รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเมตาบอลึซึมของไขมัน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส (ปีที่ 2)

Isolation of anti-lipid metabolism substances of medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn by measuring the inhibitory activity of pancreatic lipase (2nd year)

ผศ. ภญ. ดร.ทักษิณา ชวนอาษา

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา และ การไฟฟ้าฝ่ายผลิต ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ รศ. ภญ. ดร.สุรัตนา อำนวยผล ที่ได้ให้คำแนะนำเรื่องการแยกสารบริสุทธิ์และจัดหาอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ รศ. ภก. ดร.รุทธ์ สุทธิศรี และ อ. ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ ในการช่วยวิเคราะห์ NMR spectra ของสารที่แยกได้ และขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการแยกสารจากส่วนสกัด F2 และ mother liquor หรือ สารละลายที่เหลือจากการตกผลึก uvaol ที่ได้จากการแยกสารสกัดหยาบของใบลำบิดดง (*Diospyros filipendula*) ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพสธ.) บริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี การที่ศึกษาผ่านมาพบว่าสารเคมีใน F2 และ mother liquor ของผลึก uvaol มีรูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ใกล้เคียงกันมาก และ F2 ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสถึง 93.28% ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 mg/ml จึงเป็นที่น่าสนใจที่แยกสารบริสุทธิ์จากทั้งสองส่วนนี้ ในการแยกสารบริสุทธิ์ทำโดยใช้หลักการของโครมาโทกราฟฟี ได้ fraction M5 แล้วนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยวิธีทางสเปคโตรสโคปี ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance คือ ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR และเปรียบเทียบข้อมูลกับสารมาตรฐาน พบว่า M5 เป็นของผสมที่ประกอบด้วยสาร 3 ชนิดที่ไม่สามารถแยกจากกันโดยเครื่องมือเทคนิคโครมาโทกราฟฟีพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการ ซึ่งประกอบด้วย α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol สารทั้งสามชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน คือ 426.72 เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสของของผสมที่มีสารทั้งสามชนิดอยู่ร่วมกัน พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ 52.11 % ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแพนครีเอติกไลเปส สเปคโตรสโคปี พิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้าง

Abstract

The study is aimed to isolate chemicals from crude extracts of F2 and a mother liquor retrieved during uvaol crystallization. Both mixtures were collected from the isolation of pure compounds from an ethyl acetate extracts of Lum Bid Dong (*Diospyros filipendula*) leaves harvested from the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, Samae-San Island, Chonburi. Previous study showed that chemicals in both mixtures had developed on the TLC with comparable patterns. Besides, F2 exhibited 93.28 % pancreatic lipase inhibitory activity with 1 mg/mL final concentration. Thus, it was interesting to isolate compounds in both mixtures which are responsible for this activity. M5 was obtained via fractionating a combined mixture of F2 and a dried mother liquor. It was found that M5 consisted of 3 triterpene compounds with the same molecular weight (MW 426.72), including α-amyrin, β-amyrin and isomultiflorenol, identified by spectroscopic techniques including ^{1}H NMR and ^{13}C NMR. The activity of M5 was examined and found to exhibit 52.11% lipase inhibition with 1 mg/mL final concentration.

Keywords: anti-pancreatic lipase activity, spectroscopy, structure elucidation

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	5
ผลการศึกษา	6
สรุปและวิจารณ์ผล	21
เอกสารอ้างอิง	23
ประวัตินักวิจัย	27

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การแยกสิ่งสกัดรวมของ F2 และ mother liquor ที่เหลือจากการตกผลึก uvaol ด้วย flash column chromatrography 7

ตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ของ M5 8

ตารางที่ 3 ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของ α-amyrin ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ α-amyrin ใน literature 10

ตารางที่ 4 ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ α-amyrin ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ α-amyrin ใน literature 11

ตารางที่ 5 ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของ β-amyrin ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ β-amyrin ใน literature 12

ตารางที่ 6 ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ β-amyrin ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ β-amyrin ใน literature 11

ตารางที่ 7 ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของ isomultiflorenol ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ isomultiflorenol ใน literature 12

ตารางที่ 8 ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ isomultiflorenol ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ isomultiflorenol ใน literature 11

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงการเคลื่อนที่ของสารใน F2, F3, uvaol (C) และ สารละลายที่เหลือจากการตกผลึก uvaol (moli) บนแผ่น TLC 7

รูปที่ 2 แสดงการเคลื่อนที่ของสารในของผสม M0 และ fraction M1 – M11 บนแผ่น TLC 8

รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของ α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol 9

รูปที่ 4 แสดง ^{1}H-NMR spectra ของ M5 เปรียบเทียบกับ ^{1}H-NMR spectra ของสารมาตรฐาน α-amyrin และ β-amyrin 10

รูปที่ 5 แสดงค่า integration ของพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนจาก ^{1}H-NMR spectra ของ α-amyrin และ β-amyrin ที่ผสมอยู่ใน M5 10

รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบ ^{1}H-NMR spectra บริเวณ methyl substituted region ของ α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ใน M5 10

รูปที่ 7 แสดงค่า integration ของพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนจาก ^{1}H-NMR spectra ของสาร α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ที่ผสมอยู่ใน M5 10

การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเมตาบอลึซึมของไขมัน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส

Isolation of anti-lipid metabolism substances of medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn by measuring the inhibitory activity of pancreatic lipase

ทักษิณา ชวนอาษา

Taksina Chuanasa

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคไขมันในเลือดสูงเป็นจำนวนมาก ซึ่งโรคไขมันในเลือดสูงนี้เป็นสาเหตุของโรคร้ายแรงอื่นๆอีกมากมาย ได้แก่ โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง เป็นต้น และจำนวนผู้ป่วยโรคไขมันโลหิตสูงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้น สาเหตุหนึ่งอาจมาจากการประทานอาหารจานด่วนที่มีปริมาณไขมันสูง และไขมันนั้นเข้าไปสะสมในร่างกายเป็นปริมาณมาก กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกตินี้คือ กระบวนการเมตาบอลึซึมของไขมัน ซึ่งโดยปกติต้องการเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในรูปของกรดไขมันก่อน เนื่องจากไตรกลีเซอไรด์มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะนำเข้าสู่ mucosal ของ intestinal villi ในลำไส้เล็กได้ แล้วจึงดูดซึมกรดไขมันนั้นเข้าสู่กระแสเลือด

ในปัจจุบันมียาที่ใช้รักษาภาวะไขมันในเลือดสูงอยู่หลายชนิด แต่การรักษาจะต้องใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน และผู้ป่วยบางคนก็ไม่สามารถควบคุมระดับไขมันในเลือดได้ จากอุปนิสัยในการรับประทานอาหารของตนเอง จึงทำให้มีความสนใจในการพัฒนายาที่มีกลไกไปยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ซึ่งจะ

ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการดูดซึมไตรกลีเซอไรด์ผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือด และทำให้เกิดการขับไขมันออกจากร่างกาย ซึ่งจะช่วยลดระดับไขมันในเลือดได้ ซึ่งผู้ป่วยไขมันในเลือดสูงจำเป็นจะต้องรับประทานยาอย่างต่อเนื่อง จึงมีค่าใช้จ่ายด้านยาค่อนข้างสูง รวมไปถึงปัญหาความเป็นพิษของยาต่อตับของผู้ป่วย จึงเกิดความพยายามในการวิจัยศึกษาหาพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดระดับไขมัน มาพัฒนาเป็นยาลดไขมันจากสมุนไพรที่มีราคาถูก และปลอดภัย เพื่อช่วยเหลือผู้ป่วย

ประเทศไทยถือได้ว่าเป็นแหล่งของพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด รวมทั้งมีการนำพืชบางชนิดมาใช้ในการช่วยลดระดับไขมันในการแพทย์พื้นบ้านด้วย เช่น กระเจี๊ยบแดง ดอกคำฝอย เสาวรส ซึ่งส่วนใหญ่ยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด และในส่วนกลไกยับยั้งเอนไซม์ไลเปส มีพืชสมุนไพรที่ได้รับการวิจัย เช่น ชาต่างๆ คือ ชาอู่หลง ชาดำ ชาเขียว(*Camellia sinensis*) (Han et al., 2001) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) (Satouchi et al., 1998) ข้าวฟ่างหางกระรอก (*Setaria italic*) (Sherma et al., 2005) sage (*Mussaenda flava*) (Ninomiya et al., 2004) กีวี (*Actinidia arguta*) (Jang et al., 2008) เป็นต้น ซึ่งเห็นได้ว่าการวิจัยส่วนใหญ่มักเป็นการดำเนินการในต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ดีมีพืชหลากหลายชนิดที่สามารถเพาะปลูกได้ในประเทศไทยที่อาจมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสได้

โครงการนี้จึงดำเนินการแยกสารสำคัญจากสารสกัดพืชสมุนไพรในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่หมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี (อพ.สธ.) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ยาแผนปัจจุบันที่นิยมใช้ลดไขมันที่มีใช้ในมีหลายกลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่เป็นยาลดระดับไขมันในเลือด กล่าวคือ ยาเหล่านี้จะออกฤทธิ์กำจัดหรือลดปริมาณไขมันที่ผ่านกระบวนการย่อยจากทางเดินอาหารและถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดแล้ว เช่น statins, fibric acid derivatives, niacin, bile acid binding resins และ probucol (วิทยา ศรีดามาและคณะ, 2544) ส่วนยาที่ลดหรือต้านการดูดซึมไขมันเข้าสู่กระแสเลือดโดยที่ไม่มีผลต่อความอยากอาหาร(ซึ่งออกฤทธิ์ผ่านศูนย์ควบคุมการอยากอาหารในระบบประสาท) ที่นิยมใช้ในปัจจุบันและได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาและไทย คือ orlistat ซึ่งยานี้ถูกพัฒนามาจากสารต้นแบบ lipstatin ที่ได้จากการคัดกรองกรองฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces toxytricini* (Hochuli et al., 1987; Weibel et al., 1987) กลไกการออกฤทธิ์ของ orlistat คือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสแบบไม่ย้อนกลับ จึงทำให้ไตรกลีเซอร์ไรด์ไม่ถูกย่อยเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง และถูกขับออกไปจากร่างกายทางอุจจาระ ดังนั้นจึงทำให้ไตรกลีเซอร์ไรด์ที่ถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้มีปริมาณน้อยลง (Ballinger and Peikin, 2002) ซึ่งน่าจะเป็นยาที่เหมาะกับผู้ป่วยไขมันในเลือดสูงหรือผู้ป่วยโรคอ้วนที่ควบคุมการรับประทานอาหารประเภทไขมันได้ยาก

มีงานวิจัยหลายแห่งพบกว่าพืชจากธรรมชาติสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ตัวอย่างเช่น Satouchi และคณะได้ทำการศึกษาถึงผลการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของเมล็ดถั่วเหลือง (*Glycine max*) พบสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับ lipoxygenase-1 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ (Satouchi et. al., 1998) Han และคณะพบว่า ชาอู่หลง ชาเขียว ชาดำสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของคอเรสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือด โดยสารกลุ่มแทนนินในชา เช่น epicatechingallate และ epigallocatechingallate และสารกลุ่มซาโปนินในชา (teasaponins) สามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปส และเพิ่มกระบวนการเผาผลาญไขมัน (Han et. al., 2001) Ninomiya และ คณะพบสารสกัดจากใบของ Sage (*Salvia officinalis*) มีฤทธิ์ยับยับเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส โดยมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ carnosic acid, carnosol, royleanonic acid, 7-methoxyrosmanol และ oleanolic acid (Ninomiya et. al., 2004) Jang และคณะศึกษาสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากรากกีวี (*Actinidia arguta*) พบสารประกอบใหม่ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส คือ 3-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl actinidic acid ซึ่งเป็นสารกลุ่ม coumaroyl triterpenes และสารประกอบอื่นๆ อีก 5 ชนิด ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triterpenes ได้แก่ ursolic acid, 23-hydroxyursolic acid, corosolic acid, asiatic acid และ betulinic acid (Jang et. al., 2008)

มีงานวิจัยจากหลายแหล่งพบว่าสารสกัดจากพืชที่พบในประเทศไทย หลายชนิดมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส เช่น ทับทิม (*Punica granatum*) (Jurenka, 2008; Lei et al.,

2007), มะระขี้นก (*Momordica charantia*) (Oishi et al., 2007), ชา (*Camellia sinensis*) (Nakai et al.,2005), เบญกานี (*Quercus infectoria*) (Gholamhoseinian et al., 2010) รวมทั้งมีการวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดจากพืชที่มีผลยับยั้งแพนครีเอติกไลเปสด้วย ตัวอย่างสารเช่น สารกลุ่ม saponins, polyphenolics และ terpenes (Birari and Bhutani, 2007)

ในการวิจัยครั้งนี้จะนำสารสกัดจากพืชในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ที่เคยตรวจสอบแล้วว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส คือ ลำบิดดง มาทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่ยังคงฤทธิ์นี้อยู่ ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาสารสำคัญนี้ให้เป็นยาต้านเมตาบอลึซึมของไขมันต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับวงการแพทย์และเภสัชกรรมไทยรวมถึงประชาชนโดยทั่วไป เนื่องจากโอกาสในการเข้าถึงยาอาจสูงขึ้นเพราะเป็นยาจากประเทศไทยซึ่งอาจส่งผลถึงการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศและเพิ่มการใช้ยาที่ผลิตได้จากสารในสมุนไพรไทย

วัตถุประสงค์

เพื่อสกัดแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบที่ได้จากพืชในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ที่ถูกคัดกรองและแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่าง

พิจารณาเลือกใช้ส่วนสกัดจากการแยกสารสำคัญจากใบลำบิดดงที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสเพิ่มเติมจากการศึกษาวิจัยในปีที่ผ่านมา ในที่นี้เลือกส่วนสกัด F2 เนื่องจากมีค่า % inhibition ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสสูงที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนสกัดอื่นๆ และ mother liquor หรือ สารละลายที่เหลือจากการตกผลึก uvaol (ได้จากส่วนสกัด F3 ที่ทำการแยกแล้วในการศึกษาวิจัยปีงบประมาณ 2556) ยังคงมีสารที่น่าสนใจอยู่ ซึ่งมีรูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ใกล้เคียงกับ F2 จึงนำทั้งสองส่วนนี้รวมเข้าด้วยกัน เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอในการแยกโดยเทคนิคต่างๆ และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในขั้นต่อไป

2. แยกสารสำคัญ โดยอาศัยเทคนิคทาง chromatography

นำของผสมระหว่าง F2 และสารละลายที่เหลือจากการตกผลึก uvaol ที่แห้งแล้ว มาแยกสารบริสุทธิ์ต่างๆ โดยใช้วิธีการทาง chromatography แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อพิสูจน์ว่าสารใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส โดยวิธีการหาฤทธิ์ทางชีวภาพนี้จะทำการตรวจสอบดำเนินการตามรายงานการวิจัยที่ผ่านมา (McDougall et. al., 2009)

3. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาข้อมูลทาง spectroscopy และ/หรือ spectrometry

หาสูตรโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสโดย nuclear magnetic resonance (NMR)

4. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

สถานที่ทำการศึกษาและเก็บข้อมูล

ทำการทดลองที่ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

<u>การแยกสารบริสุทธิ์ออกจากของผสมในน้ำล้างผลึก uvaol</u>

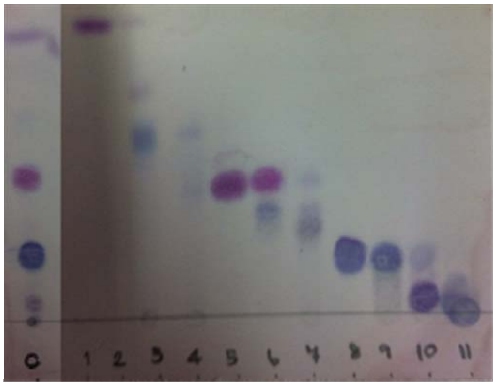
การศึกษาวิจัยปีที่ผ่านมา ได้ทำการสกัดแยกสารสำคัญจาก F1 ซึ่งคือสิ่งสกัดชั้น EtOAc ของใบลำบิดดงได้ทั้งหมดอีก 6 fractions คือ F2-F7 และผู้วิจัยได้เลือก fraction ที่ 3 หรือ F3 มาทำการแยกสารสำคัญต่อเนื่องจากเป็น fraction ที่ให้ค่า % inhibition ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสเกิน 70% และมีปริมาณสิ่งสกัดที่ได้มากที่สุดซึ่งทำให้การแยกสารสำคัญมีความเป็นไปได้สูงที่สุด และพบว่าสาร uvaol ใน F3 เป็นสารที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพนี้

ในขั้นตอนการตกผลึก uvaol ได้ mother liquor หรือ สารละลายที่เหลือจากการตกผลึกมาปริมาตรหนึ่ง เมื่อนำมาหยดลงแผ่น TLC และให้เคลื่อนที่ในตัวทำละลายอินทรีย์ในระบบปิด สารต่างๆใน mother liquor เกิดการเคลื่อนที่ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วมีรูปแบบของการเคลื่อนที่สารใกล้เคียงกับ F2 จึงได้นำ mother liquor ระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำได้ปริมาณ 690 มิลลิกรัม และนำรวมกับส่วนสกัด F2 ที่แห้งแล้วปริมาณ 470 มิลลิกรัม ได้เป็นของผสม M0 น้ำหนักรวม 1,160 มิลลิกรัม ขั้นต่อมานำไปผ่านกระบวนการแยกสารด้วยเทคนิค flash column chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ความเข้มข้นเดียวสำหรับเป็นตัวชะ คือ 100% CH_2Cl_2 ปริมาตรที่รับ fraction ครั้งละ 30 มิลลิลิตร แยกได้จำนวนทั้งสิ้น 111 fractions และนำ fraction ที่มี TLC pattern แบบเดียวกันมารวมเข้าไว้ด้วยกัน แบ่งเป็น fraction ใหม่ได้ทั้งหมด 11 fractions โดยเรียกชื่อเป็น M1-M11 เมื่อนำไประเหยแห้งได้น้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 1

รูปที่ 1 แสดงการเคลื่อนที่ของสารใน F2 F3 uvaol (C) และ สารละลายที่เหลือจากการตกผลึก uvaol (moli) บนแผ่น TLC โดยที่แถบสารในเส้นประ (.....) คือ uvaol

ตารางที่ 1 การแยกสิ่งสกัดรวมของ F2 และ mother liquor ที่เหลือจากการตกผลึก uvaol ด้วย flash column chromatrography

Fraction	Renamed fraction	ปริมาตรของ fractions ที่รวมเข้าด้วยกัน (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-3	M1	90	2
4-6	M2	90	14.6
7-11	M3	150	13.6
12-14	M4	90	2.6
15-23	M5	150	57.2
24-32	M6	210	10.6
34-41	M7	210	4.3
42-80	M8	1170	86.6
81-100	M9	600	50
101-107	M10	210	29.3
108-111	M11	120	23.3



รูปที่ 2 แสดงการเคลื่อนที่ของสารในของผสม M0 และ fraction M1 – M11 บนแผ่น TLC

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ M5

เนื่องจากปริมาณสารใน fractions ต่างๆ ค่อนข้างน้อย มีเพียง M5 และ M8 เท่านั้นที่มีปริมาณเกิน 50 มิลลิกรัม ซึ่งอาจเพียงพอสำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป อย่างไรก็ดี M8 ได้ถูกพบว่าคือสาร uvaol ในเวลาต่อมา จึงไม่ได้นำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากมีข้อมูลในการศึกษาวิจัยปีที่ผ่านมาแล้ว

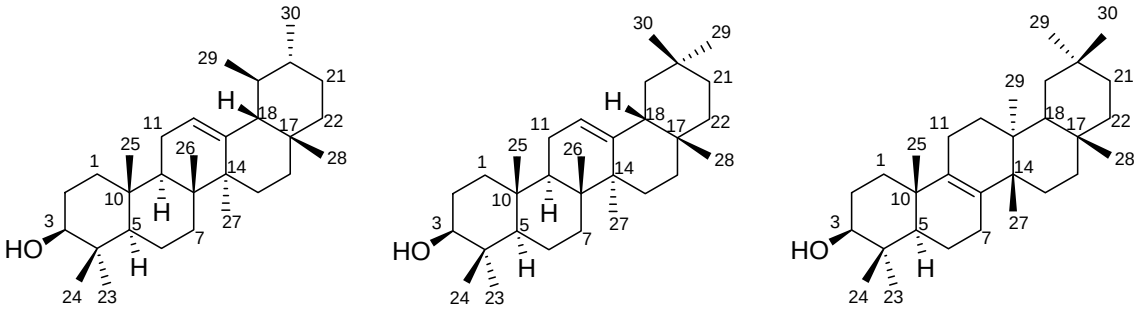
เมื่อพิจารณา fraction M5 พบว่ามี spot ของสารเพียงจุดเดียว และเมื่อลองนำไปหยดบนแผ่น TLC และให้เคลื่อนที่ใน mobile phase หลายๆระบบ ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสารเพียงจุดเดียว ทำให้คาดคะเนว่าอาจเป็นสารที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ จึงได้นำ M5 ไประเหยแห้งได้เป็นของแข็งที่มีลักษณะเป็น ผงสีขาวปนเขียวเล็กน้อยและนำไปตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส เทียบกับ orlistat ที่เป็นตัวควบคุมผลบวก ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ของ M5

ส่วนที่สกัดแยกเบื้องต้น	น้ำหนักสารที่เตรียมได้ (g)	% inhibition			average	SD
		1	2	3		
M5 (1mg/mL)	0.01	51.71	54.09	50.55	52.12	1.80
Orlistat (25 µM)	-	98.28	98.51	98.64	98.48	0.18

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารใน M5 ที่แยกได้

นำ M5 ที่แยกได้ไปหาข้อมูลทาง spectrophotometry ได้แก่ข้อมูล proton และcarbon NMR (nuclear magnetic resonance) พบว่า M5 เป็นของผสมประกอบด้วย α-amyrin β-amyrin และ isomultiflorenol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triterpenoids มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันมากดังที่แสดงในรูปที่ 3 ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถแยกออกจากกันด้วยศักยภาพของเครื่องมือและสารเคมีที่มีในห้องปฏิบัติการวิจัยที่ได้กำลังดำเนินการอยู่ โดยมีข้อมูลของ ^{1}H-NMR spectra และ ^{13}C-NMR spectra ของสารทั้ง 3 ชนิดดังที่แสดงในตารางที่ 3 - 8



α-amyrin β-amyrin isomultiflorenol

รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของสารในของผสมซึ่งประกอบด้วย α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol

ตารางที่ 3 ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของ α-amyrin ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ α-amyrin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้		ข้อมูล α-amyrin ที่ตีพิมพ์*
carbon		
1	-	-
2	-	-
3	3.22 (*dd*, *J* = 5.1, 11.2)	3.23 (*dd*, *J* = 5.0, 11.0)
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	5.12 (*t*, *J* = 3.6)	5.12 (*t*, *J* = 3.7)
13	-	-

14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	0.79 (*s*)	0.87(*s*)
24	0.78 (*s*)	0.79 (*s*)
25	0.79 (*s*)	0.85 (*s*)
26	1.00 (*s*)	1.04 (*s*)
27	1.06 (*s*)	1.07 (*s*)
28	0.91 (*s*)	0.95 (*s*)
29	0.95 (*s*)	1.00
30	0.99 (*s*)	1.00

หมายเหตุ * ที่มา Chowdhury et al., 2013

ตารางที่ 4 ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ **α**-amyrin ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ **α**-amyrin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้		ข้อมูล **α**-amyrin ที่ตีพิมพ์**
carbon	^{13}C Chemical shift	^{13}C Chemical shift
1	38.8	38.7
2	27.3	27.2
3	79.0	78.3
4	38.8	38.7

5	55.2	55.2
6	18.4	18.3
7	33.0	32.9
8	40.0	40
9	47.7	47.7
10	36.9	36.9
11	23.3	23.3
12	124.6	124.3
13	139.5	139.3
14	42.1	42
15	28.8	28.7
16	26.6	26.6
17	33.8	33.7
18	59.1	58.9
19	39.6	39.6
20	39.7	39.6
21	31.3	31.2
22	41.6	41.5
23	28.1	28.1
24	15.7	15.6
25	15.7	15.6
26	16.9	16.8
27	23.4	23.3
28	28.1	28.1
29	17.5	17.4
30	21.4	21.3

หมายเหตุ ** ที่มา Lima et al., 2004

ตารางที่ 5 ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของ β-amyrin ใน M5 ผสมเปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ β-amyrin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้		ข้อมูล β-amyrin ที่ตีพิมพ์*
carbon		
1	-	-
2	-	-
3	3.22 (*dd*, *J* = 5.4, 10.2)	3.23 (*dd*, *J* = 12.0 Hz, 4.5 Hz)
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	5.18 (*t*, *J* = 3.6)	5.18 (*t*, *J* = 3.5 Hz)
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	0.98	1.0 *(s)*

24	0.78	0.79 (*s*)
25	0.92	0.94 (*s*)
26	0.95	0.97 (*s*)
27	1.12	1.14 (*s*)
28	0.82	0.83 (*s*)
29	0.86	0.87 (*s*)
30	0.86	0.87 (*s*)

หมายเหตุ * ที่มา Giang et al., 2009

ตารางที่ 6 ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ β-amyrin ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ β-amyrin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้		ข้อมูล β-amyrin ที่ตีพิมพ์*
carbon	^{13}C Chemical shift	^{13}C Chemical shift
1	38.6	38.6
2	26.9	27
3	79.0	79.0
4	38.8	38.8
5	55.2	55.2
6	18.4	18.4
7	32.7	32.7
8	39.8	39.8
9	47.6	47.7
10	37.0	37.0
11	23.6	23.6
12	121.7	121.8
13	145.2	145.2
14	41.7	41.8

15	26.2	26.2
16	27.5	27.3
17	32.5	32.5
18	47.3	47.3
19	46.9	46.9
20	31.1	31.1
21	34.7	34.8
22	37.1	37.2
23	28.1	28.1
24	15.5	15.5
25	15.6	15.6
26	16.8	16.8
27	26.0	26.0
28	28.4	28.3
29	33.4	33.3
30	23.7	23.7

หมายเหตุ * ที่มา Giang et al., 2009

ตารางที่ 7 ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของ isomultiflorenol ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ isomultiflorenol ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้		ข้อมูล isomultiflorenol ที่ตีพิมพ์*
carbon		
1	-	-
2	-	-
3	3.22 (*m*)	3.23 (*m*)
4	-	-
5	-	-
6	-	-

7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	0.78 (*s*)	0.8 (*s*)
24	0.78 (*s*)	0.8 (*s*)
25	0.94 (*s*)	0.96 (*s*)
26	1.04 (*s*)	1.06 (*s*)
27	0.94 (*s*)	0.97 (*s*)
28	1.05 (*s*)	1.07 (*s*)
29	0.98 (*s*)	0.99 (*s*)
30	0.98 (*s*)	0.99 (*s*)

หมายเหตุ * ที่มา Giang et al., 2009

ตารางที่ 8 ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ isomultiflorenol ใน M5 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ isomultiflorenol ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้		ข้อมูล isomultiflorenol ที่ตีพิมพ์*
carbon	^{13}C Chemical shift	^{13}C Chemical shift
1	34.2	34.2
2	24.7	24.7
3	79.1	76.8
4	38.8	38.8
5	50.7	50.7
6	19.2	19.3
7	27.5	27.5
8	135.1	135.1
9	133.5	133.5
10	37.6	37.6
11	20.8	20.8
12	30.7	30.7
13	37.3	37.3
14	41.0	41.0
15	26.3	26.3
16	36.7	36.7
17	30.8	30.8
18	44.2	44.1
19	34.4	34.4
20	28.3	28.4
21	35.1	35.
22	36.8	36.8
23	28.1	28.1
24	15.6	15.6

25	19.8	19.8
26	19.0	18.9
27	24.7	24.7
28	31.5	31.5
29	34.5	34.5
30	33.1	33.3

หมายเหตุ * ที่มา Giang et al., 2009

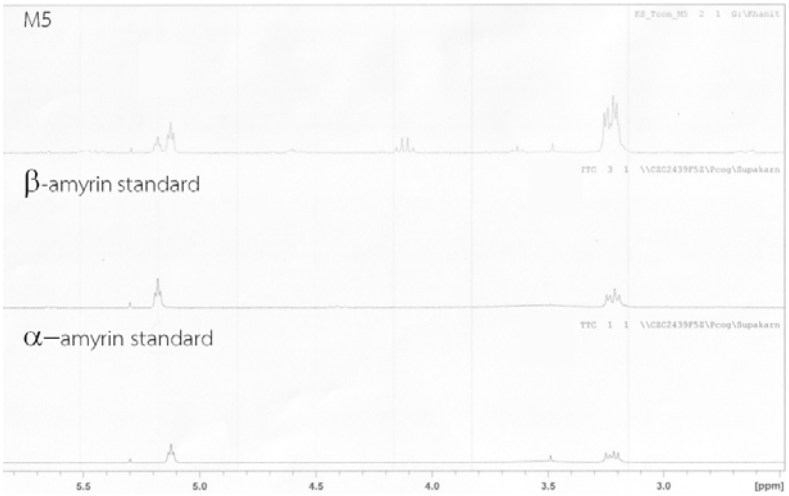
การอัตราส่วนของปริมาณ α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ใน M5 ที่แยกได้

จากข้อมูลเบื้องต้นทราบว่า M5 ประกอบด้วย α-amyrin β-amyrin และ isomultiflorenol ที่ไม่สามารถแยกจากกันในห้องปฏิบัติการนี้ได้ และ M5 ให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส 52.11% ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ซึ่งเมื่อพิจารณาอย่างคร่าวๆแล้ว M5 อาจไม่ใช่กลุ่มของสารที่น่าสนใจสำหรับฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ อย่างไรก็ตามอาจมีกรณีที่สารหนึ่งใน M5 ซึ่งแท้จริงแล้วมีความสามารถต้านการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสแต่มีปริมาณน้อย จึงทำให้สัดส่วนของสารที่มีอยู่ในของผสมนี้ถูกบทบังศักยภาพที่จะเกิดฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเต็มที่ ผู้วิจัยจึงต้องการทราบอัตราส่วนของสารที่ปนกันอยู่ และ หาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารมาตรฐานที่หาซื้อได้เนื่องจากสารทุกตัวใน M5 เป็นสารที่ถูกค้นพบและรู้จักกันดีแต่ยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งเอนไซม์นี้

วิธีการหนึ่งที่นำมาช่วยพิจารณาหาอัตราส่วนการผสมกัน คือ การวิเคราะห์ค่า integration ของพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนที่เป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสารใน ^{1}H-NMR spectra ของ M5 เนื่องจากค่า intergration ของพื้นที่ใต้สัญญาณที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารที่มีอยู่ในของผสมนั้น โดยในการวิเคราะห์จะต้องระบุชนิดของสัญญาณโปรตอนของสารแต่ละตัวกับสารมาตรฐานเพื่อให้สามารถเลือกสัญญาณโปรตอนของสารแต่ละตัวได้อย่างถูกต้องจึงจะสามารถเปรียบเทียบค่า intergration ของพื้นที่ใต้สัญญาณได้อย่างเหมาะสม อย่างไรก็ดีมีเพียงสารมาตรฐานของ α-amyrin และ β-amyrin ที่จำหน่ายตามบริษัทเคมีภัณฑ์ต่างๆ ดังนั้นในขั้นแรกจึงหาบริเวณสัญญาณที่สามารถระบุสัญญาณโปรตอนของ α-amyrin และ β-amyrin ส่วนสัญญาณของ isomultiflorenol จะสัมพันธ์กับที่สัญญาณโปรตอนที่เหลืออยู่

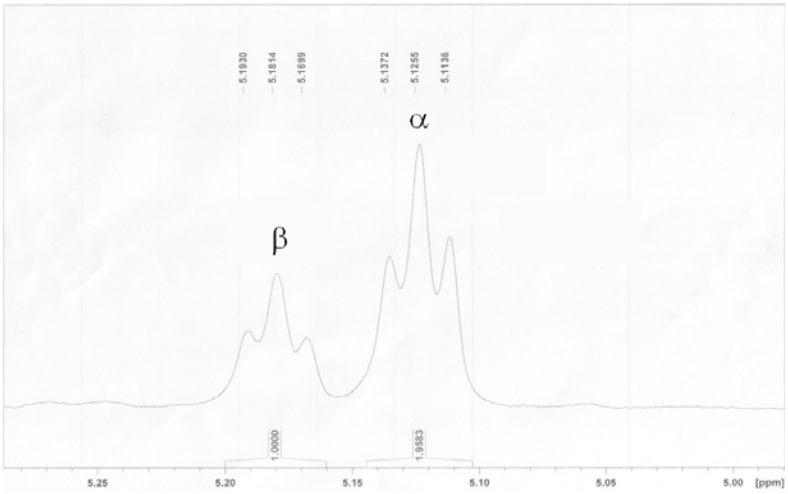
การทดลองขั้นแรกทำโดยนำ ^{1} H-NMR spectra ของ M5 เทียบกับ ^{1} H-NMR spectra ของสารมาตรฐาน α-amyrin และ β-amyrin โดยวิเคราะห์ด้วย 300 mHz NMR ซึ่งทำให้เห็นสัญญาณและค่า

integration ของพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนในบริเวณพันธะคู่ปรากฏอยู่ในช่วง 5.0 – 5.3 ppm ดังแสดงในรูปที่ 4 และ 5 และเลือกพิจารณาสัญญาณและค่า integration ของพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนในบริเวณที่มี methyl substitution ปรากฏอยู่ในช่วง 0.7 – 1.2 ppm ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7



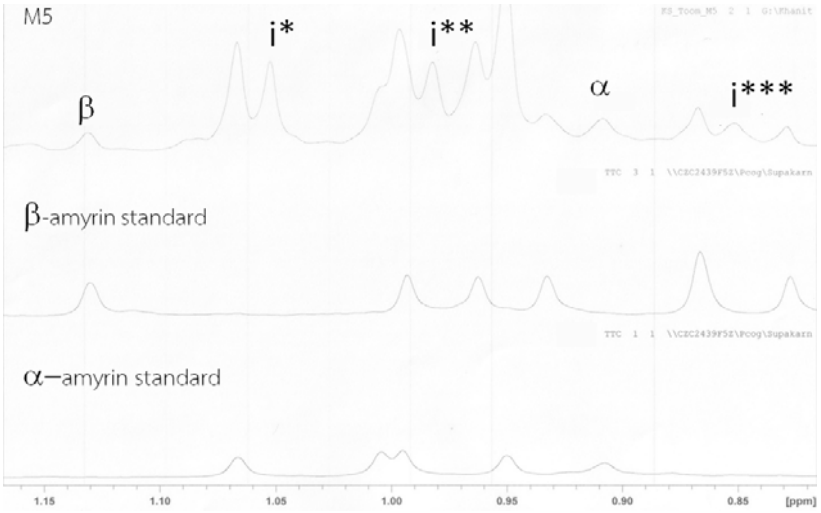
รูปที่ 4 แสดง ^{1}H-NMR spectra ของ M5 เปรียบเทียบกับ ^{1}H-NMR spectra ของสารมาตรฐาน α-amyrin และ β-amyrin

จากโครงสร้างทางเคมีของ α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol (รูปที่ 3) พบว่า α-amyrin และ β-amyrin มีพันธะคู่ชนิด trisubstituted เป็นองค์ประกอบจึงทำให้สามารถพบสัญญาณของ olefinic proton ได้ ในขณะที่ isomultiflorenol มีพันธะคู่ชนิด tetrasubstituted เป็นองค์ประกอบจึงไม่พบสัญญาณของ olefinic proton ดังนั้นพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนในบริเวณของพันธะคู่ ของ α-amyrin และ β-amyrin ซึ่งมีเพียงตำแหน่งเดียว คือ พันธะที่เชื่อมระหว่าง C12 และ C13 พบว่ามีค่า 1.9583 และ 1.000 ppm ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5 จากข้อมูลนี้ทำให้ทราบว่า α-amyrin มีปริมาณมากกว่า β-amyrin ด้วยอัตราส่วนประมาณ 2 : 1



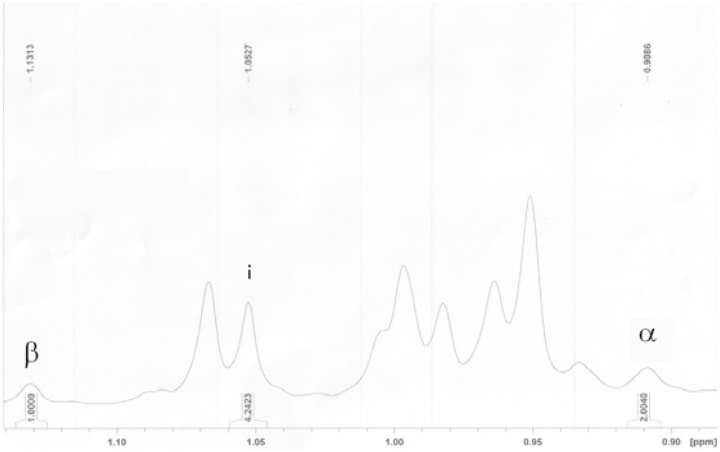
รูปที่ 5 แสดงค่า integration ของพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนจาก ^{1}H-NMR spectra ของ α-amyrin และ β-amyrin ที่ผสมอยู่ใน M5

จากการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนในบริเวณ methyl substitution ของ M5 เทียบกับ α-amyrin และ β-amyrin พบสัญญาณที่น่าจะเป็นของ isomultiflorenol เท่านั้นอยู่ 3 บริเวณ คือ I*, I** และ I*** ดังแสดงในรูปที่ 6 โดยผู้วิจัยเลือกใช้ I* เนื่องจากมีบริเวณซ้อนทับกับสัญญาณอื่นน้อยที่สุด และมีสัญญาณชัดเจน คือ มีพื้นที่หรือความสูงของสัญญาณเพียงพอในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป



รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบ ^{1}H-NMR spectra บริเวณ methyl substituted region ของ α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ใน M5

จากข้อมูลในรูปที่ 7 ผู้วิจัยพิจารณาพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนในบริเวณ methyl substitution ของ α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol มีค่า 2.0083 1.000 และ 4.2423 pmm ตามลำดับ จึงสามารถวิเคราะห์และสรุปปริมาณสารใน M5 ซึ่งประกอบด้วย α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ผสมกันอยู่ในอัตราส่วน 2:1:4



รูปที่ 7 แสดงค่า integration ของพื้นที่ใต้สัญญาณโปรตอนจาก ^{1}H-NMR spectra ของสาร α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ที่ผสมอยู่ใน M5

สรุปและวิจารณ์ผล

พืชในสกุล *Diospyros* อยู่ในวงศ์ Ebenaceae จำนวนหนึ่ง ได้ถูกใช้รักษาทางอายุรเวทและใช้เป็นยาพื้นบ้านอย่างกว้างขวาง ซึ่งต่อมาตรวจสอบพบสารเคมีสำคัญที่น่าจะมีผลในการให้ฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ (Sinha and Bansal, 2008) อย่างไรก็ดีลำบิดดง (*Diospyros filipendula* Pierre ex Lecomte.) ไม่มีการใช้เป็นยาพื้นบ้านอย่างชัดเจน

มีรายงานการวิจัยจากหลายแหล่งพบว่าสารเคมีหลายกลุ่ม จากพืชหลายชนิด มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ แพนครีเอติกไลเปส (Hasani-Ranjbar et. al., 2013; Sahib et. al., 2012) จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับลำบิดดง ยังไม่มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชนี้ และยังไม่มีข้อมูลทางพฤกษเคมีจากใบของลำบิดดง แต่มีรายงานสารสำคัญที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol taraxerol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triterpenoids (วารี เนื่องจำนงค์, 2555)

จากการศึกษาวิจัยในปีที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดหยาบจากลำบิดดงมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ แพน-ครีเอติกไลเปส เมื่อทำการแยกสารสำคัญโดยอาศัยเทคนิค bioassay-guided fractionation สามารถแยกสารบริสุทธิ์ คือ uvaol จาก fraction F3 ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่ม triterpenoid นอกจากนี้สารละลายที่เหลือจากการตกผลึก uvaol ยังคงมีสารเคมีหลายชนิดที่น่าสนใจ และมีรูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC เหมือน fraction F2 ที่ได้จากการแยกสารสกัดหยาบจากใบลำบิดดงซึ่งให้ฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุด และจากการศึกษาวิจัยในปีนี้พบว่านอกเหนือจาก uvaol ในของผสมระหว่าง F2 และ สารละลายที่เหลือจากการล้างผลึก uvaol แล้ว ยังมีสารผสมอีก 1 ชนิด คือ M5 ที่มี α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ซึ่งไม่สามารถแยกจากกันผสมกันอยู่ด้วยอัตราส่วน 2:1:4 อย่างไรก็ดีมีเพียง α-amyrin และ β-amyrin มีรายงานตรวจพบในพืชสกุล *Diospyros* อื่นๆ (Sinha and Bansal, 2008) ส่วน isomultiflorenol ยังไม่เคยถูกรายงานว่าพบในพืชสกุล *Diospyros*

มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทั้งสามชนิดนี้ พบว่า มีการออกฤทธิ์ที่หลากหลายทั้งในแง่เป็นสารสำคัญเดี่ยว หรือ สารที่ผสมอยู่ร่วมกัน เช่น α-amyrin ช่วยเร่งการเพิ่มจำนวนของ human karytinocytes (Biskup et. al., 2012) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus* ในช่องปาก (Díaz-Ruiz et. al., 2012) และ ต้านภาวะน้ำตาลในเลือดสูงของหนูทดลอง (Singh et. al., 2009) ในขณะที่ β-amyrin ที่ได้จากใบของ *Bridelia ferruginea* เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ มีพิษต่อเซลล์ (Fabiyi et. al., 2012) และ isomultiflorenol สามารถต้านเชื้อจุลชีพ (Hussain et. al., 2011)

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจเมื่อทำการทดลองแบบ *in vivo* โดยให้สาร α-amyrin และ β-amyrin ผสมอยู่ด้วยกัน คือ ต้านการอักเสบในหนูทดลอง (Okoye et. al., 2014) มีผลต่อการตกตะกอนของกรดอะ

มิโนในระบบประสาทของหนูทดลอง (Aragão et. al., 2009) กระตุ้นให้ตับอ่อนอักเสบในหนูทดลอง (Melo et. a.l., 2010) ต้านเหงือกอักเสบในหนูทดลอง (Holanda Pinto et. al., 2007) และ ต้านภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูง ของหนูทดลอง ที่ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ (Santos et. al., 2012) ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลและไขมัน อาจเกิดขึ้นจากการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการดังกล่าว และน่าจะสามารถตรวจสอบโดยใช้การทดลองแบบ *in vitro* คือการตรวจสอบในหลอดทดลองเพื่อตอบสมมติฐานนี้ในเบื้องต้นได้

เป็นที่น่าสังเกตว่า %inhibition ในการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสที่พบใน F2 มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับ fraction อื่นๆ (จากการศึกษาวิจัยปีที่ผ่านมา) และ พบว่า fraction นี้ประกอบไปด้วย uvaol, α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol เป็นสารหลัก ส่วนสารอื่นๆที่ยังไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้ และพบในปริมาณที่ต่ำกว่า เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ uvaol ค่า %inhibition ที่ได้ต่ำกว่า F2 จึงมีความเป็นไปได้ที่ α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ใน fraction F2 เดียวกันนี้ จะช่วยเสริมทำให้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ดีขึ้น ซึ่งควรจะต้องทำการทดลองหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสกับสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดนี้จึงจะสามารถพิสูจน์ข้อสมมติฐานนี้ได้

จากข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของ α-amyrin, β-amyrin และ isomultiflorenol ที่ผสมอยู่ใน M5 ที่แยกได้จากลำบิดดง ซึ่งสามารถต้านเมตาบอลึซึมของไขมัน ผ่านทางกลไกการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ถือได้ว่าเป็นการค้นพบที่ได้องค์ความรู้ใหม่ และสามารถนำไปศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสในสภาวะที่มีสารอยู่ในปฏิกิริยา ซึ่งจะทำให้สามารถทราบได้ว่าการยับยั้งนั้นมีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพดีอย่างไร การศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตจะช่วยให้ทราบถึงศักยภาพของสารทั้งสามชนิดในการพัฒนาเป็นยาต้านไขมันได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Aragão, G.F., Carneiro, L.M.V., Junior, A.P.F., Bandeira, P.N., Lemos, T.L.G. and Viana, G.S. (2009). Evidence for excitatory and inhibitory amino acids participation in the neuropharmacological activity of alpha- and beta-amyrin acetate. *Open Pharmacol. J.* 3: 9 – 16.
2. Ballinger, A. and Peikin, S,R. (2002). Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur. J. Pharmacol*. 404: 109 – 117.
3. Birari, R.B. and Bhutani, K.K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov. Today.* 12: 879 – 889.
4. Biskup, E., Gołębiowski, M., Gniadecki, R., Stepnowski, P. and Łojkowska, E. (2012). Triterpenoid α-amyrin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. *Acta Bio. Polonica* 59(2): 255 – 260.
5. Chowdhury, A., Alam, M.A., Rashid, R.B., Al-Mansur, M.A., Rahman, M.S. and Rashid, M.A. (2013). Steroids and triterpenoids from *Corypha taliera* Roxb: a critically endangered palm species of Bangladesh. *Res. J. Med. Plant* 7(2): 125 – 129.
6. Díaz-Ruiz, G., Hernández-Vázquez, L., Luna, H., Wacher-Rodarte, M.C. and Navarro-Ocaña, A. (2012). Growth inhibition of *Streptococcus* from the oral cavity by α-amyrin esters. *Molecules* 17: 12603 – 12611.
7. Fabiyi, O.A., Atolani, O., Adeyemi, O.S. and Olatunji, G.A. (2012). Antioxidant and cytotoxicity of β-amyrin acetate fraction from *Bridelia ferruginea* leaves. *Asian Pacific J. Trop. Biomed.* S981 – S984. doi:10.1016/S2221-1691(12)60347-5.
8. Gholamhoseinian, A., Shahouzehi, B. and Sharifi-far, F. (2010). Inhibitory effect of some plant extracts on pancreatic lipase. *Int. J. Pharmacol.* 6: 18 – 24.
9. Giang, P.M., Huynh-Nga, D.T., Hai, N.X. and Son, P.T. (2009). Further chemical constituents of *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae) originating in Vietnam. *J. Chemistry* 47(5): 640 – 646.

10. Han, L.K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., Zheng, Y.N. and Okuda, H. (2001). Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *Int. J. Obesity*. 25: 1459 – 1464.
11. Hasani-Ranjbar, S., Jouyandeh, Z. and Abdollahi, M. (2013). A systematic review of anti-obesity medicinal plant – an update. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 12: 28 – 37.
12. Hochuli, E., Kupfer, E., Maurer, R., Meister, W., Mercadal, Y. and Schmidt, K. (1987). Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase produced by streptomyces toxytricini. II. Chemistry and structure elucidation. *J. Antibiot.* 40: 1086 – 1091.
13. Holanda Pinto, S.A., Pinto, L.M.S., Cunha, G.M.A., Chaves, M.H., Santos, F.A. and Rao, V.S. (2007). Anti-inflammatory effect of a, b-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacol.* 15: 1 – 5.
14. Hussain, S.A., Khalid, M.S., Ahmed, S.S., Razzaq, A. and Mushtaq, S.S. (2011). In vitro antimicrobial activity of polyherbal formulation. *J. Pharm. Res. Opin.* 1(3): 94 – 95.
15. Jang, D.S., Lee, G.Y., Kim, J., Lee, Y.M., Kim, J.M., Kim, Y.S. and Kim, J.S. (2008). A new pancreatic lipase inhibitor isolated from the roots of *Actinidia arguta. Arch. Pharm. Res.* 31: 666 – 670.
16. Jurenka, J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Altern. Med. Rev.* 13: 128 – 144.
17. Lei, F., Zhang, X.N., Wang, W., Xing, D.M., Xie, W.D., Su, H. and Du, L.J. (2007). Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int. J. Obesity.* 31: 1023 – 1029.
18. Lima, M.P., Braga, P.A.C., Macedo, M.L., Silva, M.F.C.F., Ferreira, A.G., Fernandes, J.B. and Vieira, P.C. (2004). Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: chemosystematic implications. *J. Braz. Chem. Soc.* 15(3): 385 – 394.
19. McDougall, G.J., Kulkarni, N.N. and Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chem.* 115: 193 – 199.

20. Melo, C.M., Carvalho, K.M.M.B., Neves, J.C., Morais, T.C., Rao, V.S., Santos, F.A., Brito, G.A. and Chaves, M.H. (2010). α, β-amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine- induced acute pancreatitis in rats. *World J. Gastroenterol*. 16(34): 4272 – 4280.
21. Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y. Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F and Kiso, Y. (2005). Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J Agr. Food Chem.* 53: 4593 – 4598.
22. Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawa, T. and Yoshikawa M. (2004). Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 14: 1943 – 1946.
23. Oishi, Y., Sakamoto, T., Udagawa, H., Taniguchi, H., Kobayashi-Hattori, K., Ozawa, Y. and takita, T. (2007). Inhibition of increases in blood glucose and serum neutral fat by *Momordica charantia* saponin fractions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 735 – 740.
24. Okoye, N.N., Ajaghaku, D.L., Okeke, H.N., Ilodigwe, E.E., Nworu, C.S. and Okoye, F.B.C. (2014). beta-amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. *Pharm. Biol.* 52(11): 1478 – 1486.
25. Santos, F.A., Frota, J.T., Arruda, B.R., Sousa de Melo, T., Almeida da Silva, A.A., Brito, G.A., Chaves, M.H. and Rao, V.S. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α, β-amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids Health Dis.* 11: 1 – 8.
26. Sahib, N.J. Saari, N., Ismail, A., Khatib, A., Mahomoodally, F. and Hamid, A.A. (2012). Plant's metabolites as potential antiobesity agents. *The Sci. World J.* Article ID 436039. doi:10.1100/2012/436039
27. Satouchi, K., Hirano, K., Fujino, O., Ikoma, M., Tanaka, T. and Kitamura, K. (1998) Lipoxygenase-1 from soybean seed inhibiting the activity of pancreatic lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 62: 1498 – 1503.

28. Sharma, N., Sharma, V.K. and Seo, S.Y. (2005). Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *J. Ethnopharmacol*. 97: 453 – 456.
29. Singh, A.B., Yadav, D.K., Maurya, R. and Srivastava, A.K. (2009). Antihyperglycaemic activity of a-amyrin acetate in rats and db/db mice. *Nat. Prod. Res.* 23(9): 876 – 882.
30. Sinha, B.N. and Bansal, S.K. (2008). A review of phytochemical and biological studies of *Diospyros* species used in folklore medicine of Jharkhand. *J. Nat. Remedies* 8(1): 11 – 17.
31. Weibel, E.K., Hadvary, P., Hochuli, E., Kupfer, E. and Lengsfeld, H. (1987). Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase produced by *streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* 40: 1081 – 1085.
32. วารี เนื่องจำนงค์. องค์ประกอบทางเคมีของลำบิดดงและเท้าแสนปม. งานวิจัยมหาวิทยาลัยบูรพา. 2555 http://www.lib.buu.ac.th/buuir/research/node/428
33. วิทยา ศรีดามา และ คณะ. โรคอ้วนและไขมันในเลือดผิดปกติ. *โรคต่อมไร้ท่อและเมตะบอลิสม.* พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2544. 425 – 476.

ประวัติคณะวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นาง ทักษิณา ชวนอาษา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Taksina Chuanasa
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3102101661237
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. **หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail**

   ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330

   โทรศัพท์ 0-2218-8362 โทรสาร 0-2218-8357 E-mail: taksina.c@chula.ac.th

5. **ประวัติการศึกษา**

วุฒิ	**ปีที่สำเร็จ**	**สาขาวิชา**	**สถาบัน**
ปริญญาเอก	2549	Biochemistry (Plant Biology Program)	Purdue University (USA)
ปริญญาตรี	2540	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยศิลปากร

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

   เทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตสารทุติยภูมิ

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

   7.2.1 โครงการวิจัยเรื่อง “แยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเมตาบอลึซึมของไขมัน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แพนครีเอติกไลเปส” ได้รับทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2556 ระยะเวลา 1 ปี

   7.2.2 โครงการวิจัยเรื่อง “การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเมตาบอลึซึมของไขมัน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แพนครีเอติกไลเปส” ได้รับทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2555 ระยะเวลา 1 ปี

   7.2.3 โครงการวิจัยเรื่อง “การคัดกรองเบื้องต้นเพื่อหาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของสาร renieramycins จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.” ได้รับทุนนักวิจัยใหม่

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2552 ระยะเวลา 1 ปี

7.2.4 โครงการวิจัยเรื่อง “การคัดกรองสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ปกป้องดีเอ็นเอ” ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษก ประจำปี 2550 ระยะเวลา 3 ปี

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

7.3.1 โครงการวิจัยเรื่อง “แยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเมตาบอลีซึมของไขมัน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แพนครีเอติกไลเปส” ได้รับทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2556 ระยะเวลา 1 ปี (หัวหน้าโครงการ)

7.3.2 โครงการวิจัยเรื่อง “การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเมตาบอลีซึมของไขมัน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แพนครีเอติกไลเปส” ได้รับทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2555 ระยะเวลา 1 ปี (หัวหน้าโครงการ)

7.3.3 โครงการวิจัยเรื่อง “การคัดกรองเบื้องต้นเพื่อหาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของสาร renieramycins จากฟองน้ำทะเลสีน้ำเงิน *Xestospongia* sp.” ได้รับทุนนักวิจัยใหม่ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2552 ระยะเวลา 1 ปี (หัวหน้าโครงการ)

7.3.4 โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาพืชสมุนไพรไทยที่สร้างอัลคาลอยด์ต้านมะเร็ง: แคมโททีซิน” ได้รับทุนวิจัยเซเรบอส ประจำปี 2551 ระยะเวลา 1 ปี (ผู้ร่วมวิจัย)

7.3.5 โครงการวิจัยเรื่อง “ศูนย์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลและราเอนโดไฟท์” ได้รับทุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปี 2549 ระยะเวลา 3 ปี (ผู้ช่วยวิจัย)

7.3.6 โครงการวิจัยเรื่อง “การคัดกรองสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ปกป้องดีเอ็นเอ” ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษก ประจำปี 2550 ระยะเวลา 2 ปี (หัวหน้าโครงการ)

7.3.7 โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านไวรัส” ได้รับทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (ผู้ช่วยวิจัย)

<u>ผลงานที่เคยตีพิมพ์หลังจากงานวิจัยเสร็จแล้ว</u>

1. Temeeyasen, G., Srijangwad, A., Tripipat, T., Tipsombatboon, P., Piriyapongsa, J., Phoolcharoen, W., **Chuanasa, T.**, Tantituvanont, A. and Nilubol, D. Genetic diversity of ORF3 and spike genes of porcine epidemic diarrhea virus in Thailand. *Infection Genetic and Evolution* 21, 2014: 205-13.

2. Cheun-Arom, T., Chanvorachote, P., Sirimangkalakitti, N., **Chuanasa, T.**, Naoki, S., Abe, I. and Suwanborirux. Replacement of a quinone by 5-O-acetylhydroquinone abolishes

the accidental necrosis inducing effect while preserving the apoptosis-inducing effect of renieramycin M on lung cancer cells. *Journal of Natural Products* 76, 2013: 1468 – 1474.

3. **Chuanasa, T.**, Chatsumpun, M., Sritularak, B. and Likhitwitayawuid, K. Screening of Thai medicinal plants for free radical scavenging and DNA protective properties. *Journal of Health Research* 25(2), 2011: 91-96.

4. Chatsumpun, M., **Chuanasa, T.**, Sritularak, B. and Likhitwitayawuid, K. Oxyresveratrol Protects Against DNA Damage Induced by Photosensitized Riboflavin. *Natural Product Communications* 6(1), 2011: 41-44.

5. Viraporn, V., Yamazaki, M., Saito, K., Denduangboripant, J., Chayamarit, K., **Chuanasa, T.** and Sukrong, S. Correlation of Camptothecin-producing Ability and Phylogenetic Relationship in the Genus Ophiorrhiza. *Planta Medica* 77(7), 2011: 759-64.

6. **Chuanasa, T.**, Phromjai, J., Lipipun, V., Likhitwitayawuid, K., Suzuki, M., Pramyothin, P., Hattori, M. and Shiraki, K. "Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice." *Antiviral Research* 80, 2008: 62-70.

7. **Sinlapadech, T.**, Stout, J. Ruegger, M.O., Deak, M., and Chapple, C.: The hyper-fluorescent trichome phenotype of the *brt1* mutant of Arabidopsis is the result of a defect in a sinapic acid:UDPG glucosyltransferase. *The Plant Journal* 49(4), 2007: 655-668.

8. Fraser, C.M., Thompson, M.G., Shirley, A.M., Ralph, J., Schoenherr, J.A., **Sinlapadech, T.**, Hall, M.C. and Chapple, C.: Related serine carboxypeptidase-like sinapoylglucose acyltransferases display distinct but overlapping substrate specificity. *Plant Physiology* 144(4), 2007: 1986-1999.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย

7.4.1 โครงการวิจัยเรื่อง "ฐานประเมินที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อมุ่งเป้าหาสารที่มีฤทธิ์ทางยาจากพืชสมุนไพร" ได้รับการสนับสนุนจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษก ประจำปี 2554 ระยะเวลา 3 ปี (ผู้ร่วมวิจัย) ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 90