 58 to 4 fraction (unit 59)

1-21 F₁ 22-40 F₂ 41-57 F₃ 58-70 F₄ 71-90 F₅

1-20 F₁ 21-35 F₂ 36-79 F₃ 80-150 F₄

30 run NMR

30 run NMR

Ac-bc-55/22-40

Ac-bc-55/58-70

bc-rc-1246

OK ✓

5

recolumn unit 60 to 4 fraction (unit 61)

1-53 F₁ 54-72 F₂ 73-97 F₃ 98-120 F₄

recolumn unit 62 to 3 fraction (unit 63)

1-44 F₁ 45-65 F₂ 66-120 F₃

recolumn unit 64 to 3 fraction (unit 64)

1-34 F₁ 35-50 F₂ 51-80 F₃

Crude Diol (2) AC-bc-1-1-1 (5th run)

84 EtOH

ทำ fraction 68 ได้ 7 fraction (unit 70)

(2) AC-bc-70/1-14 (2) AC-bc-70/15-25 (2) AC-bc-70/26-47 (2) AC-bc-70/48-66 (2) AC-bc-70/67-80 (2) AC-bc-70/81-104 (2) AC-bc-70/105

1-14 (F₁) 15-25 (F₂) 26-47 (F₃) 48-66 (F₄) 67-80 (F₅) 81-104 (F₆) 105 (F₇)

recolumn 71 ได้ 3 fraction (unit 72)

recolumn P.73 ได้ 3 fraction (P.74)

recolumn P.80 ได้ 3 fraction (P.81)

1-8 (F₁) 9-12 (F₂) 13-40 (F₃)

1-27 (F₁) 28-41 (F₂) 42-90 (F₃)

1-5 (F₁) 6-23 (F₂) 24-30 (F₃)

recolumn 75 ได้ 2 F (P.75)

recolumn P.73 ได้ 2 fraction (P.73)

recolumn P.82 ได้ 3 fraction (P.82)

1-10 (F₁) 11-45 (F₂) 1-7 (F₁)

8-25 (F₂)

1-10 (F₁) 11-30 (F₂) 31-65 (F₃)

recolumn P.74 ได้ 2 fraction (P.74)

recolumn P.83 ได้ 2 fraction (P.83)

recolumn P.76 ได้ 3 fraction (P.77)

1-20 (F₁) 21-50 (F₂)

1-14 (F₁) 15-18 (F₂) 19-70 (F₃)

recolumn P.87 ได้ 2 fraction (P.84)

18-37 (F₂) 19-23 80 run NMR (2) AC-bc-74/19-23

1-40 (F₁) 41-55 (F₂)

17-18 83 run NMR

(2) AC-bc-77/17-18

910

x (bc-rv-1284)

6

Chemical constituents and their biological properties of Thai Propolis

Bordin Chitkul^{1*}, Phakin. Manosri¹, Somnuk Boongird, Arunluk Sirmapan and Sitthichai Koontongkaew³

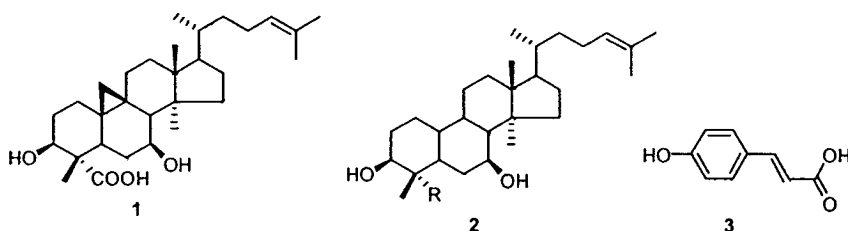
¹Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Huamark, Bangapi, Bangkok, Thailand 10240

*Email: -b_chitkul@ru.ac.th, Tel: +66-2-3108400

²Department of Technological Agriculture, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Huamark, Bangapi, Bangkok, Thailand 10240

³ Faculty of Dentistry, Thammasat University Rangsit Campus, Kong Luang, Pathumthani, Thailand 12121
Tel: ext. 7152 Fax: +66 2 9869205, Thailand

Propolis is resinous substance collected by honeybees from various plant sources. It has been used in folk medicines in many regions of the world and has been reported to have various biological activities. This presentation will focus on the Isolation, structure elucidation and biological activity of terpenes from *Trigona Sirindhornae* Michener and Boongird and *T pagdeni* Schwarz. Their structures were established on the basis of spectroscopic analysis and chemical evidence. This is the first reported of the isolation of the cycloartane triterpenes (1-2) from *T. Sirindhornae*. Compound 3 is the major product was isolated from *T pagdeni* Schwarz. All isolated compounds were tested for antimicrobial activity against *Bacillus cereus* as well as against KB-Oral cavity cancer. Compound 2 exhibited the highest degree against *Bacillus cereus* with MIC of 3.1 µg/ml, whereas showed moderate activity against KB-Oral cavity cancer with IC₅₀ of 27.84 µg/ml. Interestingly, Compound 2 also exhibited Antifungal activity against *candida albicans* with IC₅₀ of 22.59 µg/ml.



REFERENCES

1. Sforcin J. M., Bankova, V. J. *Ethnopharmacology* **2011**, 133, 253-260

Manuscript Number:

Title: In vitro antibacterial and antiadherence effects of propolis extracted from *Trigona sirindhornae*, a new species of stingless bee.

Article Type: Original Article

Keywords: biofilm; glucosyltransferases; propolis; *Streptococcus mutans*; *Trigona sirindhornae*

Corresponding Author: Prof. Sittichai Koontongkaew, DDS, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Faculty of Dentistry

First Author: Sittichai Koontongkaew, DDS, Ph.D

Order of Authors: Sittichai Koontongkaew, DDS, Ph.D; Kusumawadee Utispan, Ph.D; Kamolparn Pugdee, DDS, Ph.D.; Paopanga Monthanapisut, M.Sc; Ladda Meesuk, M.Sc.

Abstract: Background/ purpose: Propolis that is secreted by the honeybee has been used in folk medicine. However, studies concerning the biological activity of propolis obtained from *Trigona sirindhornae*, a new species of stingless bee, are scarce. The aim of this study was to determine the antimicrobial activities of the propolis extracted from *T. sirindhornae* against cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. Materials and methods: Ethyl acetate extracts (EAE) of propolis were prepared and analyzed by reverse-phase HPLC. Anti-bacterial growth and anti-biofilm formation of EAE against *S. mutans* were compared with that of apigenin, a commercial propolis product. Effects of EAE and apigenin on glucosyltransferase (gtf) B expression in *S. mutans* were investigated using real-time PCR. Herein, chlorhexidine (CHX) was used as a positive control. Results: Apigenin, pinocembrin, p-coumaric acid and caffeic acids were not detected in our propolis extracts. However, EAE and apigenin significantly inhibited *S. mutans* growth (IC₅₀ = 43.5 and 17.36 µg/ml, respectively). They also exhibited anti-adherence effects on *S. mutans* biofilm. The significant inhibition of gtf B expression was observed in EAE and apigenin. Conclusion: Propolis produced by *T. sirindhornae* exerted antibacterial, antiadherence and gtf B inhibition properties against *S. mutans*. The antimicrobial activities of this sample of propolis were not due to apigenin, pinocembrin, p-coumaric acid and caffeic acids.

Suggested Reviewers: Melanie Sadono Djamil Ph.D
Professor
melanie_sadono@ymail.com

Chemical Constituents and Anticancer Activities from *Caesalpinia sappan* L.

Phakin Manosri, Bordin Chitkul*

Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok, 10240 Thailand

*E-mail: b_chitkul@ru.ac.th, +66-2-3191900

Abstract: 3,10-di-O-Methylbrazilin, a new derivative of brazilin, was isolated from *Caesalpinia sappan* heartwoods, together with four known compounds identified as protosappanin A, 3-deoxysappanalcone, 3-deoxysappanone B and brazilin. These isolated compounds were tested for inhibitory activity against KB-Oral cavity cancer and NCI-H187-small cell lung cancer. 3-Deoxysappanone B exhibited anticancer activity against KB-Oral cavity cancer with IC_{50} 3.74 μ g/ml whereas brazilin exhibited anticancer activity against NCI-H187-small cell lung cancer with IC_{50} 4.20 μ g/ml.

1. Introduction

Caesalpinia sappan L., known locally as “Phang” in Thai, is found in China, India, Burma, Thailand, Indonesia, Vietnam and South India. The tree is cultivated in the gardens, 6-9m in height. The leaves are compound with 8-12 pairs of oblong leaflets and small prickles. Flowers are yellow in terminal and auxiliary pinnacles, fruits are woody pods. Wood is orange-red, hard and very heavy [1-2].

The heartwood has been used in Chinese traditional medicine to analgesic and anti-inflammatory agent. The small core of heartwood produces a dark red solution in water and is being used as herbal drinking water [3-4]. Its various biological activities include antioxidant activity, anti-bacteria activity, anti-arthritis activity, and anti-acne agent [5-7].

Anticancer agents in this plant have been reported to possess DNA stand-nicking ability [8]. In the preceding papers, we report the isolation and elucidation of five compounds and inhibitory activity against KB-Oral cavity cancer and NCI-H187-small cell lung cancer.

2. Materials and Methods

2.1 Plant materials

The heartwoods of *Caesalpinia sappan* L. were collected in Karnjanaburi province, Thailand in December 2010.

2.2 General experimental procedures

The IR spectra were obtained using a Perkin-Elmer FT-IR spectrum 400 spectrometer (ATR). The 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker AVANCE 400 MHz spectrometer. Mass spectra

obtained by Elettrospray mass spectra (ESMS) were determined on Finnigan LC-Q mass spectrometers.

2.3 Anticancer activity

The anticancer activities of the pure compounds of heartwood from *Caesalpinia sappan* L. were determined by Resazurin Microplate assay (REMA) using KB-Oral cavity cancer (Oral Cavity cancer, ATCC CCL-17) and NCI-H187-Small cell lung cancer (Human small cell lung carcinoma, ATCC CRL-5804). This assay was performed using the method described by previous report [9]. The compounds were first diluted to 50 μ g/ml in 0.5% DMSO and then subjected to a doubling series of dilutions. Cells at the logarithmic growth phase were harvested and diluted to 7×10^4 cells/ml for KB and 9×10^4 cells/ml for MCF-7 and NCI-H187, in fresh medium. Successively, 5 μ l of each sample solution and 45 μ l cell suspensions were added to 96-well plates, incubated at 37°C in 5% CO_2 in an incubator. After the incubation period (3 days for KB and MCF-7 and 5 days for NCI-H187), 12.5 μ l resazurin solutions (62.5 μ g/ml) were added to each well, and the plates were then incubated at 37°C for 4 h. The fluorescence was measured using a SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) at excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm. The percentage inhibition of cell growth (%) was calculated as $[1 - (FUT/FUC)] \times 100$ where FUT and FUC are the mean fluorescent units from treated and untreated conditions, respectively. The IC_{50} values were derived from the dose-response curves using the SOFTMax Pro software. Ellipticine and doxorubicin were used as positive controls and 0.5% DMSO was used as a negative control.

2.5 Extraction and isolation

The air-dried ground heartwoods (2.5 kg) of *Caesalpinia sappan* L. were successively extracted at room temperature with ethanol (3×6 L, each 5 days). The crude extracts were evaporated under reduced pressure to afford brownish ethanol (300.74 g). The crude ethanol extract was extracted with EtOAc and water, and the organic portions were evaporated under reduced pressure to afford a reddish EtOAc extract (175.68 g). The residue was further purified by column chromatography (CC) on silica gel using hexane as eluent and increasing polar with EtOAc to give nine fractions (C1-C9). Fraction C2 (30.83 g) was further purified by CC with EtOAc-hexane (30:70) to give

5(35.5 mg). Fraction C1 (3.12 g) was subjected to CC with EtOAc-hexane (30:70) to afford nine fractions (C4a-C4i). Subfraction C4b (86.7 mg) was separated by CC with EtOAc-hexane (40:60) to give 2 (26.3 mg). Subfractions C4d (65.3 mg) was purified by CC with EtOAc-hexane (40:60) to give 3 (36.5 mg). Fraction C5 (7.3 g) was recrystallized from EtOAc and hexane to give 1 (2.14 g). Fraction C5 (6.93 g) was purified by CC with EtOAc-hexane (60:40) to give 4 (3.24 g).

2.5.1. protosappanin A (1)

White solid; Rf = 0.61 (60:40, Hexane-Ethyl acetate); m.p. 110-122 °C; Negative-ion ES-MS m/z (rel. int.%): 269.2 [M+H]⁻ (100). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 10.23 (1H, s, 3-OH), 9.48 (1H, s, 10-H), 9.46 (1H, s, 11-H), 7.57 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, 1-H), 7.18 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, 2-H), 7.15 (1H, s, 9-H), 7.14 (1H, s, 12-H), 7.13 (1H, s, 4-H), 4.97 (2H, s, 6-CH₂), 3.81 (2H, s, 8-CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 205.8 (C-7), 158.6 (C-4a), 157.7 (C-3), 144.8 (C-11), 144.6 (C-10), 129.9 (C-1, 1a), 125.4 (C-8a), 123.2 (C-12a), 117.1 (C-9), 116.9 (C-12), 112.6 (C-2), 108.3 (C-4), 77.9 (C-6) and 48.3 (C-8). The data were identified by comparison of its ¹H-NMR and ¹³C NMR data reported for this compound [10].

2.5.2. 3-deoxysappanalcone (2)

Orange solid; Rf = 0.66 (50:50, Hexane-Ethyl acetate); m.p. 98-102 °C; Negative-ion ES-MS m/z (rel. int.%): 269.7 [M+H]⁻ (100). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 10.23 (1H, s, 13-OH), 9.99 (1H, s, 3-OH), 3.82 (3H, s, 5-OCH₃), 7.50 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, 11-H, 15-H), 7.49 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 1-H), 7.45 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 8-H), 7.34 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 9-H), 6.80 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, 12-H, 14-H), 6.48 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, 4-H), 6.43 (1H, dd, *J* = 1.6, 8.4 Hz, 2-H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 188.9 (C-7), 162.5 (C-3), 160.3 (C-5), 159.5 (C-13), 141.5 (C-8), 141.3 (C-1), 130.1 (C-11, 15), 125.9 (C-10), 123.9 (C-9), 120.2 (C-6), 116.3 (C-4, C-12, C-14) and 55.6 (OCH₃ at C-5). The data were identified by comparison of its ¹H-NMR and ¹³C NMR data reported for this compound [11].

2.5.2. 3-deoxysappanone B (3)

Colorless powder; Rf = 0.45 (45:55, Hexane-Ethyl acetate); m.p. 105-108 °C; Negative-ion ES-MS m/z (rel. int.%): 285.7 [M+H]⁻ (100). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 11.08 (1H, s, 7-OH), 9.30 (1H, s, 4'-OH), 9.23 (1H, s, 3'-OH), 8.15 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 5-H), 7.18 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, 5'-H), 7.10 (1H, s, 2'-H), 7.00 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 6-H), 6.97 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, 6'-H), 6.81 (1H, s, 8-H), 4.78 (1H, dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 2-Hb), 4.58 (1H, dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 2-Ha), 3.41 (1H, dd, *J* = 14.0, 10.0 Hz, 9-Hb), 3.29 (2H, m, 3-H), 2.97 (1H, dd, *J* = 14.0, 10.0 Hz, 9-Hb), ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 191.5 (C-4), 164.4 (C-7), 163.0 (C-8a), 145.1 (C-4'), 143.6 (C-3'), 129.1 (C-4a), 128.8 (C-5), 119.6 (C-6'), 116.5 (C-2'), 115.5 (C-5'), 113.1 (C-1'), 110.6 (C-6), 102.2 (C-8), 69.4 (C-2), 46.5 (C-3)

and 31.2 (C-9). The data were identified by comparison of its ¹H-NMR and ¹³C NMR data reported for this compound [12].

2.5.3 brazilin (4)

Reddish pale; Rf = 0.50 (40:60, Hexane-Ethyl acetate); Negative-ion ES-MS m/z (rel. int.%): 285.6 [M+H]⁻ (100). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 9.80 (1H, s, 3-OH), 9.18 (1H, s, 9-OH), 9.15 (1H, s, 10-OH), 7.65 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 1-H), 7.15 (1H, s, 8-H), 7.06 (1H, s, 11-H), 6.93 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 2-H), 6.73 (1H, s, 4-H), 4.36 (1H, s, 12-H), 4.35 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, 6-Ha), 4.08 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, 6-Hb), 3.39 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 7-Ha), 3.21 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 7-Hb). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 156.5 (C-4a), 154.1 (C-3), 144.3 (C-10), 144.0 (C-9), 135.6 (C-11a), 130.9 (C-1), 129.8 (C-7a), 144.4 (C-1a), 112.1 (C-8), 111.7 (C-11), 108.8 (C-2), 102.8 (C-4), 76.4 (C-6), 69.6 (C-6a) and 49.6 (C-12). The data were identified by comparison of its ¹H-NMR and ¹³C NMR data reported for this compound [13].

2.5.3 3,10-di-O-methylbrazilin (5)

Pale yellow; Rf = 0.65 (75:25, Hexane-Ethyl acetate); Negative-ion ES-MS m/z (rel. int.%): 297.3 [M+H]⁻ (100). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 6.95 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 1-H), 6.78 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, 11-H), 6.67 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 4-H), 6.55 (1H, dd, *J* = 2.0 Hz, 8-H), 6.81 (1H, s, 4-H), 6.73 (1H, d, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 10-H), 6.41 (1H, d, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 2-H), 6.39 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, 8-H), 3.95 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 6-Hb), 3.74 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 6-Ha), 2.52 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 7-Ha), 2.51 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, 7-Hb). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 157.7 (C-4a), 154.8 (C-3), 145.9 (C-9), 144.2 (C-11a), 132.6 (C-1), 127.6 (C-7a), 123.3 (C-11), 113.7 (C-4), 113.3 (C-10), 111.7 (C-6a), 107.8 (C-2), 103.5 (C-8), 77.6 (C-12), 67.5 (C-6), 55.9 (OCH₃), 55.8 (OCH₃) and 39.4 (C-7).

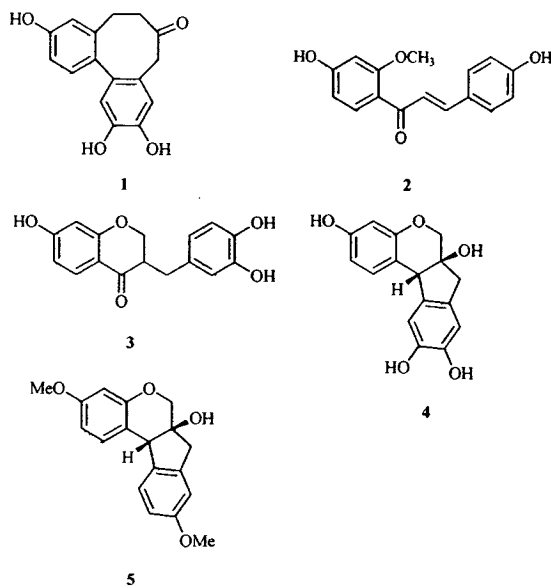


Figure 1. Chemical structure of five compounds from *Caesalpinia sappan* L.

3. Results and Discussion

Phytochemical investigation of an ethanol extract of *Caesalpineia sappan* L heartwoods led to the isolation of one new compound named 3,10-*di-O*-methylbrazilin (5) together with four known compounds, protosappanin A (1), 3-deoxysappanchalcone (2), 3-deoxysappanone B (3), and brazilin (4).

The structures of these constituents were elucidated by spectroscopic techniques including 1D and 2D NMR and mass spectrometry.

Compound 5 was obtained as a pale yellow. Two splitting patterns of 1,2,4-trisubstituted aromatic ring were also inferred from the presence of δ_H 6.95 (1H, d), 6.41 (1H, dd) and 6.67 (1H, d) and another one is 6.55 (1H, dd), 6.78(1H, d) and 6.39 (1H, d). The splitting patterns of other proton are likely pattern of brazilin. The HMBC data from 1H NMR show a significant signal of methoxy group at δ_C 154.8(C-3) and δ_C 145.9 (C-9) are adjacent to δ_C 132.6 (C-1), δ_C 157.7 (C-4a) and δ_C 123.3 (C-11), δ_C 127.6 (C-7a) respectively. Consequently the structure of 5 was elucidated to (6aS,11bR)-3,9-dimethoxy-6,6a,7,11b-tetrahydroindeno[2,1-c]chromen-6a-ol and this compounds has been named 3,10-*di-O*-methylbrazilin.

Table 1: Anti-cancer activity of compounds 1-4 from *Caesalpineia sappan* L against with KB-Oral cavity cancer and NCI-H187-Small cell lung cancer

Compounds	Concentration $\mu\text{g/ml}$	
	KB-Oral	NCI-H187
1	11.42	17.00
2	8.60	12.70
3	3.74	9.73
4	5.42	4.20
5	NT	NT
Doxorubicin	0.147	0.041

NT = not tested.

4. Conclusions

Chemical investigation of an acetone extract of *Caesalpineia sappan* L heartwoods has resulted in the separation of one new compound (5) together with four known compounds.

3-Deoxysappanone B exhibited the highest anticancer activity against KB-Oral cavity cancer with IC_{50} 3.74 $\mu\text{g/ml}$ whereas brazilin exhibited highest anticancer activity against NCI-H187-small cell lung cancer with IC_{50} 4.20 $\mu\text{g/ml}$.

Acknowledgements

We are grateful to Professor Sittichai Koontongkaew, faculty of Dentistry, Thammasat University, for supported with anti-cancer testing.

References

- [1] O. Yodsaoe, S. Cheenpracha and C. Karalai, C. Ponglimanont, S. Chantrapromma, H.K. Fun and A. Kanjana-Opas, *Phytochemistry* **69** (2008) 1242–1249.
- [2] C.R. Pawar, A.D. Landge and S.J. Surana, *J. Of Pharmacy Research* **2** (2008) 131–138.
- [3] X. Yan, W. Wang, D. Xing, Y. Zhao and L. D, *J. Chromatogr. A* **1077** (2005) 44-48.
- [4] S. Badami, S. Moorkoth and B. Suresh, *Nat pro Radianc* **2** (2004) 75-82.
- [5] V.L. Narajan Reddy, V. Ravikanth, V.V.N.S. Jansi Lakshmi, U. Suryanayan Murty and Y. Venkateswarlu, *Fitoterapia* **74** (2003) 600-602.
- [6] Y.Z. Wang, S.Q. Sun and Y.B. Zhou, *Journal of Ethnopharmacology* **136** (2011) 271-278.
- [7] S S. Badami, S. Moorkoth, S. Rammanoharsingh Rai, E. Kannan and S. Bhojraj, *Biol. Pharm. Bull.* **26** (2003) 1534-1537.
- [8] I. Batubara, T. Mitsunaga and H. Ohashi, *J Wood Sci* **56** (2010) 77-81.
- [9] J. O'Brein, I. Wilson, T. Orton and F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* **267** (2000) 5421-5426.
- [10] M. Nakai, S. Nagumo, S.M. Lee, I. Eguchi and K.I. Kaeai, *Chem. Pharm. Bull.* **34** (1986) 1-6.
- [11] M. Namikichi, H. Nagata, M. Nuo, T. Ozawa and T. Saitoh, *Chem. Pharm. Bull.* **35** (1987) 3568-3575.
- [12] L.C. Fu, X.A. Huang, Z.Y. Lai, Y.J. Hi, H.J. liu and X.A. Cai, *Molecules* **13** (2008) 1923-1930.
- [13] D.K. Sim, N.I. Baek, S.R. Oh, K.Y. Jung, I.S. Lee and H.K. Lee, *Phytochemistry* **46** (1997) 177–178.

APOPTOTIC ACTIVITY OF APORPHINE FROM *STEPHANIA VENOSA* ON HUMAN OVARIAN CANCER CELLS

Kamonwan Montrittigri¹, Primchanien Moongkarndi¹,
Suna Joongsomboonkusol¹, Bordin Chitkul², Kovit Pattanapanyasat³

¹Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

²Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand.

³Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.

ABSTRACT

Stephania venosa is a plant rich of alkaloids of family Menispermaceae. In Thailand, the study on this plant revealed many isolated phytochemical constituents. A wide variety of active phytochemicals, including flavonoids, alkaloids, terpenoids, sulfides, and polyphenolics have been identified. In this study, we analyzed the anticancer activity according to the antiproliferation and apoptotic activity of the pure compound from *S. venosa* on human ovarian cancer cells (SKOV3). Ethanolic extract and pure compound were obtained from the tuber of *S. venosa* and evaluated the cytotoxic activity against SKOV3 by MTT assay. Ethanolic crude extract was performed various fractionation and further isolated to obtain pure compound. *S. venosa* and purified constituent extract was demonstrated the significant effect on antiproliferation in a dose dependent manner by MTT assay. Apoptotic effect was confirmed by DNA fragmentation and caspase assay. The cytotoxic activity of ethanolic crude extract showed potent inhibition with an ED₅₀ value of 31 µg/ml. Aporphine alkaloid has been isolated from *S. venosa*. Structure of the alkaloid was determined by NMR technique. Aporphine from *S. venosa* showed the antiproliferation at ED₅₀ value of 6 µg/ml against SKOV3. By the DNA fragmentation and caspase assay, this study can demonstrate that aporphine can significantly inhibit the treated cell proliferation and cells died via apoptosis whereas the untreated cells were not. The results obtained from the pure constituents from *S. venosa* could lead to the further study on the details of mechanism of action of the active substance from plant and future application as new drug for ovarian cancer.

Keyword: *Stephania venosa*; Apoptosis; Alkaloids: Aporphine; Caspase; DNA fragmentation; NMR; MTT assay; SKOV3 cell line.

INTRODUCTION

In Thailand, the studies on this plant revealed many isolated phytochemical constituents. Studies on anticancer drugs from chemicals or natural substances have been involved in apoptotic activity. In ovarian cancer, there are many experiments of anticancer activity of medicinal plant extracts. *S. venosa* is the medicinal plant that there are many groups on studying especially for the antimalarial activity

(Likhitwitayawuid K *et al.*, 1999), acetylcholinesterase inhibition (Ingkaninan K *et al.*, 2003) and antioxidant activity (Potduang B *et al.*, 2005).

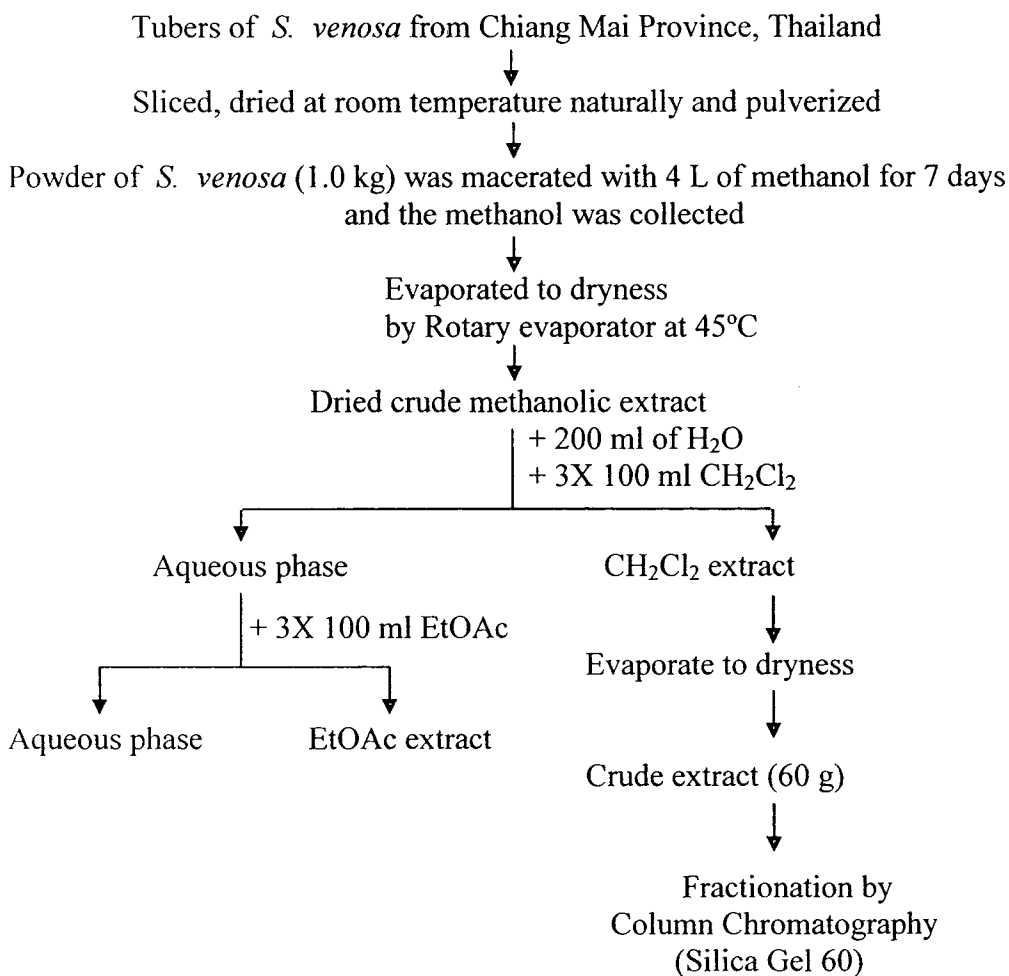
S. venosa, a member of the Menispermaceae described by Spreng is a rich source of alkaloids. Since then the number of alkaloid occurrence reported there has doubled and growth of interest in alkaloid biosynthesis. The genus *Stephania* could be a potential source of biologically active compounds which might be used as lead molecules for development of new drugs. In this study, we analyzed the anticancer activity according to apoptotic activity of ethanolic crude extract and the pure compound from *S. venosa* tuber on ovarian cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Human ovarian cancer cell line (SKOV3) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC HTB77) and ethanolic extract from the tuber of *S. venosa*. the tubers of *S. venosa* were collected from Chiang Mai Province, Thailand.

Isolation of pure compounds from *S. venosa*



Antiproliferation assay

Antiproliferation in a dose dependent manner by MTT assay. Cells were treated with various concentrations of crude ethanolic extract at 37°C for 48 h. The optical density of each well was measured using a microplate reader at 590 nm. The results were shown in line graph between the percentage of cell viability (Y-axis) and the concentrations of sample (X-axis). The ED₅₀ could be calculated from this curve.

Apoptotic assay

Apoptotic assay by determination of DNA fragmentation and caspase 9/6 assay, cells were treated with various concentration of crude ethanolic crude extract for 48 h. Extraction DNA and agarose gel electrophoresis at 100 volt for 1 h. Caspase 9/6 followed by BD ApoAlert™ Caspase-9/6 Assay Protocol.

RESULTS AND DISCUSSION

Antiproliferation activity of the crude ethanolic extract was determined by MTT assay. The extract showed the high potential cytotoxicity in dose-dependent manner. The cytotoxic activity potently inhibited with an ED₅₀ value of 31 µg/ml (Figure 1). The ethanolic extract was fractionated by silica gel to isolate pure compound which presented the ED₅₀ on SKOV3 at 6 µg/ml (Figure 2). Aporphine alkaloid has been isolated from *S. venosa*. Structures of the alkaloids were determined by NMR technique.

DNA fragmentation was observed in SKOV3 at ethanolic extract concentrations of 25, 50, and 100 µg/ml. (Figure 3). This fragmentation was demonstrated with ethanolic extract treatment at 25 µg/ml, and it became more evident at 50 µg/ml

Apoptotic induction was determined by increased caspase 9/6 protein when treated with ethanolic extract of *S.venosa*. There was a significant increase of caspase 9/6 protein expression difference from the control (Figure 4).

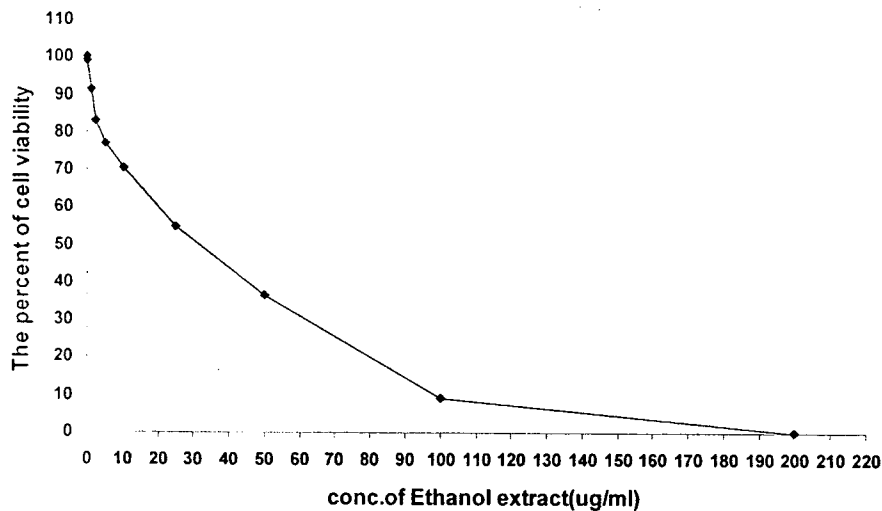


Figure 1. Inhibition of proliferation by various ethanol extracts of *S.venosa*. Cells were treated with various concentrations of ethanolic crude extract for 48 h, and cell viability was determined by the MTT assay. The cytotoxic activity potently inhibited with an ED₅₀ value of 31 µg/ml.

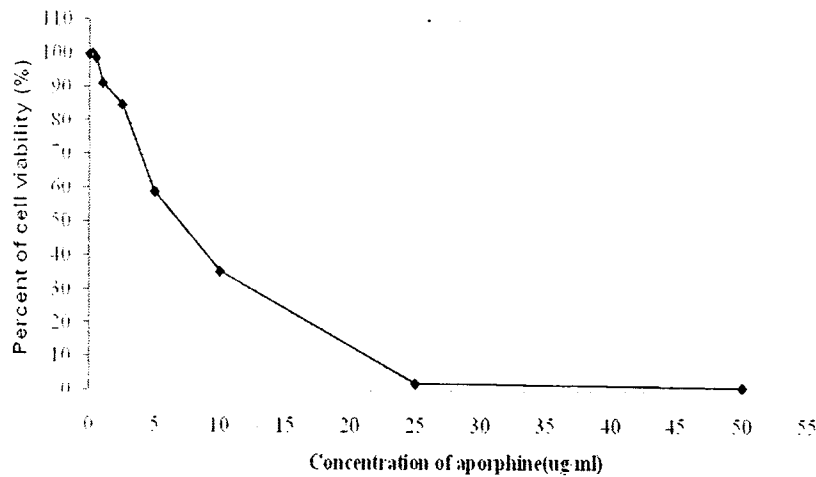


Figure 2. Inhibition of proliferation by various concentrations of pure compound (Aporphine) from fractionated *S.venosa*. Cells were treated with 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50 µg/ml of test materials for 48 h, and cell viability was determined by the MTT assay. The cytotoxic activity potently inhibited with an ED₅₀ value of 6 µg/ml.

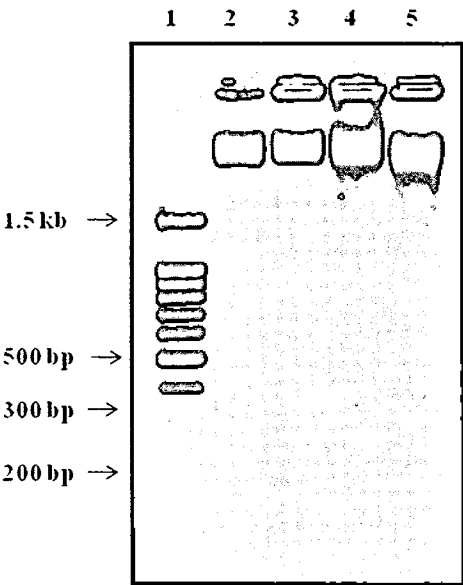


Figure 3. Analysis of genomic DNA fragmentation in SKOV3. Cells (10^6 cells) were induced for 24 h with crude ethanolic extract (0, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$), Lane 1: Molecular marker 100bp + 1.5 kb, Lane 2: untreated cells, Lane3: 25 $\mu\text{g/ml}$, Lane 4: 50 $\mu\text{g/ml}$ and lane 5: 100 $\mu\text{g/ml}$. Fragmentation was assessed by agarose gel electrophoresis.

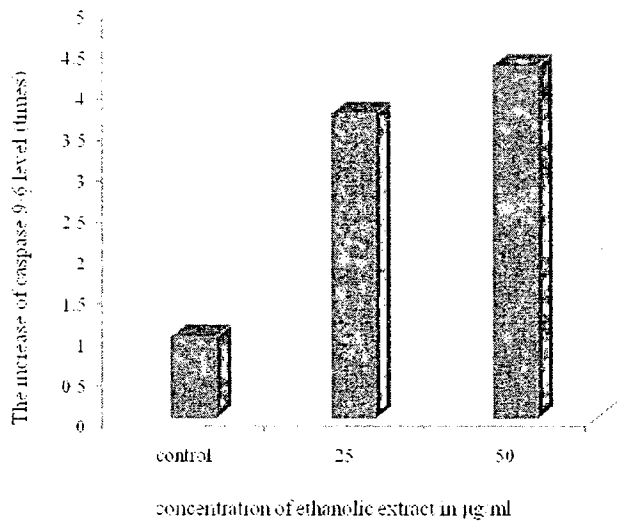


Figure 4. Increase of caspase 9/6 protein expression in SKOV3 after 24 h treatment with 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ ethanolic crude extract.

CONCLUSION

The ethanolic extract was tested for the antiproliferation activity on SKOV3 human ovarian cancer cell line using MTT assay. The pure compound from ethanolic crude extract showed the potently inhibited with an ED₅₀ value of 6 µg/ml. By the DNA fragmentation and caspase assay, these study can be demonstrated that the treated cells were significantly inhibited cell proliferation and cell died via apoptosis whereas the untreated cells were not. Results obtained from aporphine of *S. venosa* could lead to the further study on the mechanism of action of the aporphine from this plant and future potential application as new drug for ovarian cancer.

REFERENCES

1. Ingkaninan K, Phengpa P, Yuenyongsawad S, Khorana N. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. J Pharm Pharmacol 2006; 6:695-700.
2. Jongsomboonkusol S. Cancer chemotherapy and chemoprevention of Phyllanthus amarus, Stephania venosa extracts and OVS1 monoclonal antibody [M.Sc. Thesis in Microbiology]. Bangkok: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University; 2005.
3. Likhitwitayawuid K, Dej-Adisai S, Jongbunprasert V, Krungkrai J. Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. Planta Med 1999; 65:754-6.
4. Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsonboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. Fitoterapia 2004; 75:375-7.
5. Potduang B, Kajsongkram T, Limsiriwong P, Giwanon R, Thisayakorn K, Meeploy M, Benmart Y. Chief Constituents and Biological Activities Determination of *Stephania venosa*. WOCMAP III: Perspectives in Natural Product Chemistry 2005; 3.

รายงานผลการทดลอง

ผลของสารสกัดจาก Propolis ต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Lipoxxygenase

สารเคมี

1. Lipoxxygenase (EC 1.13.11.12) Sigma L7395
2. Linoleic acid

วิธีการทดลอง

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Lipoxxygenase (LOX activity assay)

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธีทาง spectrophotometry โดยใช้ linoleic acid เป็น substrate (เตรียม substrate linoleic acid ความเข้มข้น 30 mM ใน 100 mM Borate buffer pH 9.0 ซึ่งมี 1% Tween 20 ละลายอยู่) โดย 1 Unit ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยต่อนาที

การเตรียมสารละลายสารสกัดจาก Propolis

สารสกัดจาก Propolis จะถูกนำมาละลายใน DMSO หรือ absolute ethanol จนได้สารละลายใส

การตรวจสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Lipoxxygenase

นำสารละลายของสารสกัด Propolis ความเข้มข้นต่างๆ มา incubate กับเอนไซม์ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที (หาค่าควบคุมจะ incubate เอนไซม์กับ 100 mM Borate buffer pH 9.0) จากนั้นเริ่มวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยเติมสารละลายผสมของสารสกัดและเอนไซม์ 20 μ l ลงในสารละลาย substrate 2.98 ml (ความเข้มข้นของ substrate ในสารละลายเท่ากับ 80 μ M และกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 500 unit) บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ 234 nm ทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อนำมาคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์และ % Inhibition โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เติมสารสกัดเทียบกับหาค่าควบคุม

หมายเหตุ : เนื่องจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของตัวทำละลาย DMSO และ Ethanol ที่มากกว่า 40% จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นในการคำนวณ % Inhibition ของสารสกัด

ความเข้มข้นต่างๆ ที่ละลายในตัวทำละลายความเข้มข้นเกิน 40% จะใช้กิจกรรมของเอนไซม์ที่ incubate กับตัวทำละลายความเข้มข้นนั้นๆ เป็นตัวเทียบ

ผลการทดลอง

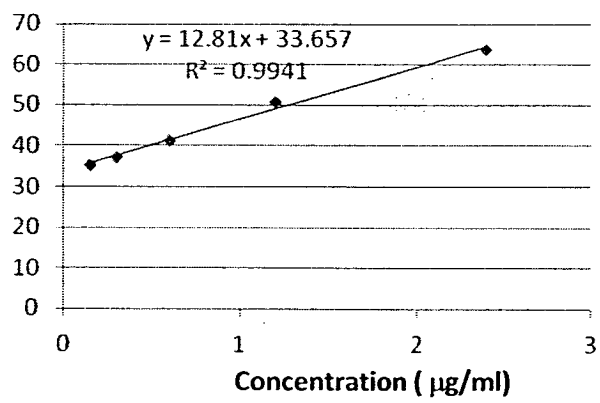
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารสกัด Propolis ที่เตรียม

Sample	Concentration
No.1 PB-01-CH-70/fr 11-20	1.8 mg/ml in DMSO
No.2 PB-01-CH-81/fr 70-72	1.625 mg/ml in DMSO
No.3 PB-01-CH-86/fr 51-60	1.8 mg/ml in EtOH
No.4 PB-01-CH-88/fr 14-45	5.7 mg/ml in EtOH
No.5 PB-01-CH-93/1	4.2 mg/ml in EtOH
No.6 PB-01-CH-96/fr 1	28.33 mg/ml in EtOH

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งเอนไซม์ Lipoxygenase ของ Propolis No.1

Concentration (µg/ml)	% Inhibition			
				$\bar{X} \pm SD$
0.15	29.75	36.64	39.39	35.26 ± 4.97
0.24	33.33	34.78	43.38	38.20 ± 5.49
0.3	41.97	33.88	35.26	37.04 ± 43.33
0.6	42.15	39.39	42.15	41.23 ± 1.59
1.2	51.79	51.43	48.57	50.60 ± 1.76
2.4	61.76	61.76	67.65	63.72 ± 3.4

% Inhibition



จากกราฟค่า $IC_{50} \cong 1.2 \mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งเอนไซม์ Lipoxxygenase ของ Propolis No.2- 6

Propolis No./Concentration (µg/ml)	% Inhibition			$\bar{X} \pm SD$
No. 2 (0.542 µg/ml)	11.0			
No. 3 (0.6 µg/ml)	9.88			
No. 4 (1.9 µg/ml)	32.11	20.21	31.92	28.08 ± 6.82
No. 5 (1.4 µg/ml)	39.51			
No. 6 (9.94 µg/ml)	3.7	1.06	8.5	4.42 ± 3.77

หมายเหตุ: ผลการทดลองยังไม่เสร็จสมบูรณ์

Prof. Chun-Pin Lin

Editor-in-Chief

Journal of Dental Science

Sept 5, 2014

Dear Prof. Chun-Pin Lin

We would like to submit our manuscript entitled "*In vitro* antibacterial and antiadherence effects of propolis extracted from *Trigona sirindhornae*, a new species of stingless bee" for publication as an original article in Journal of Dental Science.

In this study, we investigate effects of propolis extracted from *Trigona sirindhornae*, a new species of stingless bee, on *gtf*-B and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. We found that ethyl acetate propolis extracts could inhibit growth and adherence of *S. mutans*. They also inhibit *gtf* B expression of *S. mutans*. RP-HPLC analysis suggests that apigenin, pinocembrin and cinnamic acid derivatives (*p*-coumaric acid, caffeic acids) are not responsible for the antiadherence property. Therefore, it is possible that propolis of *Trigona sirindhornae* containing the new antimicrobial substances.

We confirm that this manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by another journal. All authors have approved the manuscript and agree with submission to Journal of Dental Science. The study was supported by a grant from the Thammasat University, Thailand. The authors have no conflicts of interest to declare.

Please address all correspondence to:

Sittichai Koontongkaew

Faculty of Dentistry, Thammasat University (Rangsit campus),
Praholyothin road, Khlongluang, Pratumthani, 12121, Thailand.

Tel. (66-89) 7801350

Fax. 66-2-9869213

Email: koontongkaew@gmail.com

We look forward to hearing from you at your earliest convenience.

Yours sincerely,

Sittichai Koontongkaew



Journal of Dental Sciences

COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT



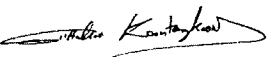
The Association for Dental Sciences of the Republic of China will be pleased to publish your article ("the Work"), tentatively entitled

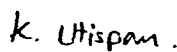
In vitro antibacterial and antiadherence effects of propolis extracted from *Trigona sirindhornae*, a new species of stingless bee

in the *Journal of Dental Sciences* ("the Journal") if the Work is accepted for publication. The undersigned authors transfer all copyright ownership in and relating to the Work, in all forms and media, to the Association for Dental Sciences of the Republic of China in the event that the Work is published in the Journal. However, this agreement will be null and void if the Work is not published in the Journal.

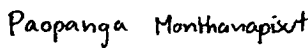
The undersigned authors warrant that the Work is original, is not under consideration by another journal, and has not been previously published.

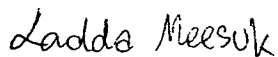
(This agreement must be signed by all authors listed in the Work. A photocopy of this form may be used if there are more than 10 authors.)

Sittichai Koontongkaew		September 5, 2014
Author's name & signature		Date

Kusumawadee Utispan		September 4, 2014
Author's name & signature		Date

Kamolparn Pugdee		September 4, 2014
Author's name & signature		Date

Paopanga Monthanapisut		September 4, 2014
Author's name & signature		Date

Ladda Meesuk		September 4, 2014
Author's name & signature		Date



Journal of Dental Sciences

AUTHORSHIP & CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT



Manuscript title: In vitro antibacterial and antiadherence effects of propolis extracted from *Trigona*

sirindhornae, a new species of stingless bee

AUTHORSHIP

All persons who meet authorship criteria are listed as authors, and all authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication.

Indicate the specific contributions made by each author (list the authors' initials followed by their surnames, e.g., Y.L. Chang). The name of each author must appear at least once in each of the three categories below.

Category 1

Conception and design of study: Sittichai Koontongkaew ;

acquisition of data: Paopanga Monthanapisut , Ladda Meesuk ;

analysis and/or interpretation of data: Kusumawadee Utispan , Kamolpan Pugdee .

Category 2

Drafting the manuscript: Sittichai Koontongkaew , Kusumawadee Utispan ;

Kamolpan Pugdee

revising the manuscript critically for important intellectual content: Sittichai Koontongkaew

Category 3

Approval of the version of the manuscript to be published (the names of all authors must be listed):

Sittichai Koontongkaew,

Kusumawadee Utispan,

Kamolpan Pugdee,

Paopanga Monthanapisut,

Ladda Meesuk

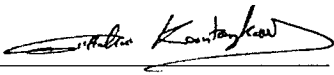
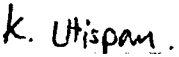
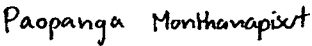
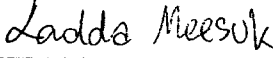
Acknowledgments

All persons who have made substantial contributions to the work reported in the manuscript (e.g., technical help, writing and editing assistance; general support), but who do not meet the criteria for authorship, are named in the Acknowledgments and have given us their written permission to be named. If we have not included an Acknowledgments in our manuscript, then that indicates that we have not received substantial contributions from non-authors.

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 277: 1033-1038.

hanapisut

This Authorship & Conflicts of Interest Statement is signed by all the authors listed in the manuscript to indicate agreement that the above information is true and correct (a photocopy of this form may be used if there are more than 10 authors):

Author's name (typed)	Author's signature	Date
<u>Sittichai Koontongkaew</u>		<u>September 4, 2014</u>
<u>Kusumawadee Utispan</u>		<u>September 4, 2014</u>
<u>Kamolpam Pugdee</u>		<u>September 4, 2014</u>
<u>Paopanga Monthanapisut</u>		<u>September 4, 2014</u>
<u>Ladda Meesuk</u>		<u>September 4, 2014</u>

From: **Kusumawadee Utispan** kusumawadee.utispan@gmail.com
Subject: Re: Your Submission
Date: July 31, 2558 BE at 3:41 PM
To: **sittichai koontongkaew** koontongkaew@gmail.com

ขอบคุนค่ะ

On Fri, Jul 31, 2015 at 3:35 PM, sittichai koontongkaew <koontongkaew@gmail.com> wrote:

Dear ku
Pls find reviewer comments
Take care
Sittichai

----- Forwarded message -----

From: "Journal of Dental Sciences" <JDS@ads.org.tw>
Date: Oct 16, 2014 9:59 AM
Subject: Your Submission
To: <koontongkaew@gmail.com>
Cc:

Ms. Ref. No.: JDS-D-14-00281
Title: In vitro antibacterial and antiadherence effects of propolis extracted from Trigona sirindhornae, a new species of stingless bee.
Journal of Dental Sciences

Dear Sittichai,

The reviewers have commented on your above paper. They indicated that it is not acceptable for publication in its present form.

However, if you feel that you can suitably address the reviewers' comments (included below), I invite you to revise and resubmit your manuscript.

Please carefully address the issues raised in the comments.

If you are submitting a revised manuscript, please also:

a) outline each change made (point by point) as raised in the reviewer comments

AND/OR

b) provide a suitable rebuttal to each reviewer comment not addressed

To submit your revision, please do the following:

1. Go to: <http://ees.elsevier.com/jds/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Needing Revision]
I look forward to receiving your revised manuscript.

Yours sincerely,

Editorial Office EO
JDS Editorial Office
Journal of Dental Sciences

Reviewers' comments:

Reviewer #1: This study is about the inhibitory effect of propolis isolated from *T. sirindhornae* on *Streptococcus mutans*. In general, experiments in this study were well designed, and the manuscript was well prepared. However, correction related to the following issues should be addressed.

Suggestions for the manuscript:

M&M:

p2, line 38: Only the origin of the beehives was reported. When the anti-oxidant property of propolis varies between propolis harvested in different seasons (Simões-Ambrosio LM et al., 2010), harvesting season should also be provided.

p2, line 45: Please cite references of the method for propolis extraction, if the protocol is set up based on other published studies.

p5, line 12: Standards of flavonoids and cinnamic acids were subjected to HPLC analyses as controls. As shown in Fig. 4A, 4 peaks represented these four molecules were obtained, suggesting a mixture containing these four molecules was used. Details describing the preparation of the mixture, i.e. the concentration of each molecules, (or the usage of a commercial product) should be included.

Results:

p6, line 7: The paragraph refers to Figs 4B&C. However, only Fig. 4B was shown.

Discussion:

p6, line19: according to the HPLC analyses, four likely molecules that could inhibit the viability of *S. mutans* (apigenin, pinocembrin, p-coumaric acid and caffeic acids) were not shown to be present in propolis isolated from *T. sirindhornae*. When the composition of propolis from different origins would determine the effect of propolis on *S. mutans*, differences in components of propolis isolated from *T. sirindhornae* and other origins should be compared in the discussion, if information is available. Additionally, molecules other than apigenin, pinocembrin, p-coumaric acid and caffeic acids that could affect *S. mutans* should also be discussed.

p6, line 36: in the Koo's study (the 18th reference), apigenin had no antibacterial effects against *mutans streptococcus*. This conclusion was based on the antibacterial assays using mature biofilms, which were formed on glass slides for 5 days. However, in this study, the antibacterial assay was conducted using suspending cultures. Although bacteria in biofilm do not always tolerate to antimicrobial compounds, when compared to planktonic cells, studies suggest that formation of biofilm help bacteria to defense antimicrobial compounds (reviewed by Pamp 2008). Thus, to state that "these data partially agreed with the results", citing other studies also using planktonic cells would be better.

Reviewer #2: This study investigated the extract of propolis from *T. sirindhornae* on vitality and adhesion. Positive controls and negative controls were used in experiments to validate analysis. Apigenin is the parallel control.

1. Authors identified that the effects of extract on bact vitality, adhesion and GTFB expression were similar to apigenin. This reviewer concerns what is the biological concentration of propolis extract compatible to human cells. It is also unclear what could be the equivalence between propolis extract and apigenin regarding dosage. Would it be better if the low concentration of propolis is superior to apigenin regarding bact killing? These critical issues need to be addressed.

2. No time lapse experiments provided. It is still unclear if propolis extract is better than epigenin for a longer period use.

3. Although this extract may modulate the GTFB expression, the mechanism underlying the effect is unaddressed.

4. A blockage experiment is also required to show that the change of GTFB expression is fundamental to the change of bact phenotypes.

.....
Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here: http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

--
Kusumawadee Utispan PhD. (Medical Biochemistry)
Faculty of Dentistry, Thammasat University, Paholyothin Road,
Pathumthani, Thailand 12121
Tel: 02-986-9213-7151
Fax: 02-986-9205
Mobile: +66 81717 2775
e-mail: kusumawadee.utispan@gmail.com



ที่ ศธ 0516.23/บว.05/ ๒๘

คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ต. คลองหนึ่ง อ.คลองหนึ่ง จ.ปทุมธานี

12120

หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อรับรองว่า อ.ดร.บดีนทร์ ชิตกุล ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ได้เป็นผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัย เรื่อง พัฒนายาไหลเพื่อรักษาโรคหืด รหัสสัญญา กภท. 3/2556 ลงวันที่ 5 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 ระยะเวลาภายใน 3 ปี ครบกำหนด วันที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 ผู้รับทุน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โดยมี ศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. สิทธิชัย ขุนทองแก้ว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย โดย อ.ดร.บดีนทร์ ชิตกุล รับผิดชอบในเรื่องการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญในไหล

ขอรับรองว่าข้อความข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ให้ไว้ ณ วันที่ 1 กันยายน พ.ศ. 2558

(ศ.ทพ.ดร.สิทธิชัย ขุนทองแก้ว)

หัวหน้าโครงการวิจัย

หน่วยวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์

โทรศัพท์ 02-986-9213 ต่อ 7127-8

แบบเสนอแผนงานวิจัย (Research Program)

ประกอบการเสนอของบประมาณกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย

(ปรับปรุงใหม่ 15 มีนาคม 2555)

แผนงานวิจัย (ภาษาไทย) การพัฒนาจากไพลเพื่อการรักษาโรคหืด

(ภาษาอังกฤษ) Drug development from Phlai (*Zingiber cassumunar*
Roxb.) for asthma treatment

โครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย

การวิจัยที่ 1 (ภาษาไทย) การเตรียมสารสำคัญจากไพลและการทดสอบคุณสมบัติด้านการอักเสบ
นอกกาย

(ภาษาอังกฤษ) Isolation of constituents from phlai and determination of their
anti-inflammatory properties: An *in vitro* studies

การวิจัยที่ 2 (ภาษาไทย) การเตรียมยาจากสารสกัดไพลมาตรฐาน

(ภาษาอังกฤษ) Drug preparation from standardized phlai extract (SPE)

การวิจัยที่ 3 (ภาษาไทย) ผลของสารสกัดไพลมาตรฐานต่อการต้านการอักเสบ และยับยั้งการหดตัวของหลอดลมหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยฮิสตามีน

(ภาษาอังกฤษ) Anti-inflammatory and inhibitory effect of standardized phlai extract
on histamine-induced contraction in rat trachea

การวิจัยที่ 4 (ภาษาไทย) ความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดไพลมาตรฐานในหนู

(ภาษาอังกฤษ) Acute and chronic Toxicities of standardized phlai extract in
rats

การวิจัย ที่ 5 (ภาษาไทย) ผลของการได้รับสารสกัดไพลมาตรฐานต่อเภสัชจลนศาสตร์ของ
compound D ในมนุษย์

(ภาษาอังกฤษ) Effect of standardized phlai extract ingestion on the pharmacokinetics
of compound D in humans.

โครงการวิจัยที่ 6 (ภาษาไทย) ประสิทธิภาพของยาไพลในการรักษาผู้ป่วยโรคหืด

(ภาษาอังกฤษ) Clinical efficacy of a herbal drug containing standardized phlai extract in
the treatment of asthmatic patients

ส่วน ก : องค์ประกอบในการจัดทำแผนงานวิจัย

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ภญ. ทวีผล เดชาดิวงส์ ณ อยุธยา

ที่ปรึกษา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

โทรศัพท์ 02-5731581

ผู้รับผิดชอบและหน่วยงาน ประกอบด้วย

1.1 ผู้อำนวยการแผนงาน

ศ.ทพ.ดร. สิทธิชัย ขุนทองแก้ว

ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน คณะทันตแพทยศาสตร์ และ หน่วยวิจัย สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคหืด
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

โทรศัพท์ 02-9869213 ต่อ 7127

โทรสาร 02-5165385

Email: koontongkaew@yahoo.com

1.2 ผู้ร่วมงานวิจัยหลัก

1.2.1 อ.ทพญ. ดร. กมลพรรณ ปักดี

Kamolpam Pugdee

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ทำงาน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ถนนพหลโยธิน
อ.คลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

โทรศัพท์ 02-986-9206 โทรสาร 02-986-9205

E-mail: oom_na@yahoo.com

1.2.2 รศ. ครสึวบูรณ์ สิริรัฐวงศ์

Seewaboon Sireeratawong

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน สาขาเภสัชวิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ฟรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง

จ.ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ 02-926-9710-11

โทรสาร 02-926-9710-11

E-mail: seewaboon@gmail.com

1.2.3 รศ. ภญ. ดร.วีณา จิรัชฌิยากุล

Weena Jiratchariyakul

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

447 ถ. ศรีอยุธยา พญาไท ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ 0-2644-8677-89 ต่อ 5523, 4400, 081-985-2811

1.2.4 รศ. ภญ. ดร.ฤดี เสาวคนธ์

Ruedee Saowakon

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน โครงการผลิตภัณฑ์สมุนไพรคุณภาพ คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล 447 ถ. ศรีอยุธยา พญาไท ราชเทวี

กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ 0-2644-8677-89 ต่อ 4400, 4401

1.2.5 ภญ. ดร. ประคองศิริ บุญคง

Prakongsiri Boonkong

สถานที่ทำงาน ศูนย์พัฒนาฯ ไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์

ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข

โทรศัพท์ 089-777-6112

Email: prakongs@yahoo.com

1.2.6 ผศ. นพ.อภิชาติ คณิศทรัพย์

Apichart Khanichap

ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัด

ปทุมธานี 12120 โทรศัพท์ 02-92699289 โทรสาร 02-9269485

E-mail : apidocor@hotmail.com

1.2.7 รศ. พญ. อรพรรณ โพชนุกูล

Orapan Poachanukoon

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน หน่วยวิจัย สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคหืด

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

โทรศัพท์ 02-92699289

โทรสาร 02-9269485

Email: orapanpoachanukoon@yahoo.com

md.orapanpoachanukoon@gmail.com

1.2.8 รศ. นพ. ชัยชาญ โพธิรัตน์

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน หน่วยวิชาโรคระบบการหายใจ เวชบำบัดวิกฤตและภูมิแพ้

ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โทรศัพท์ 053-946229, 053-946396 โทรสาร 053-907066

1.2.9 รศ. นพ. วัชร บัญสวัสดิ์

ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โทรศัพท์ 043-237686 โทรสาร 043-348375

1.2.10 นพ. ธวัชชัย วิวัฒน์วรพันธ์

สถานที่ทำงาน กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลมหาราช จ.นครราชสีมา

โทรศัพท์ 0816600364

Email wtawatchai@yahoo.com

1.2.11 อ. ดร.บดินทร์ ชิตกุล

Bordin Chitkul

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

จังหวัดกรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10240

โทรศัพท์ 082-3108400 โทรสาร 082-3108401

Email Address: b_chitkul@ru.ac.th

1.2.12 อ. ทพญ. วิสาखा อุปพงศ์

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ทำงาน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ถนนพหลโยธิน

อ.คลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

โทรศัพท์ 02-9869213 ต่อ 7127 โทรสาร 02-516538

Email Address: b_chitkul@ru.ac.th

1.3 หน่วยงานหลัก

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

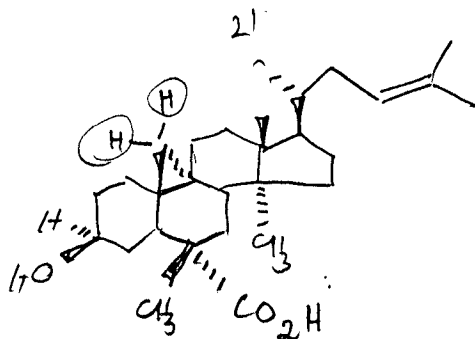
1.4 หน่วยงานสนับสนุน

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา

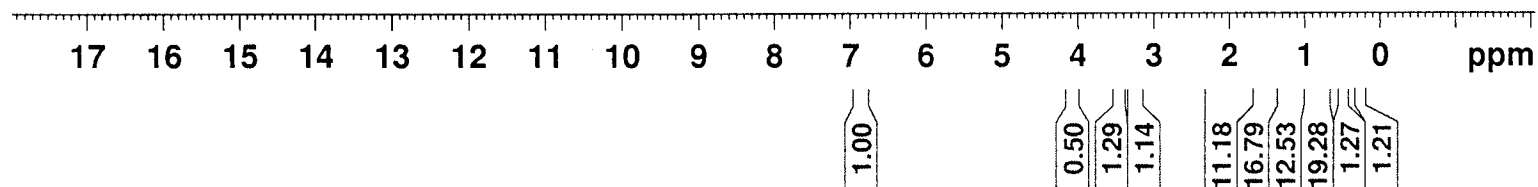


Current Data Parameters
NAME bc-ru-1394
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110621
Time 10.38
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 0
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447731 sec
RG 143.7
DW 62.400 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 5.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 6.40 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1332010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1300178 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.00



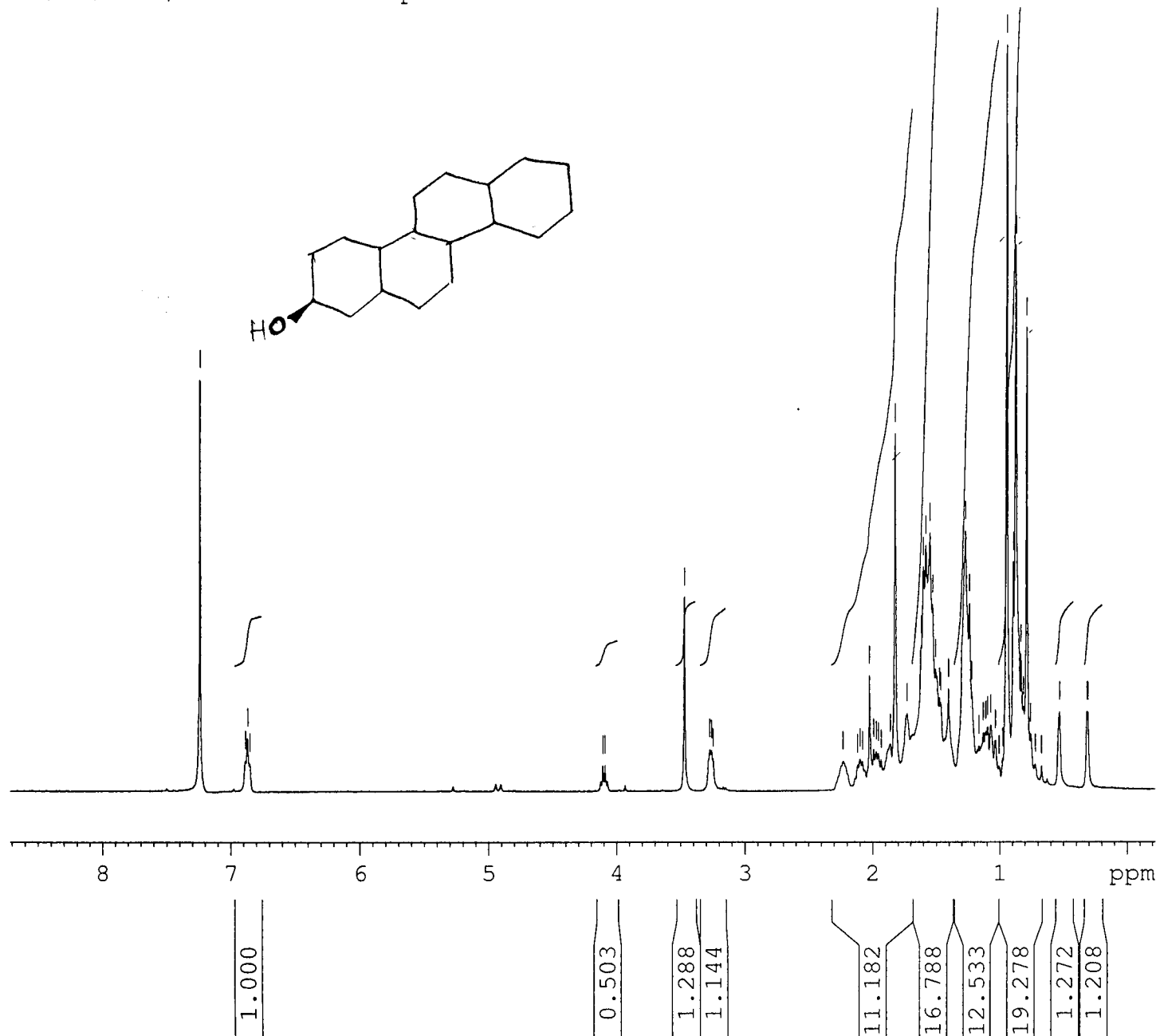
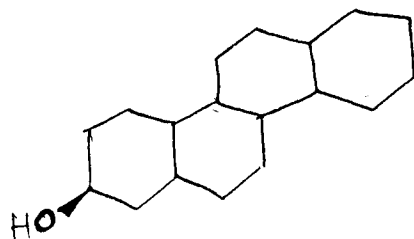


Current Data Parameters
 NAME bc-ru-1394
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20110621
 Time 10.38
 INSTRUM AV400
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 0.244532 Hz
 AQ 2.0447731 sec
 RG 143.7
 DW 62.400 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 D1 5.00000000 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 6.40 usec
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 400.1332010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 400.1300178 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00



PB-02-CH-11/fr 3 in CDCl3 pu

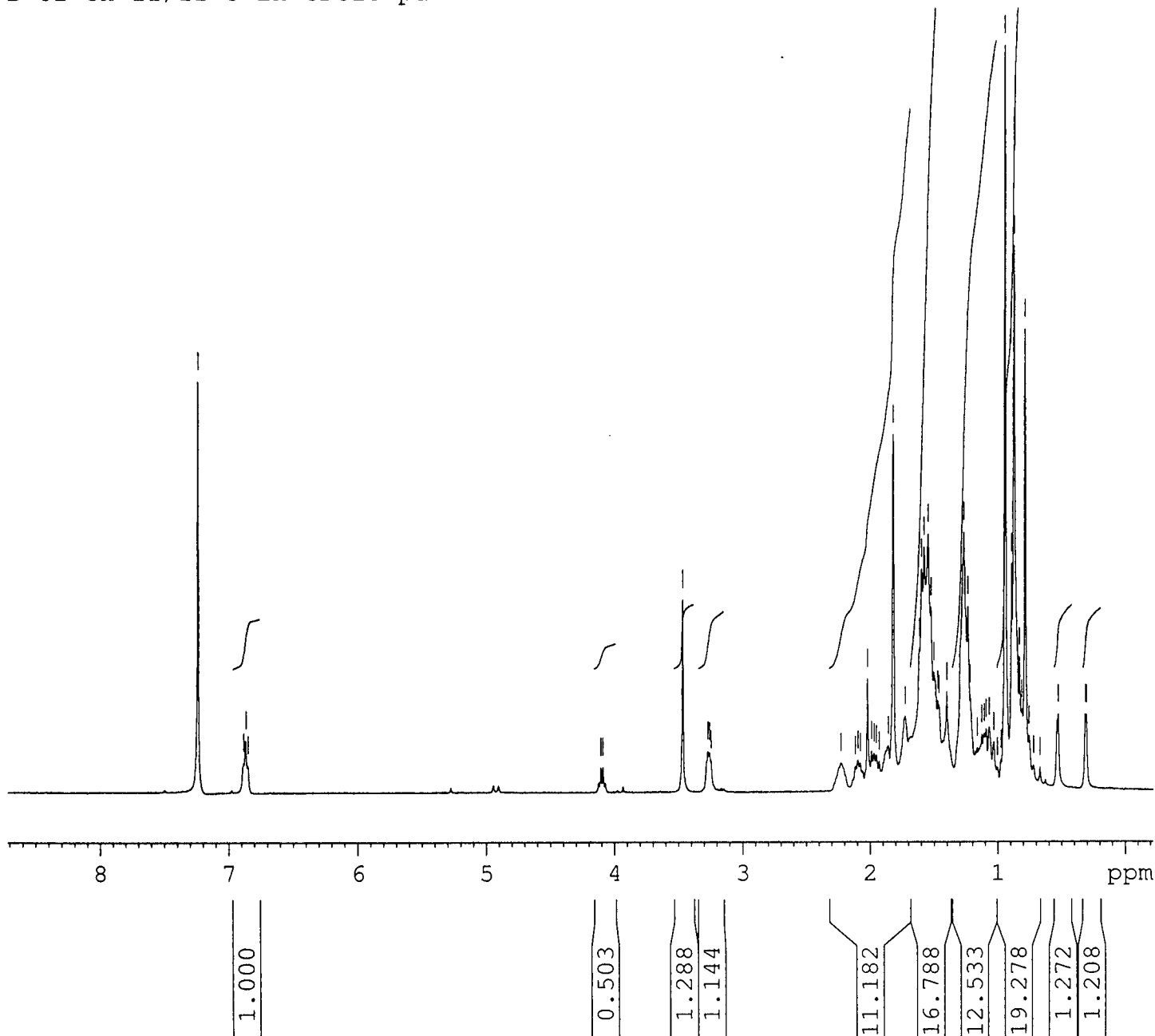


Current Data Parameters
NAME bc-ru-1394
EXPNO 1
PROCNO 1

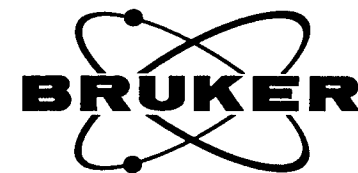
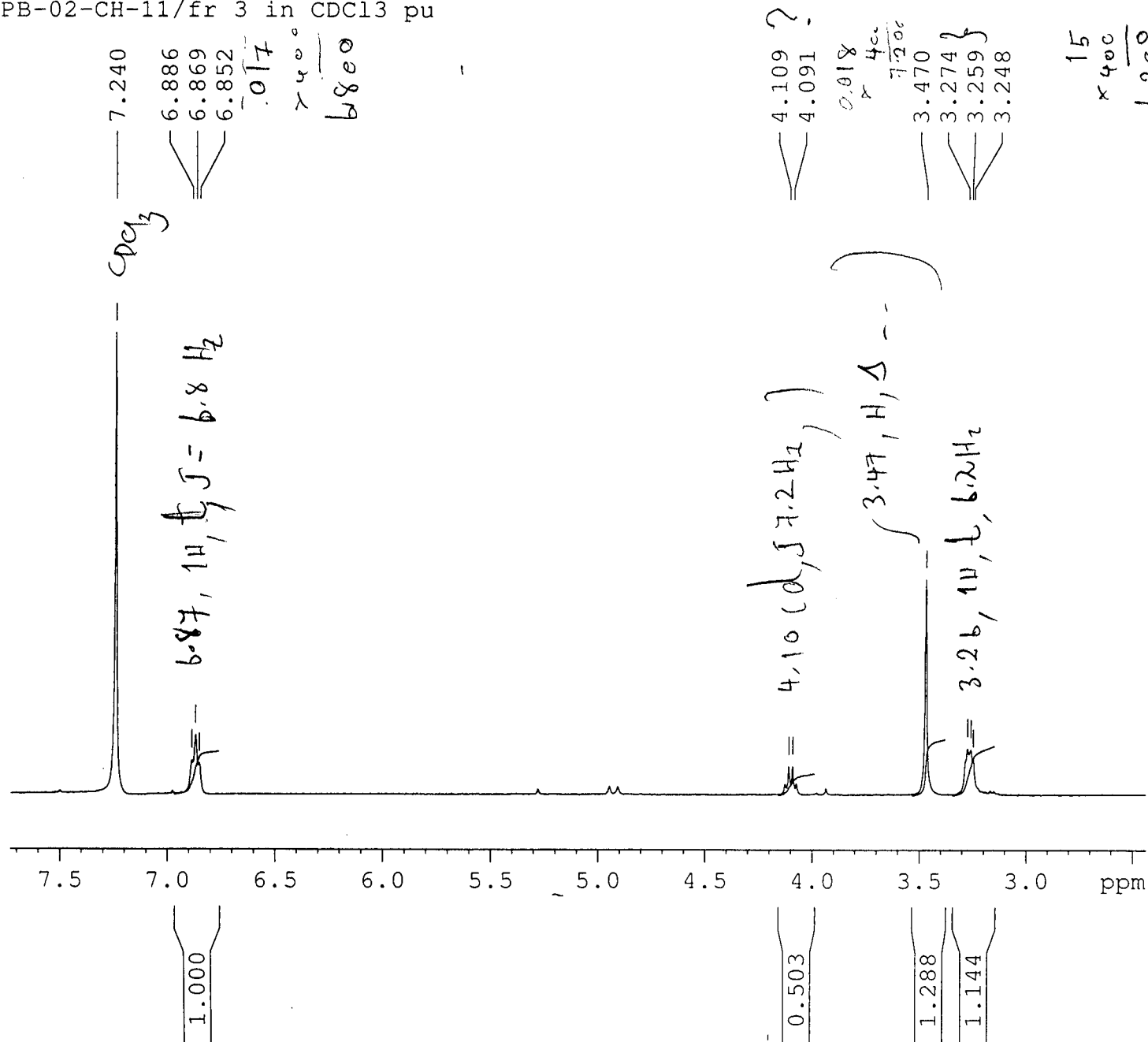
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110621
Time 10.38
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 0
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447731 sec
RG 143.7
DW 62.400 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 5.0000000 sec
MCREST 0.0000000 sec
MCWRK 0.0150000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 6.40 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1332010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1300178 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.00



PB-02-CH-11/fr 3 in CDCl₃ pu

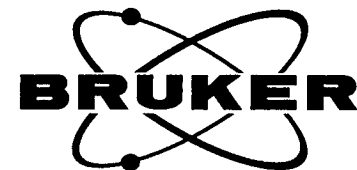


Current Data Parameters
NAME bc-ru-1394
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110621
Time 10.38
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg
TD 32768
SOLVENT CDCl₃
NS 16
DS 0
SWH 8012.820 Hz
FIDRES 0.244532 Hz
AQ 2.0447731 sec
RG 143.7
DW 62.400 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 5.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 6.40 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1332010 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1300178 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.00

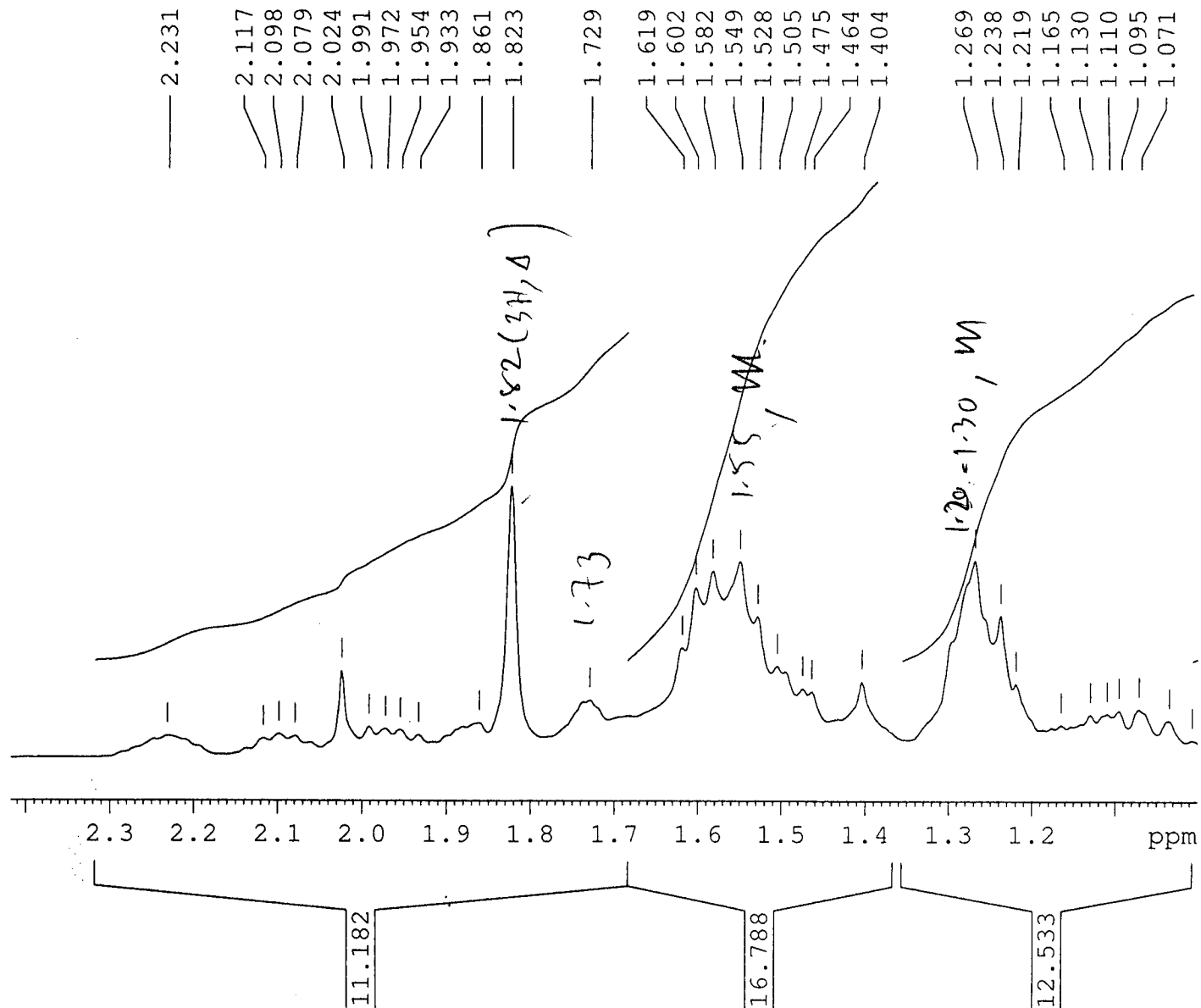


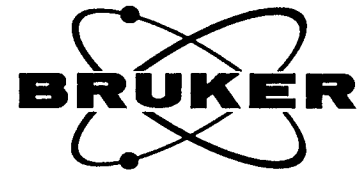
Current Data Parameters
 NAME bc-ru-1394
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20110621
 Time 10.38
 INSTRUM AV400
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 0.244532 Hz
 AQ 2.0447731 sec
 RG 143.7
 DW 62.400 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 D1 5.00000000 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 6.40 usec
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 400.1332010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 400.1300178 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00



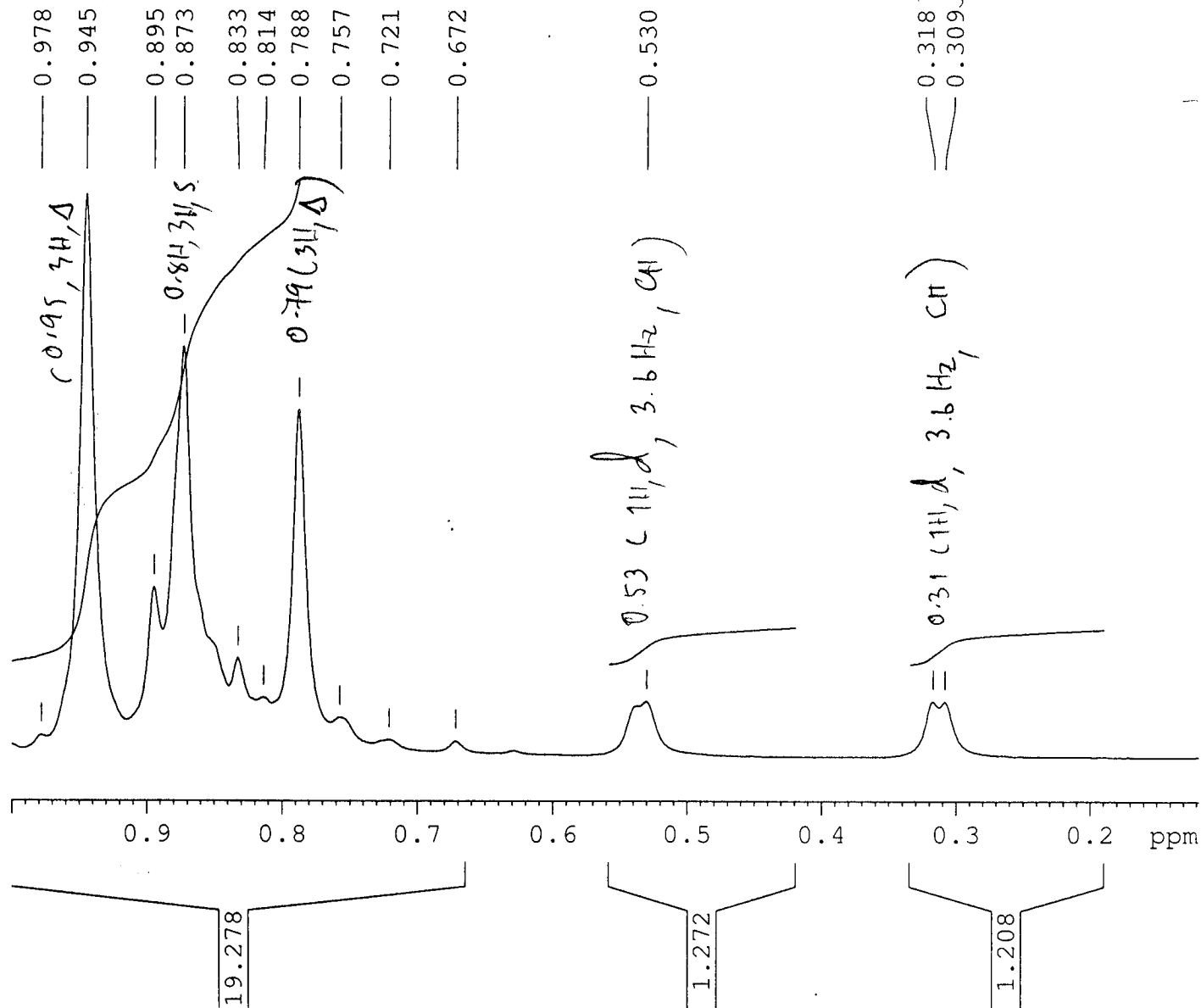


Current Data Parameters
 NAME bc-ru-1394
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20110621
 Time 10.38
 INSTRUM AV400
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 0
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 0.244532 Hz
 AQ 2.0447731 sec
 RG 143.7
 DW 62.400 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 D1 5.00000000 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 6.40 usec
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 400.1332010 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 400.1300178 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00



พรอพอลิส:ของขวัญจากธรรมชาติ

Propolis: A Gift from Nature

บทคัดย่อ

พรอพอลิสเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากผึ้งโดยผึ้งเก็บยางเหนียวมาจากพืชแล้วนำมาสะสมไว้ที่รัง มีการนำพรอพอลิสมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคต่างๆ มาตั้งแต่อดีตจนกระทั่งปัจจุบัน จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสพบว่าพรอพอลิสที่ได้จากบริเวณที่มีอุณหภูมิประเทศแตกต่างกันมักจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันด้วยซึ่งจะส่งผลให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของพรอพอลิสแตกต่างกันไป ปัจจุบันประชาชนรู้จักพรอพอลิสมากขึ้นเนื่องจากการนำพรอพอลิสมากขึ้นเนื่องจากรู้จักนำพรอพอลิสมาใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอาง สบู่ และยาสีฟัน เป็นต้น ทางด้านงานวิจัยพบว่าในทุกๆปีมีวารสารนานาชาติมากมายที่ตีพิมพ์เกี่ยวกับพรอพอลิส เนื่องจากพรอพอลิสมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายและน่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านเนื้องอก ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านจุลชีพ เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านเนื้องอกของพรอพอลิสนั้นอยู่ในความสนใจของนักวิจัยจำนวนมากจนกระทั่งปัจจุบันมีการศึกษาถึงระดับกลไกในการต้านเนื้องอกของสารสำคัญจากพรอพอลิส ดังนั้น พรอพอลิสเป็นสมุนไพรที่ยังคงอยู่ในความสนใจ และมีงานวิจัยออกมาอย่างต่อเนื่องนับว่าพรอพอลิสเป็นความมหัศจรรย์ที่ได้จากธรรมชาติโดยแท้จริง

คำสำคัญ: พรอพอลิส, propolis, ผึ้ง, ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, องค์ประกอบทางเคมี

Thai Pharm Health Sci J 2008;3(2):286-295

บทนำ

พรอพอลิส (propolis) หรือกาวผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีการนำไปใช้มาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ประเทศในแถบยุโรปและแอฟริกามีการนำพรอพอลิสมาใช้ตั้งแต่อดีตโดยใช้สมานแผล ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวชาวกรีก โรมัน และอียิปต์รู้จักเป็นเวลานานแล้ว นอกจากนี้ ยังมีการบันทึกเกี่ยวกับการนำพรอพอลิสไปใช้รักษาการติดเชื้อในช่องปากมดและลำคอด้วย¹

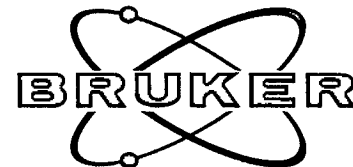
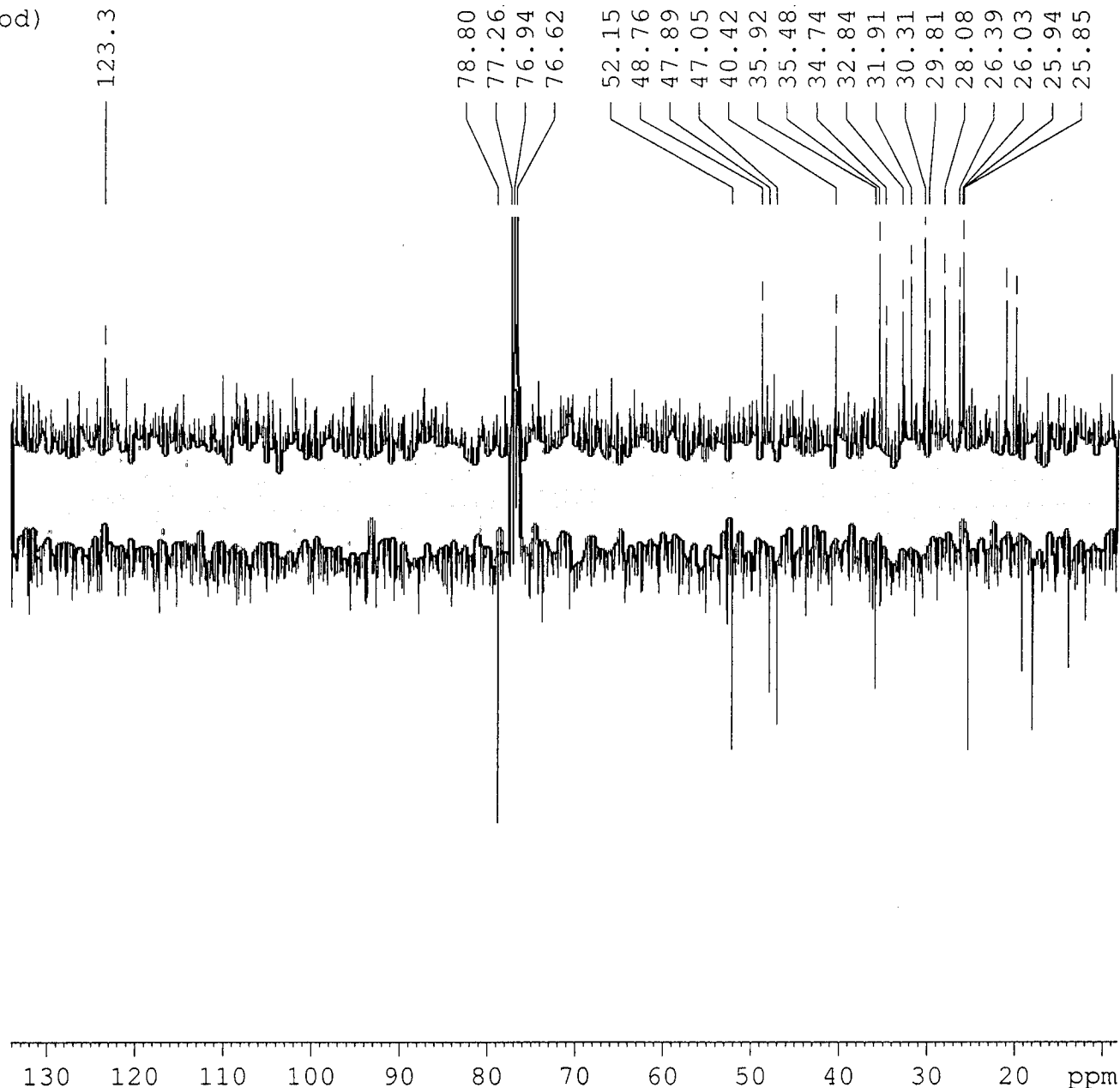
ปัจจุบันมีการนำพรอพอลิสมาใช้เป็นสมุนไพร และในบางประเทศทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีการกล่าวอ้างว่าสามารถใช้สมานแผล และรักษาโรคผิวหนังต่างๆ ได้แก่ สิว (acne) เริม (herpes simplex) และโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์เป็นยาชา (anaesthetic) และใช้รักษาโรคเหงือกอักเสบ (gingivitis) ได้ ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเครื่องอุปโภค บริโภค ก็นำพรอพอลิสมาเป็นส่วนประกอบด้วย เช่น ผลิตภัณฑ์รักษาสิว สบู่ ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก หรือยาสระผม โดยมีมุ่งเน้นคุณสมบัติด้านจุลชีพของพรอพอลิสเป็นสำคัญ^{2,3}

พรอพอลิสเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ได้จากผึ้ง ที่ไม่ใช่ขนน้ำผึ้ง (royal jelly) เกสรผึ้ง (bee pollen) น้ำผึ้ง (honey) หรือไขผึ้ง (beewax) แต่อาจมีส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ลักษณะโดยทั่วไปของพรอพอลิสเป็นยางเหนียว ซึ่งผึ้งเก็บสะสมไว้ที่รัง คำว่า “propolis” มาจากภาษากรีก โดย pro- หมายถึง

Pb-2-CH-7/24-34

¹³C (jmod)

123.3



Current Data Parameters
 NAME bc-ru-1392
 EXPNO 2
 PROCNO 1

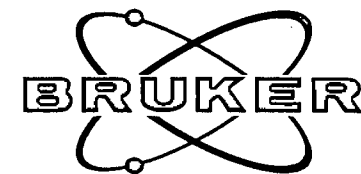
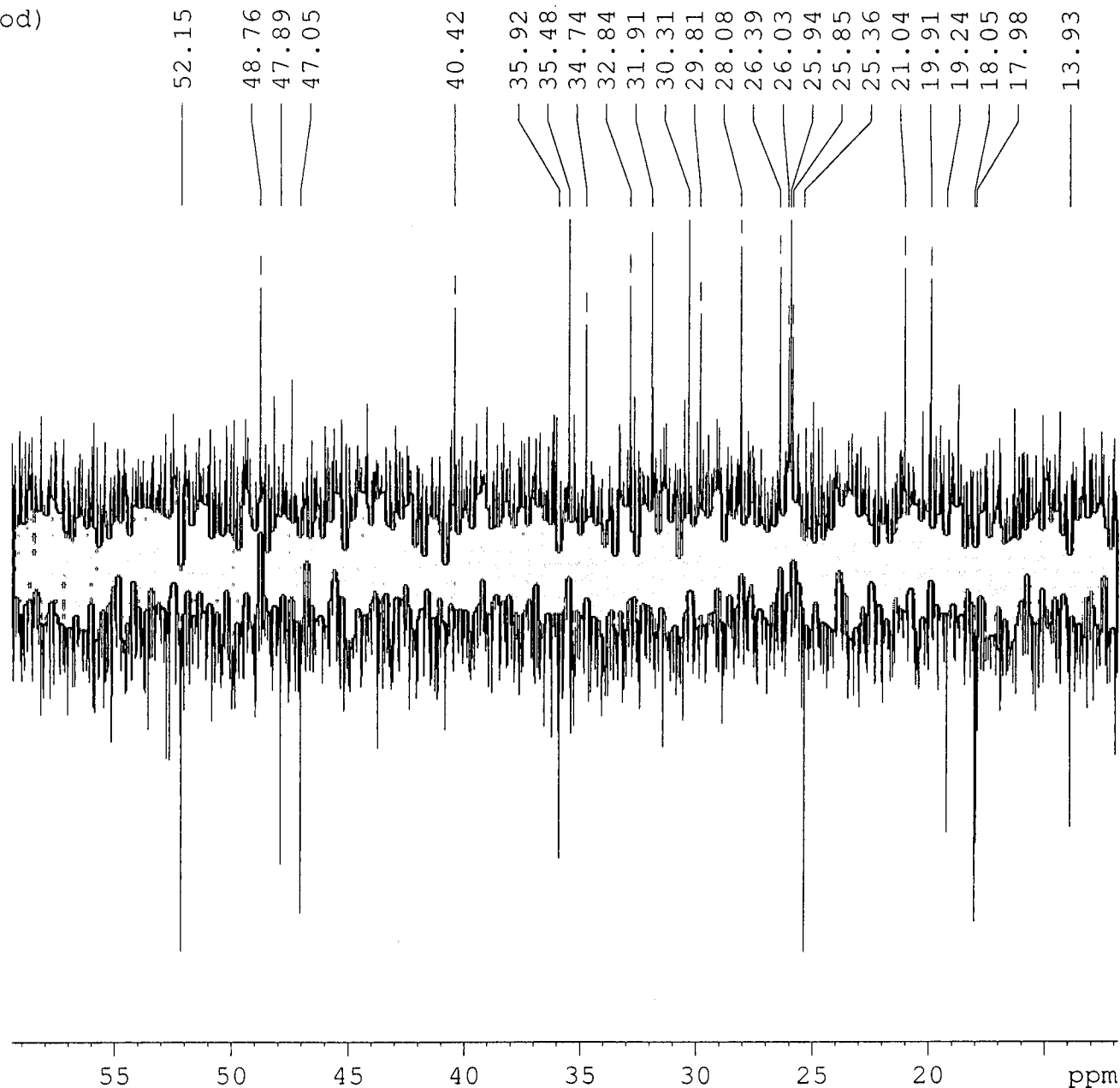
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20110601
 Time 4.32
 INSTRUM AV400
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG jmod
 TD 131072
 SOLVENT CDC13
 NS 3072
 DS 0
 SWH 25125.629 Hz
 FIDRES 0.191693 Hz
 AQ 2.6083827 sec
 RG 65536
 DW 19.900 usec
 DE 6.00 usec
 TE 0.0 K
 CNST2 139.0000000
 CNST11 1.0000000
 D1 2.00000000 sec
 d20 0.00719424 sec
 DELTA 0.00001757 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 13.80 usec
 p2 27.60 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 -3.00 dB
 PL12 20.00 dB
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 100.6127749 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

¹³C (jmod)



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1392
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110601
Time 4.32
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDCl3
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

13C (jmod)



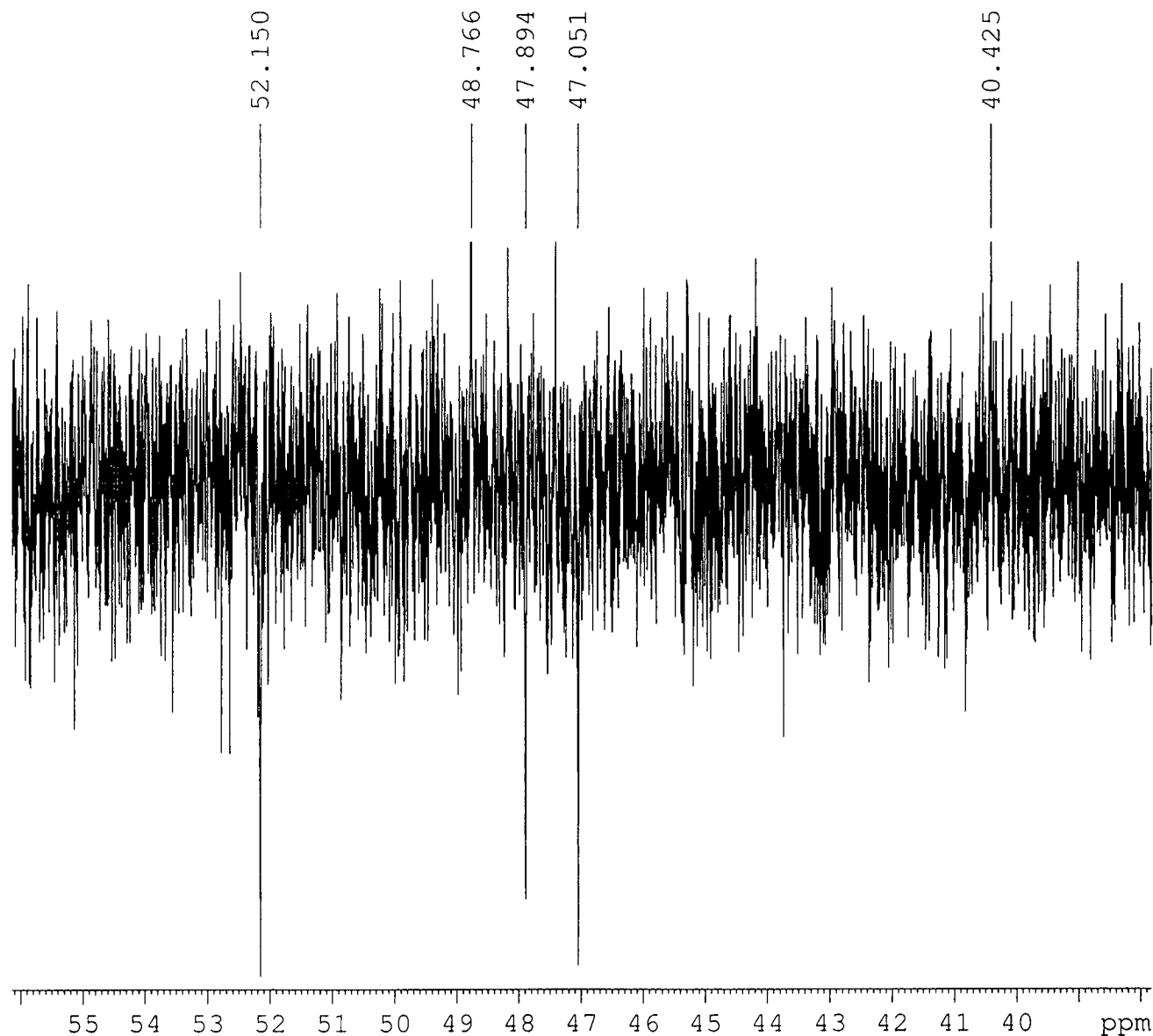
Current Data Parameters
NAME bc-ru-1392
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110601
Time 4.32
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

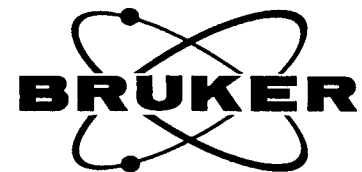
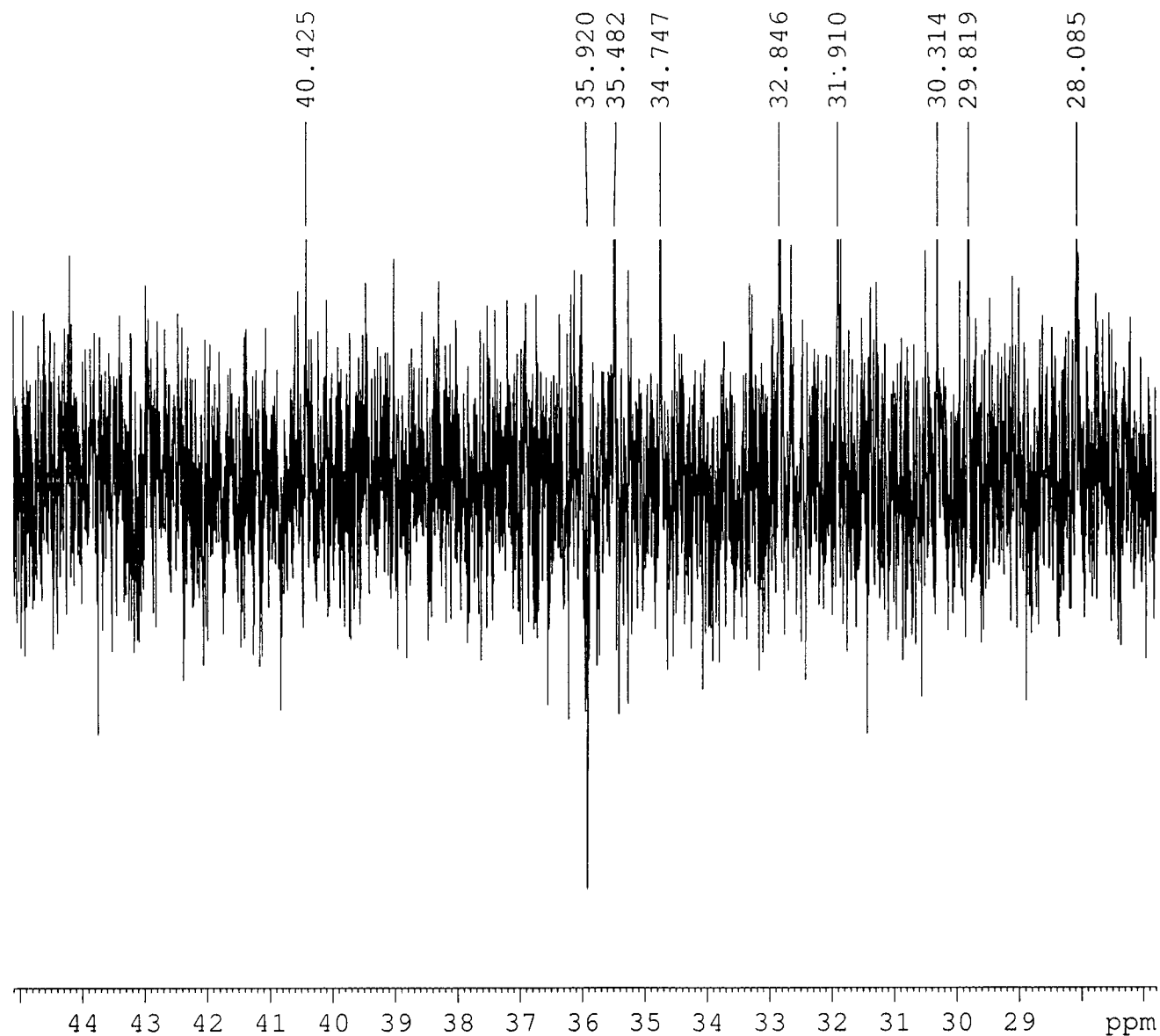
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



13C (jmod)



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1392
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110601
Time 4.32
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

¹³C (jmod)



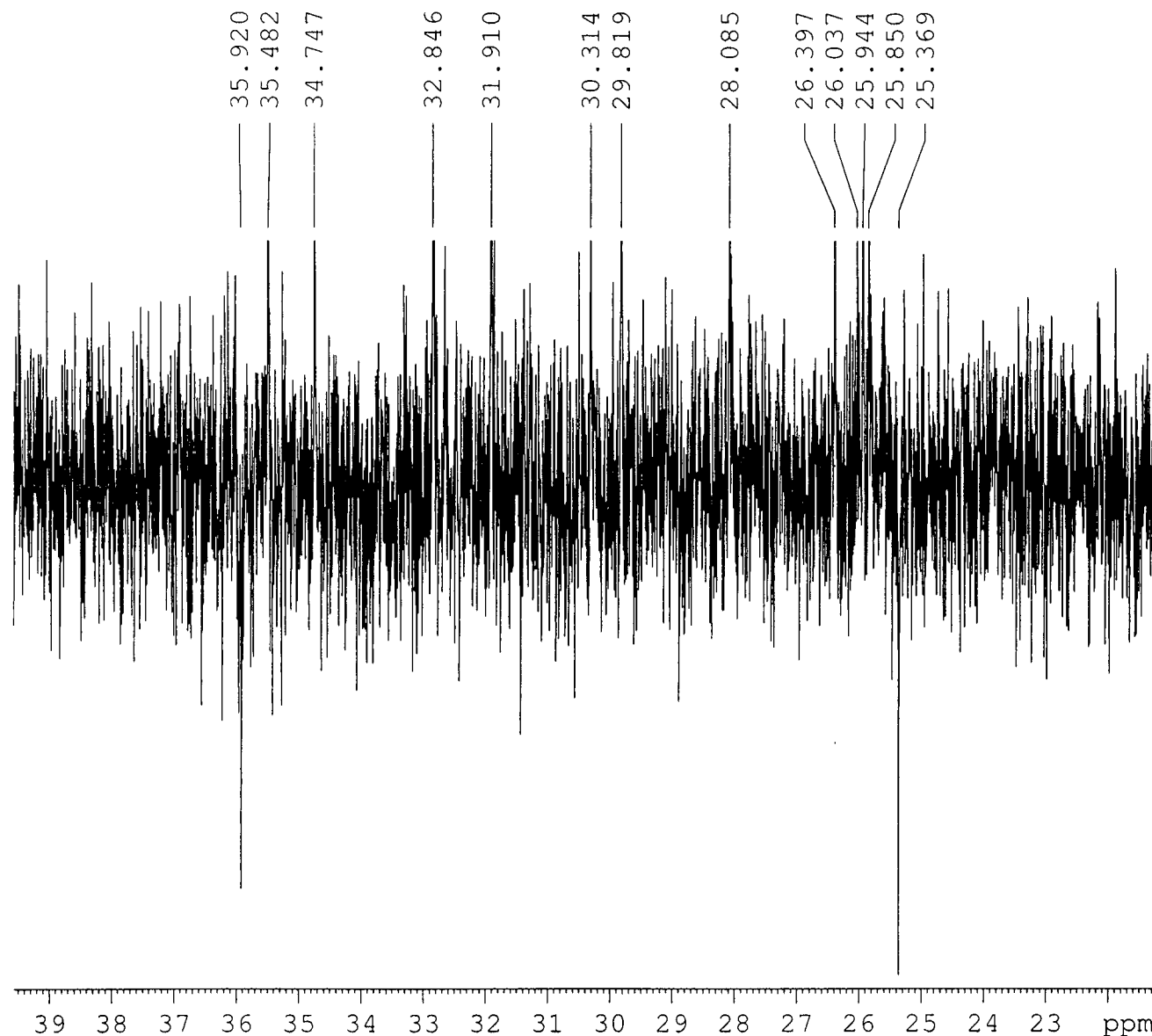
Current Data Parameters
NAME bc-ru-1392
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110601
Time 4.32
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

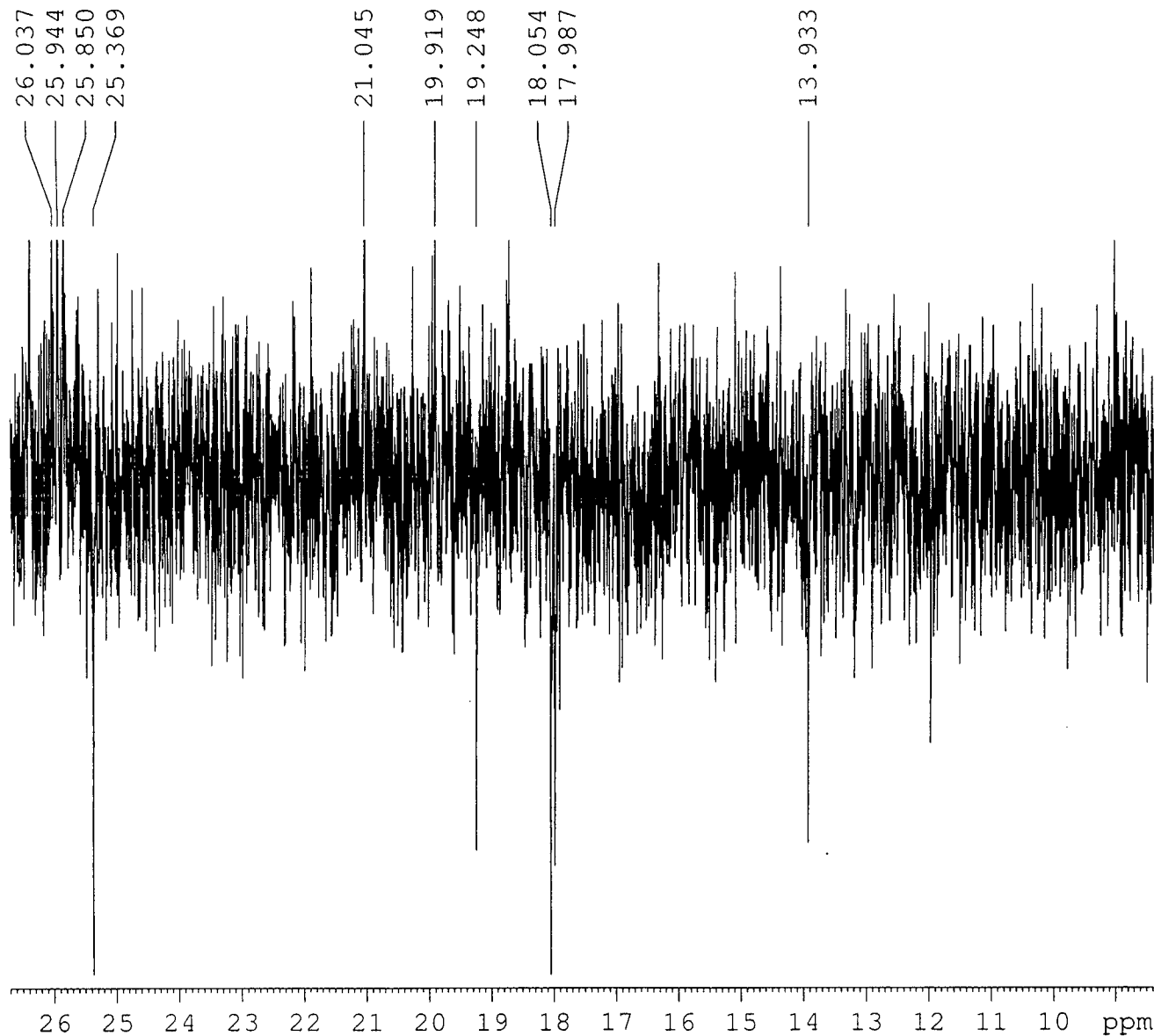
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1:00



13C (jmod)



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1392
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110601
Time 4.32
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Pb-01-CH-81/70-72 in CDCl₃

અવેકેવજી

૦૧/૦૪/૧૮



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365 ✓
EXPNO 1
PROCNO 1

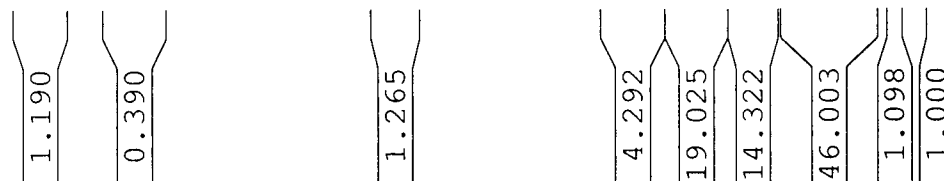
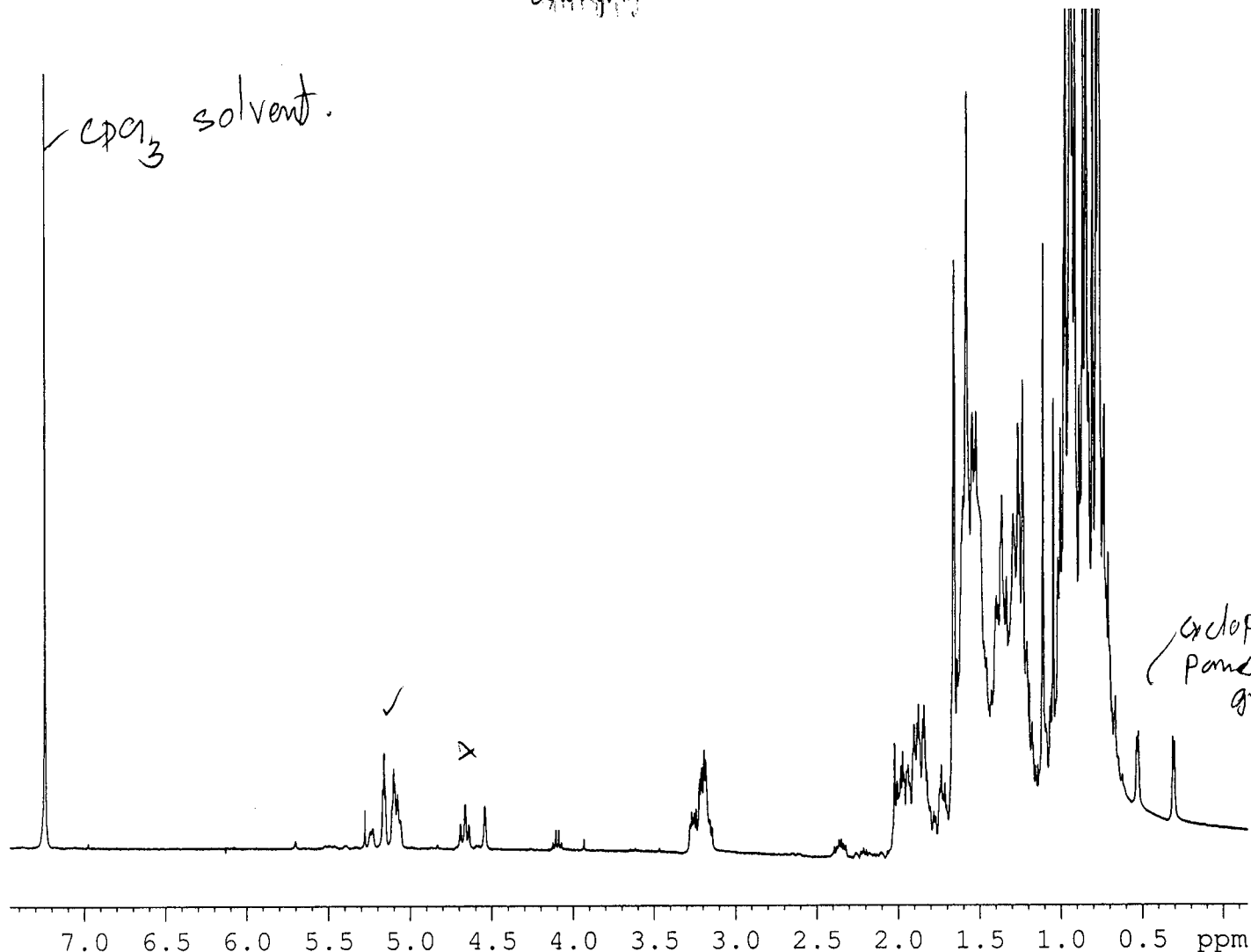
F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20110125
Time 9.56
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 16
DS 2
SWH 8278.146 Hz
FIDRES 0.126314 Hz
AQ 3.9584243 sec
RG 90.5
DW 60.400 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

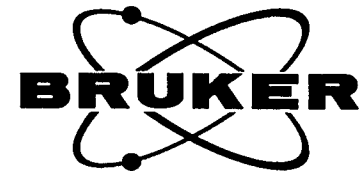
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 6.40 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters

SI 32768
SF 400.1300176 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Pb-01-CH-81/70-72 in CDCl3

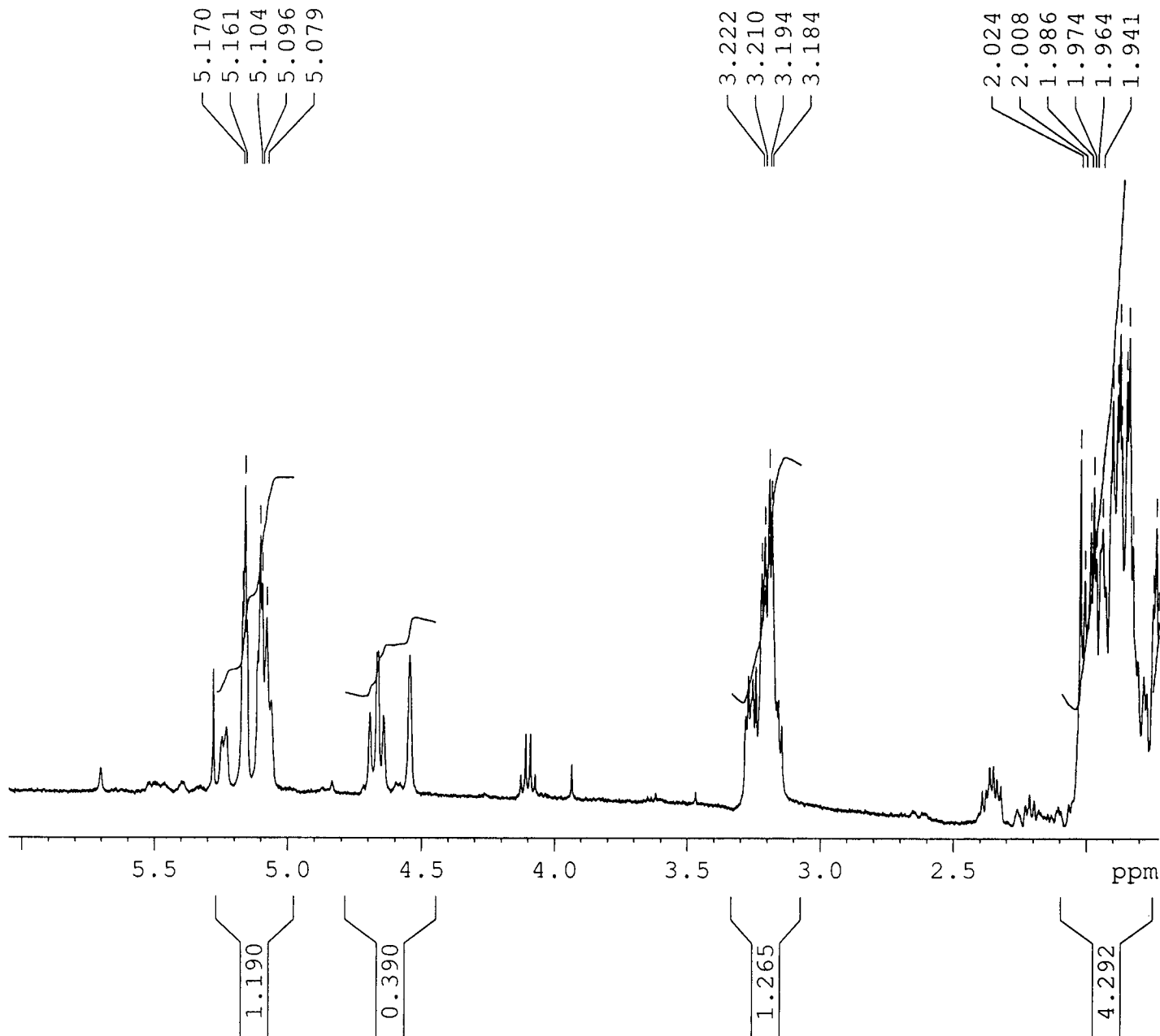


Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 1
PROCNO 1

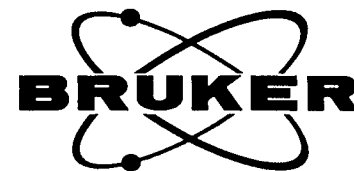
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 9.56
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 2
SWH 8278.146 Hz
FIDRES 0.126314 Hz
AQ 3.9584243 sec
RG 90.5
DW 60.400 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 6.40 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1300176 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Pb-01-CH-81/70-72 in CDCl₃

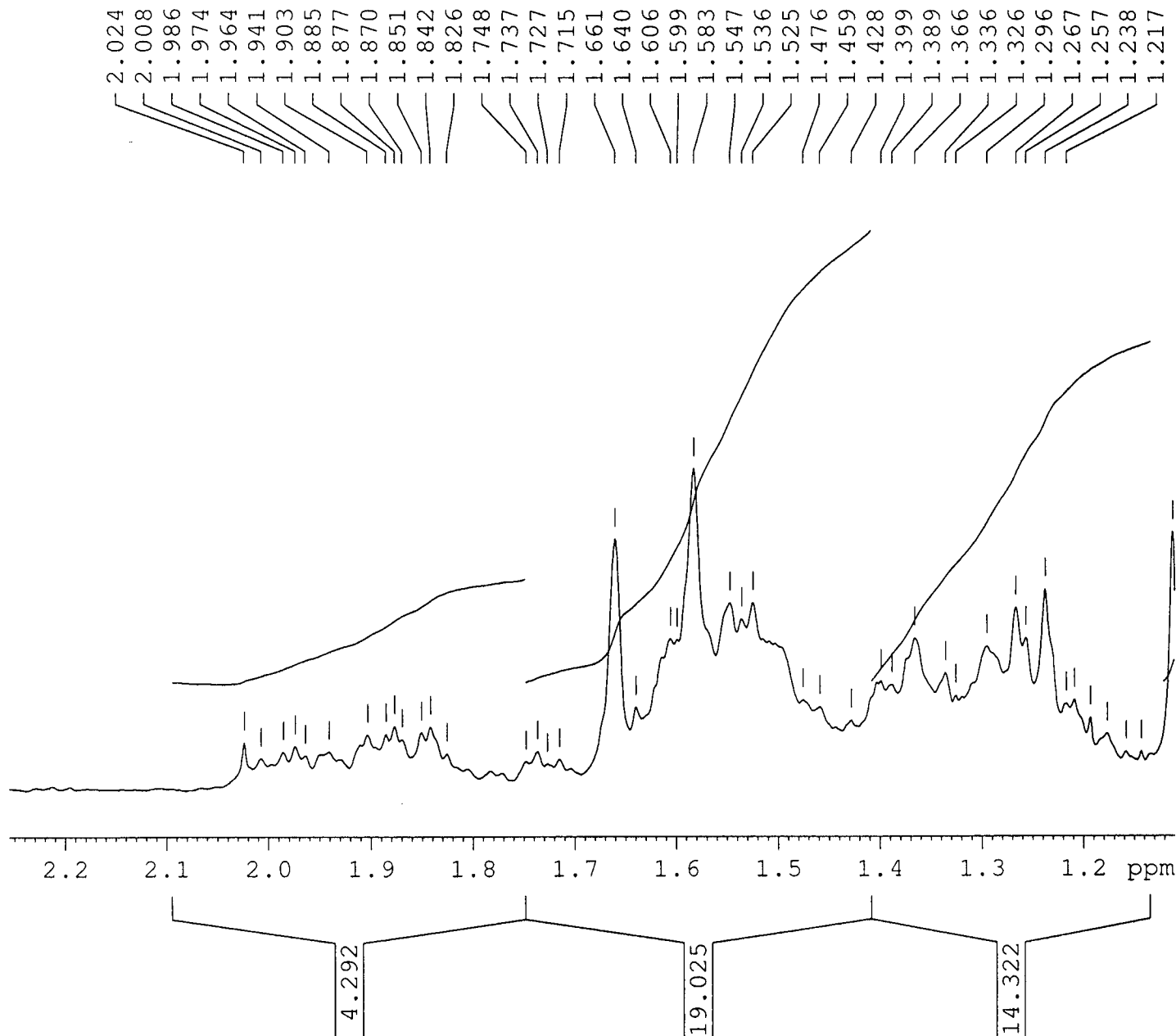


Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 9.56
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 16
DS 2
SWH 8278.146 Hz
FIDRES 0.126314 Hz
AQ 3.9584243 sec
RG 90.5
DW 60.400 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 6.40 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1300176 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



13C 2 BY

C-13 - NMR



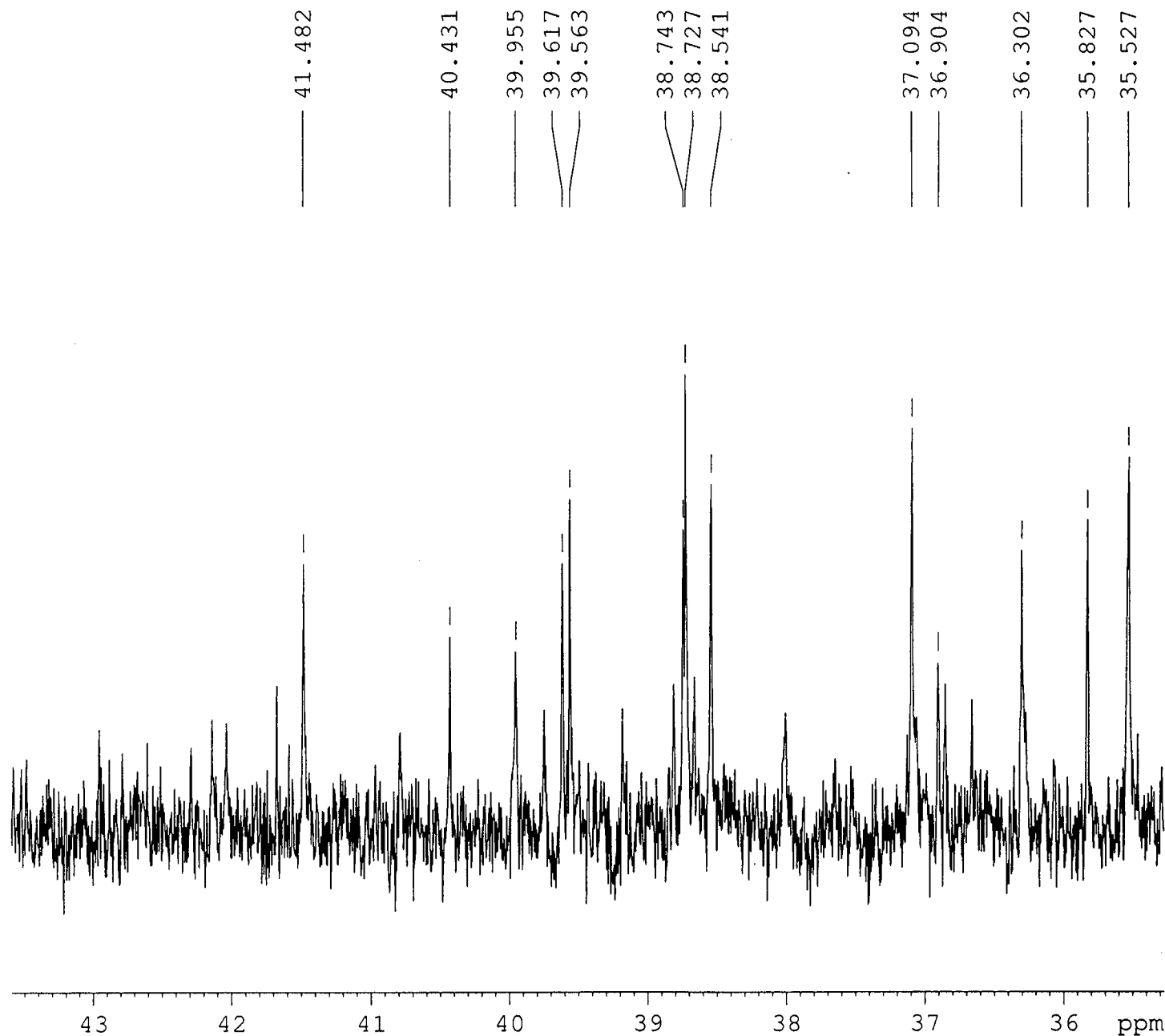
Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 14.43
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zgdc
TD 131072
SOLVENT CDCl3
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

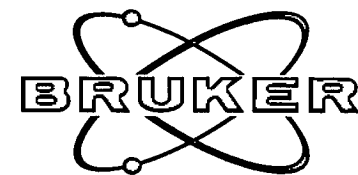
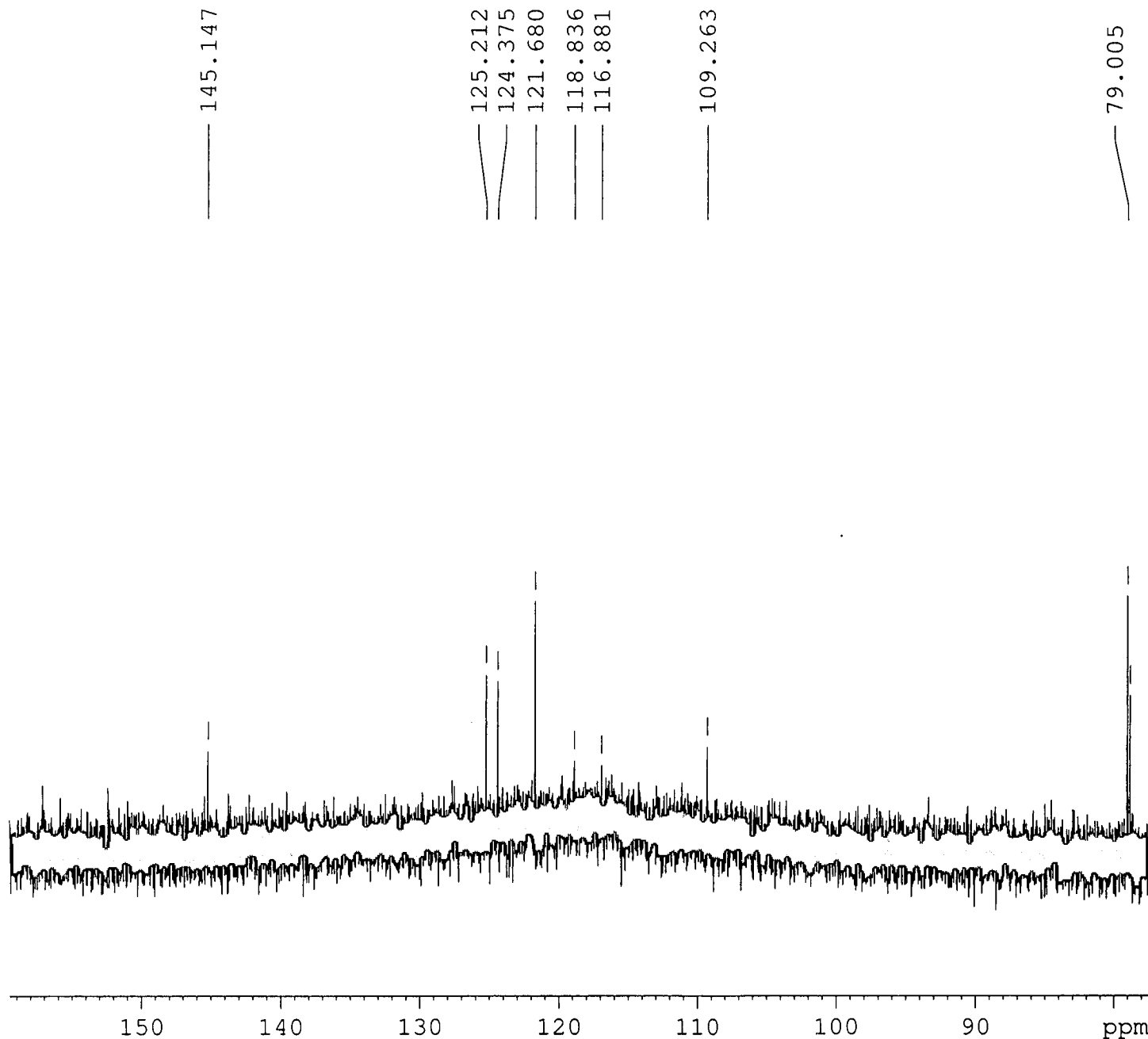
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6227297 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



13C 2 BY



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 3
PROCNO 1

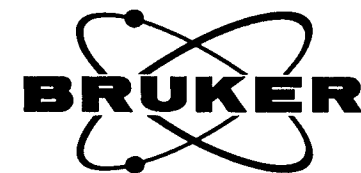
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 14.43
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zgdc
TD 131072
SOLVENT CDCl3
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6227297 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

13C 2 BY



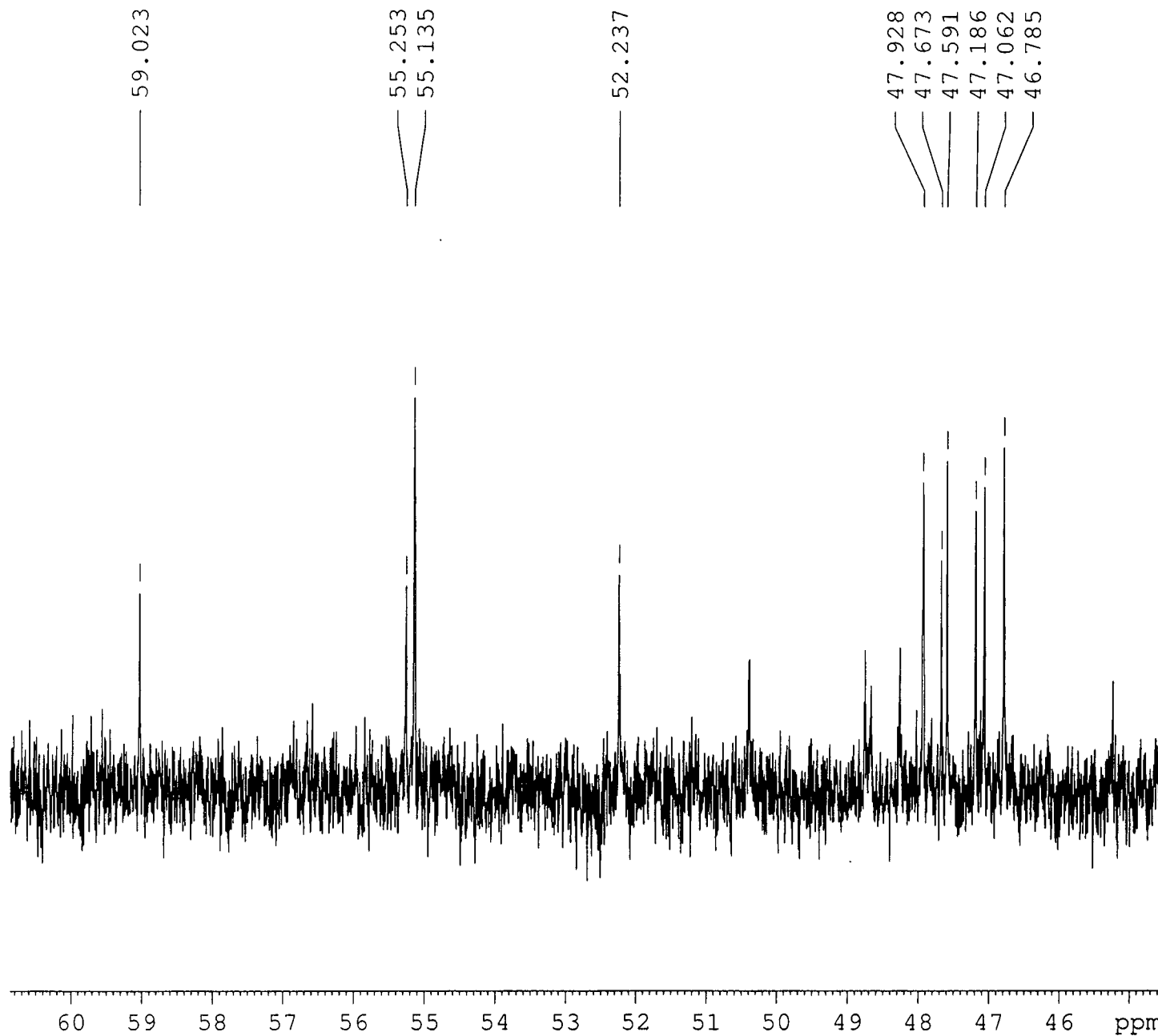
Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 14.43
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zgdc
TD 131072
SOLVENT CDCl3
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

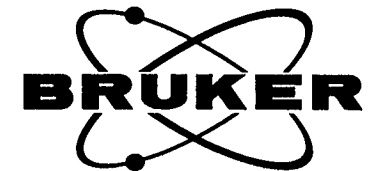
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6227297 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



13C 2 BY



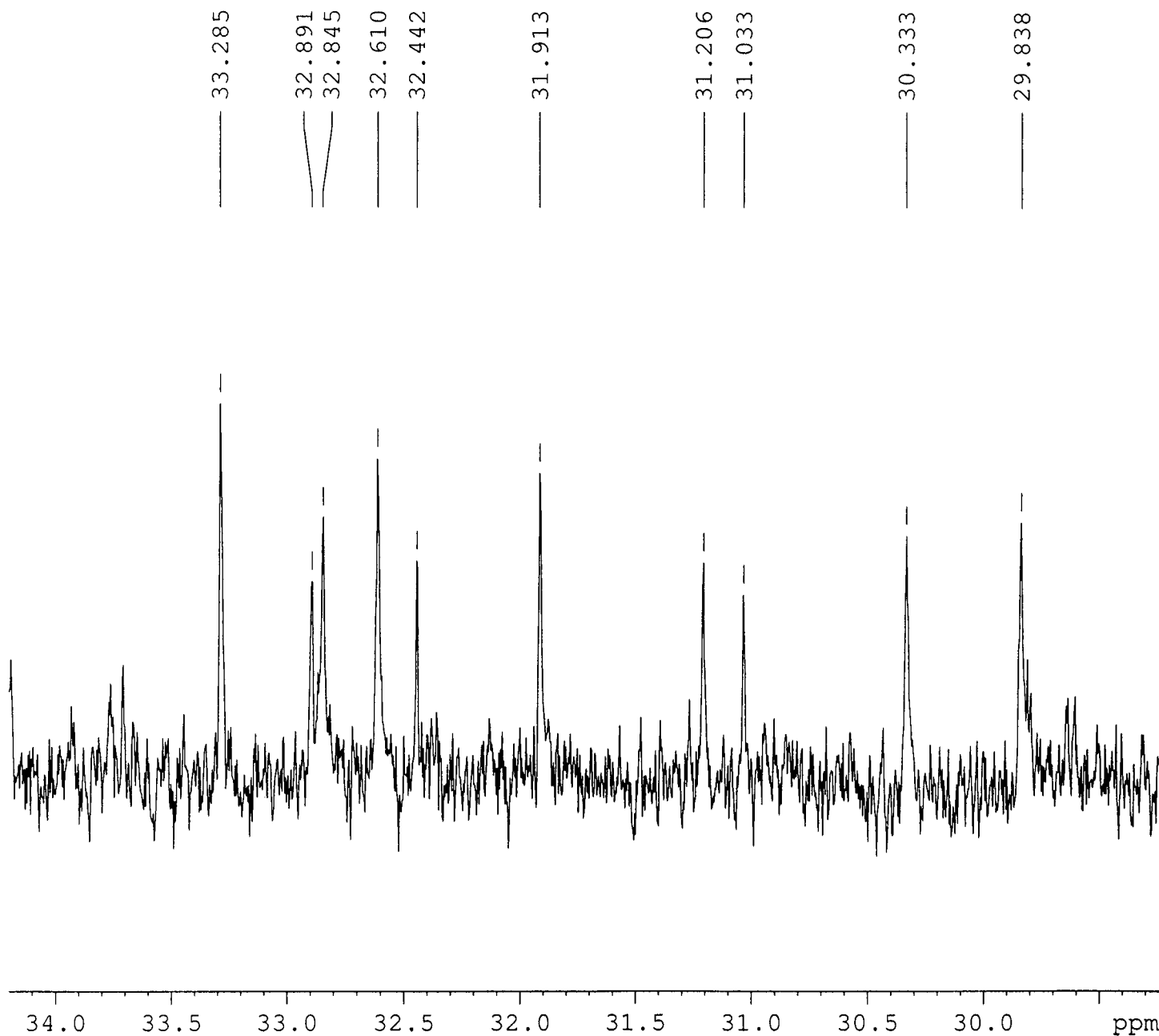
Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 14.43
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zgdc
TD 131072
SOLVENT CDCl3
NS 3072
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 2.00000000 sec
d11 0.03000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

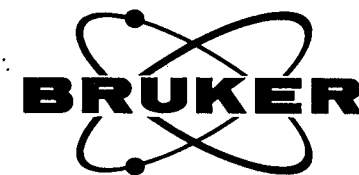
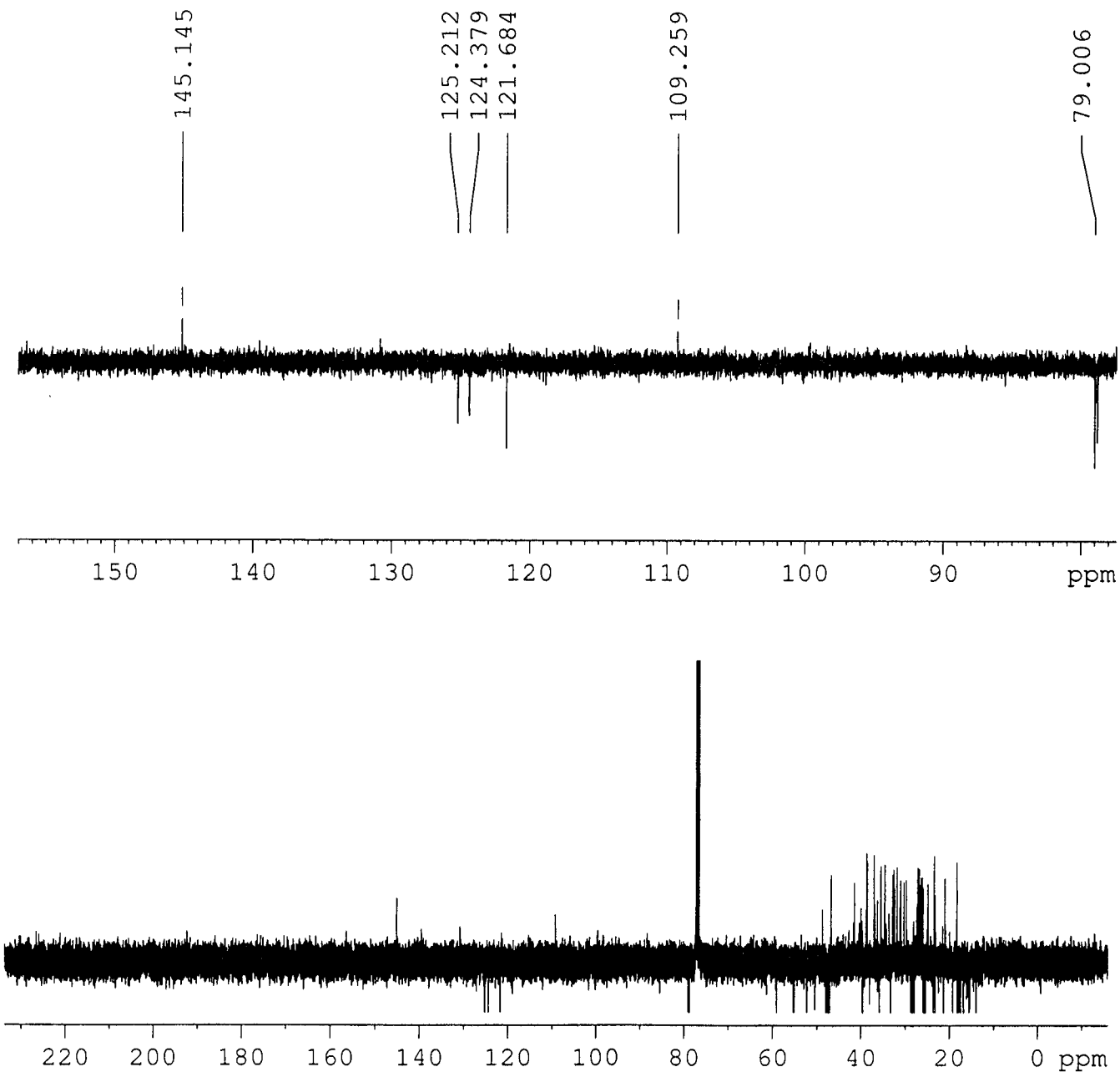
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6227297 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



¹³C (jmod)



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 21.21
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 5120
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

¹³C (jmod)



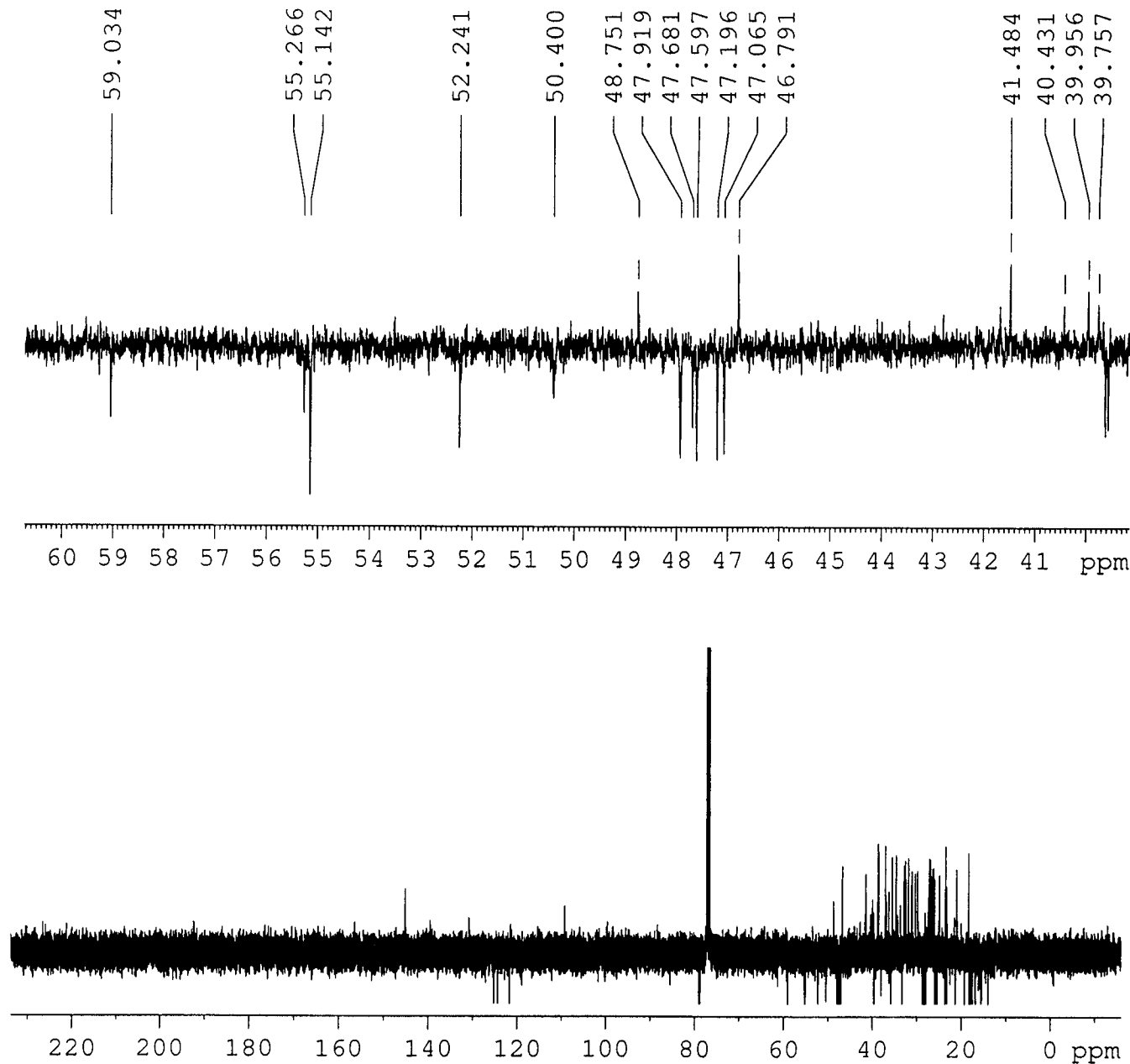
Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 21.21
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 5120
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

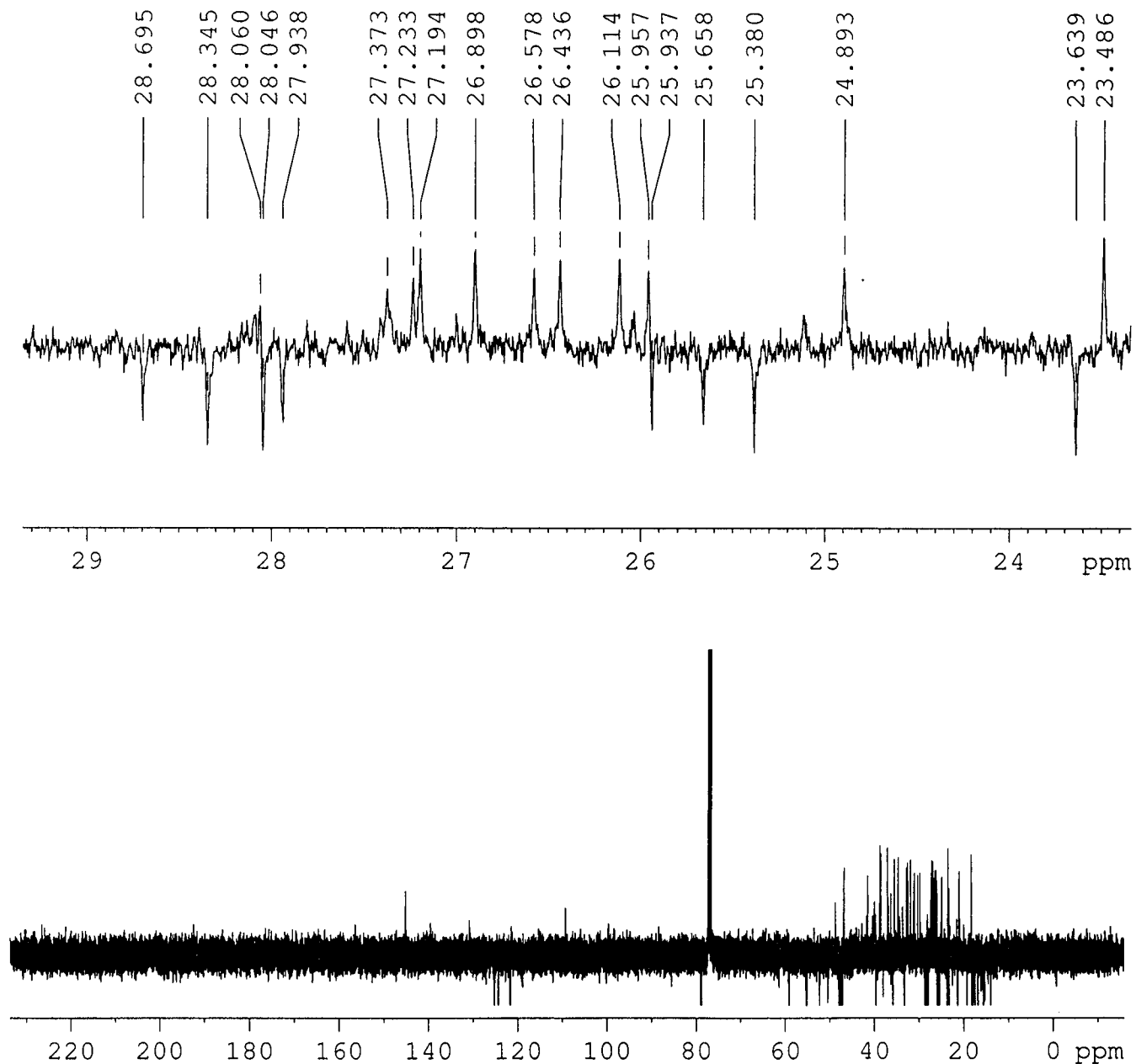
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



¹³C (jmod)



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 4
PROCNO 1

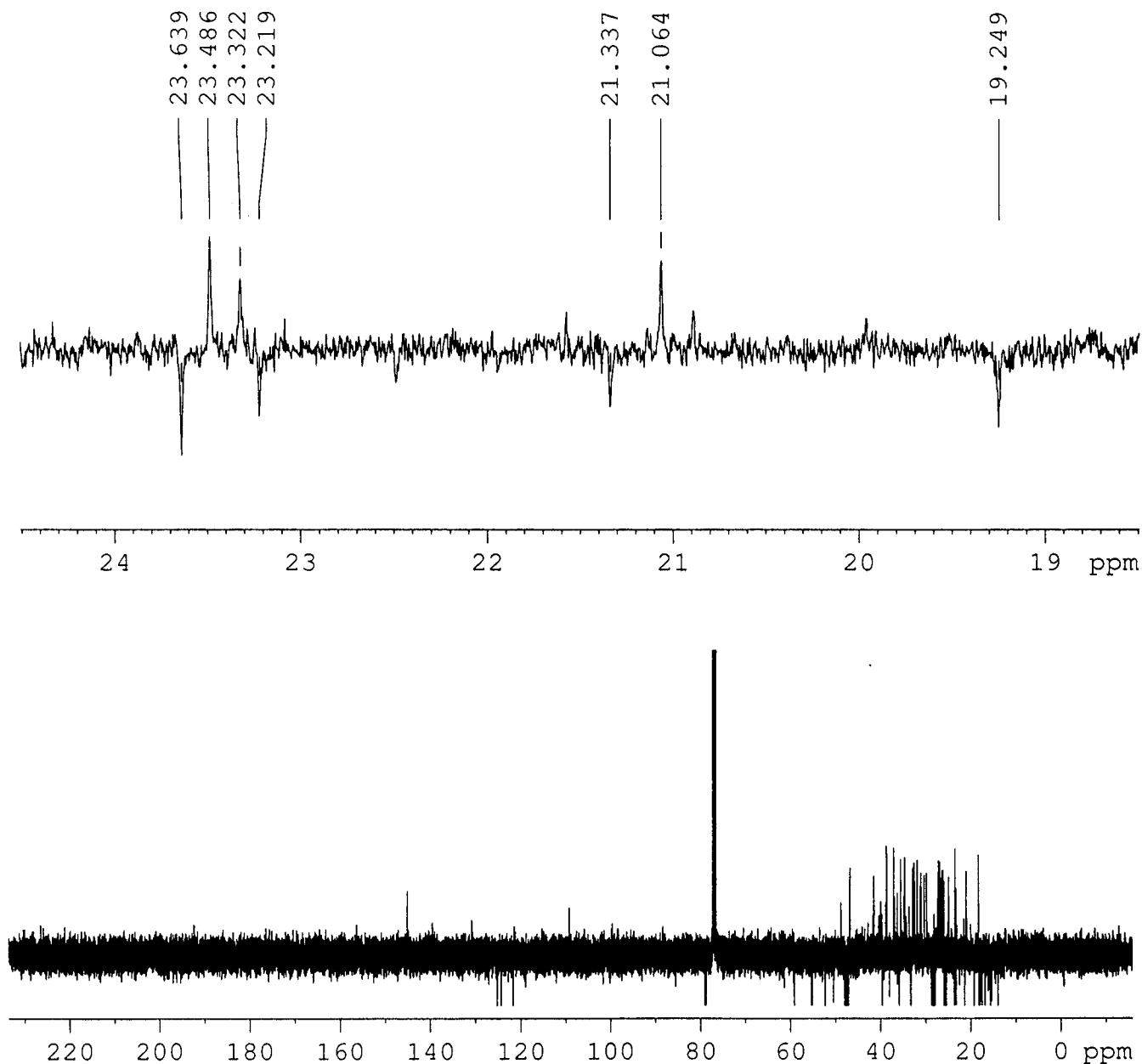
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 21.21
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 5120
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

¹³C (jmod)



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 4
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 21.21
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG jmod
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 5120
DS 0
SWH 25125.629 Hz
FIDRES 0.191693 Hz
AQ 2.6083827 sec
RG 65536
DW 19.900 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
CNST2 139.0000000
CNST11 1.0000000
D1 2.00000000 sec
d20 0.00719424 sec
DELTA 0.00001757 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 13.80 usec
p2 27.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 100.6237358 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 20.00 dB
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 100.6127749 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Pb-01-CH-81/70-72 in CDCl₃

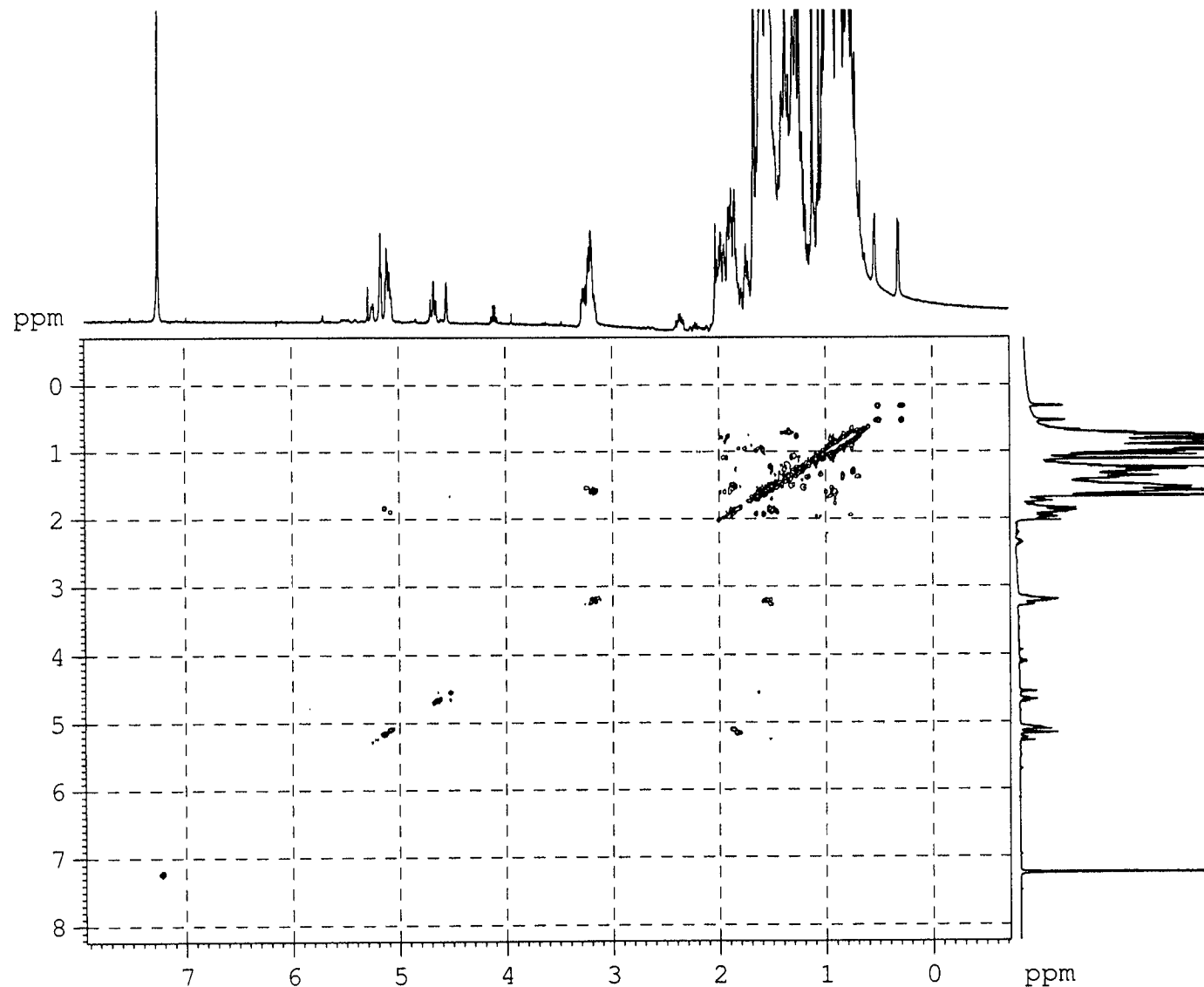


Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 1
PROCNO 1

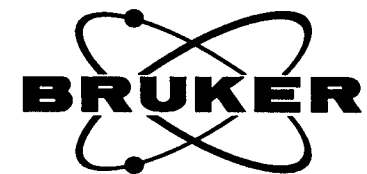
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20110125
Time 9.56
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 16
DS 2
SWH 8278.146 Hz
FIDRES 0.126314 Hz
AQ 3.9584243 sec
RG 90.5
DW 60.400 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 6.40 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1300176 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00



Pb-01-CH-81/70-72 in CDCl₃



Current Data Parameters
NAME bc-ru-1365
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20110125
Time 9.56
INSTRUM AV400
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 16
DS 2
SWH 8278.146 Hz
FIDRES 0.126314 Hz
AQ 3.9584243 sec
RG 90.5
DW 60.400 usec
DE 6.00 usec
TE 0.0 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 1H
P1 6.40 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 400.1324710 MHz

F2 - Processing parameters

SI 32768
SF 400.1300176 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

