รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

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

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

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

ผศ. ภญ. ดร.ทักษิณา ชวนอาษา

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา และ การไฟฟ้าฝ่ายผลิต ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ รศ. ภญ.ธาตรี ผดุงเจริญ และ รศ. ภญ. ดร.สุรัตนา อำนวยผล ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างและจำแนกพืชสมุนไพรในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

สขหมู่
เลขทะเบียน 016481
วัน, เดือน, ปี 24 มี.ค. 58

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้ได้ทำการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบที่ได้จากใบของลำบิดดง (*Diospyros filipendula*) ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพสธ.) บริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี การที่ศึกษาผ่านมาพบว่าสารสกัดหยาบนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสมากกว่า 70% ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ในการแยกสารบริสุทธ์ทำโดยวิธีโครมาโทกราฟฟีและทำการตกผลึกจนได้สารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัดหยาบแอททานอล และ ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทของใบลำบิดดง โดยใช้หลักการ bioassay-guided fractionation ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด นำสารบริสุทธิ์มาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยวิธีทางสเปคโตรสโคปี ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance คือ H NMR, C NMR และเปรียบเทียบข้อมูลกับสารอ้างอิง พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้คือ uvaol (MW 442.72) และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ 81.83 % ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml หรือ (2.26 M)

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านแพนครีเอติกไลเปส การแยกสารโดยอาศัยฤทธิ์ทางชีวภาพ สเปคโตรสโคปี พิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้าง

Abstract

The previous study reported that crude ethanol extracts of the leaf part from Lum Bid Dong (*Diospyros filipendula*) collected from the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, Samae-San Island, Chonburi exhibited anti-pancreatic lipase activity over 70% with 1 mg/mL concentration. The crude ethanol extract was partitioned by hexane and ethylacetate, respectively. A pure compound was isolated from both crude ethanol and ethylacetate extracts by bioassay-guided fractionation method. The structure of this compound was identified spectroscopic techniques including H NMR and C NMR, and compared these data with reference spectra of triterpene compounds. The results show that pure compound might be uvaol (ME 442.72). The pancreatic lipase inhibitory activity of uvaol was examined and found that uvaol exhibited 81.83% lipase inhibition with 1 mg/mL (2.26 M).

Keywords: anti-pancreatic lipase activity, bioassay-guided fractionation, spectroscopy, structure elucidation

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	5
ผลการศึกษา	6
สรุปและวิจารณ์ผล	14
เอกสารอ้างอิง	15
ประวัตินักวิจัย	18

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การแยกสิ่งสกัด EtOAc จากใบลำบิดดง ด้วย quick column chromatography	7
ตารางที่ 2	Fraction ที่ได้จากการแยกสิ่งสกัด EtOAc ด้วย quick column chromatrography.....	8
ตารางที่ 3	การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด F3.....	9
ตารางที่ 4	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ของ F3, F3-2 และ ผลึก (C).....	10
ตารางที่ 5	ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของสารที่แยกได้ (C) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ uvaol ใน literature.....	11
ตารางที่ 6	ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของสารที่แยกได้ (C) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ uvaol ใน literature.....	12

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แผนภาพแสดงการสกัดเบื้องต้นในการแยกสารจากใบลำบิดดง	7
รูปที่ 2	แสดงการเคลื่อนที่ของสารใน fraction F1 – F7 บนแผ่น TLC	8
รูปที่ 3	แสดงการเคลื่อนที่ของสารใน fraction F3-1 – F3-9 บนแผ่น TLC	9
รูปที่ 4	สูตรโครงสร้างของ uvaol	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 และสารกลุ่มชาโปนินในชา (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 โดยวิธี bioassay-guided fractionation ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาสารสำคัญนี้ให้เป็นยาต้านเมตาบอลีซึมของไขมันต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์กับวงการแพทย์และเภสัชกรรมไทยรวมถึงประชาชนโดยทั่วไป เนื่องจากโอกาสในการเข้าถึงยาอาจสูงขึ้นเพราะเป็นยาจากประเทศไทยซึ่งอาจส่งผลถึงการลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศและเพิ่มการใช้ยาที่ผลิตได้จากสารในสมุนไพรไทย

วัตถุประสงค์

เพื่อสกัดแยกสารสำคัญจากพืชในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ที่ถูกคัดกรองและแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส

วิธีดำเนินการศึกษา

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ที่ได้เคยทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ในการวิจัยปีที่ผ่านมาได้ผลบวก และมีค่า IC50 น้อย โดยคัดเลือกตัวอย่างสำหรับโครงการวิจัยในปีนี้คือใบของลำบิดดง นำส่วนของพืชสมุนไพรที่เก็บได้มานี้สกัดด้วยตัว ethanol 95% จนได้สารสกัดหยาบ และนำมา partition ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ อีก 2 ชนิดคือ hexane และ ethylacetate (EtOAc) เพื่อแยกสารกลุ่มที่มีความมีขั้วต่างกันออกจากกัน

2. แยกสารสำคัญ โดยอาศัยวิธี Bioassay-guided fractionation

การแยกสารสกัดที่ได้จาก hexane และ EtOAc ออกเป็นส่วนๆ (fraction) โดยใช้วิธีการทาง chromatography แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่วนใดมีฤทธิ์ จะนำมาทำการแยกสารต่อ เพื่อให้มั่นใจว่าสารที่แยกได้นั้น มีฤทธิ์ทางชีวภาพตามที่ต้องการจริง โดยวิธีการหาฤทธิ์ทางชีวภาพนี้การตรวจสอบดำเนินการตามการวิจัยที่ผ่านมา (McDougall et. al., 2009)

3. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาข้อมูลทาง spectroscopy และ/หรือ spectrometry

หาสูตรโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสโดย nuclear magnetic resonance (NMR)

4. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

สถานที่ทำการศึกษาและเก็บข้อมูล

คัดเลือกเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ทำการทดลองที่ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

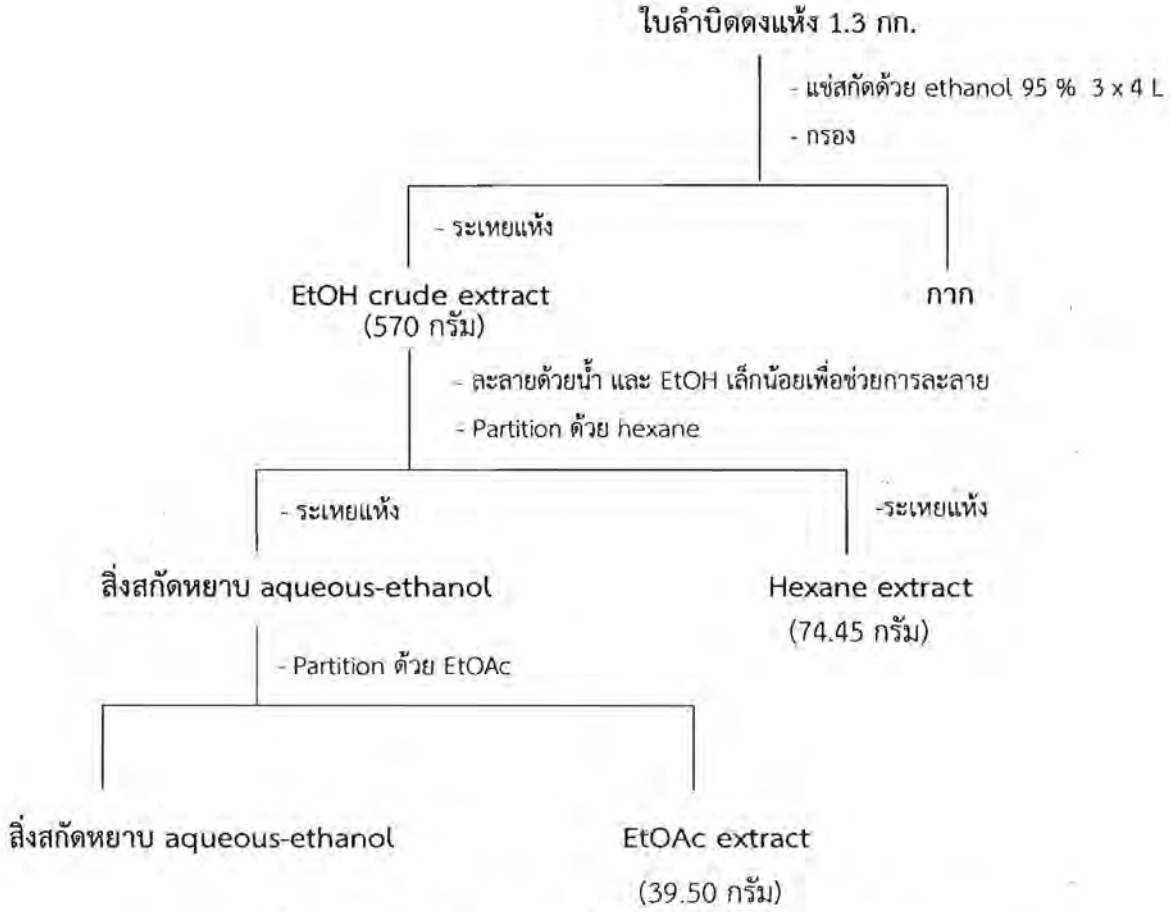
การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบลำบิดดง

นำใบของลำบิดดง บดหยาบน้ำหนัก 1.3 กิโลกรัม มาสกัดด้วยวิธีแช่สกัด (maceration) โดยใช้ ethanol (EtOH) 95% เป็นตัวทำละลาย โดยทำการแช่สกัดครั้งละ 4 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ใช้เวลาในการแช่เป็นเวลานานครั้งละ 2-4 วัน จากนั้นทำการกรอง นำสิ่งสกัดที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้เป็นสิ่งสกัดหยาบ EtOH (EtOH crude extract) น้ำหนัก 570 กรัม จากนั้นนำสิ่งสกัดหยาบ EtOH มาทำการสกัดต่อโดยการ partition กับ hexane และ ethyl acetate (EtOAc) ตามลำดับ นำสิ่งสกัดในแต่ละชั้นไประเหยจนแห้ง ได้เป็น hexane extract น้ำหนัก 74.45 กรัม และ EtOAc extract น้ำหนัก 39.50 กรัม ดังแสดงในรูปที่ 1 นำสิ่งสกัดทั้งสามส่วนไปทดสอบฤทธิ์ การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส พบว่า สิ่งสกัดหยาบ ethanol, EtOAc extract และ hexane extract มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์หรือ % inhibitionเป็น 71.67, 87.13, 78.12 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาแล้วพบว่า EtOAc extract มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุดจึงทำการแยกเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้เป็นอันดับแรก

การแยกสิ่งสกัด EtOAc extract

นำสิ่งสกัด EtOAc น้ำหนัก 36.65 กรัม มาแยกด้วยวิธี quick column chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ ใช้ระบบตัวทำละลายสำหรับเป็นตัวชะ เริ่มต้นด้วย 20% EtOAc ใน hexane โดยค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลาย EtOAc ไปจนถึง 100 % และชะต่อด้วย 100% MeOH เพื่อเพิ่มระดับความมีขั้วของตัวทำละลายขึ้นเป็นลำดับ ปริมาตรที่รับ fraction ครั้งละ 300 มิลลิลิตร แยกได้จำนวนทั้งสิ้น 48 fraction ดังแสดงในตารางที่ 1

จาก fraction ย่อยทั้ง 48 fraction ที่แยกได้จากสิ่งสกัด EtOAc นำมาทำ thin layer chromatography เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบที่มีอยู่ในแต่ละ fraction แล้วรวม fraction ที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 6 fraction ใหญ่ๆ คือ fraction F2 - F7 จากนั้นได้ถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2



รูปที่1 แผนภาพแสดงการสกัดเบื้องต้นในการแยกสารจากใบลำบิดดง

ตารางที่ 1 การแยกสิ่งสกัด EtOAc จากใบลำบิดดง ด้วย quick column chromatography

Fraction	ระบบตัวทำละลาย
1-6	20% EtOAc in hexane
7-14	40% EtOAc in hexane
15-26	60% EtOAc in hexane
27-36	80% EtOAc in hexane
37-41	100% EtOAc
42-48	100% MeOH

ตารางที่ 2 Fraction ที่ได้จากการแยกสิ่งสกัด EtOAc ด้วย quick column chromatrography

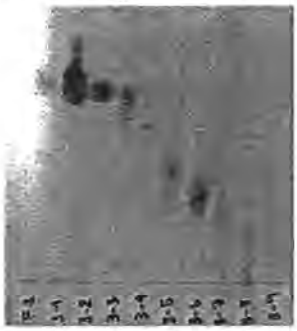
Fraction	รวม fraction	น้ำหนัก (กรัม)	%inhibition	S.D.
F1 (EtOH crude extract)	-	-	71.67	3.24
F2	1-14	0.47	93.28	2.50
F3	15-26	2.44	72.63	0.72
F4	27-32	4.88	57.54	4.86
F5	33-37	6.79	92.41	1.03
F6	15-17	3.34	65.82	1.03
F7	18-25	6.60	33.79	3.99

จากการนำ fraction ของ EtOAc extract ทั้งหมด (F2-F7) ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส พบว่า มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ (%inhibition) เป็นดังตารางที่ 2 และได้เลือก fraction หรือส่วนสกัด ที่มีร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ที่สูงเพียงพอ (มากกว่า 70%) มีปริมาณเหมาะสมและมีความเป็นไปได้สูงในการทำการแยกต่อไป คือ F3 เพื่อนำมาแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ โดยรูปแบบการเคลื่อนที่ของสารบน TLC จากแต่ละ fraction แสดงในรูปที่ 2

รูปที่ 2 แสดงการเคลื่อนที่ของสารใน fraction F1 – F7 บนแผ่น TLC

การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด F3

นำส่วนสกัด F3 มาแยกเป็นส่วนย่อยๆ โดยการผ่าน flash column chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย hexane/EtOAc 1 : 1 ได้ส่วนสกัดย่อย F3-1 ถึง F3-9 พร้อมกันนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส (%inhibition) ซึ่งแสดงในตารางที่ 3 โดยที่หากส่วนสกัดย่อย (subfraction) ที่ได้มีน้ำหนักน้อยกว่า 100 มิลลิกรัม จะยังไม่พิจารณานำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ส่วนสกัดย่อยทั้งหมดได้ถูกตรวจสอบโดย TLC ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการเคลื่อนที่ของสารใน fraction F3-1 – F3-9 บนแผ่น TLC

ตารางที่ 3 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด F3

Fraction	รวม fraction ย่อย	น้ำหนัก (มก.)	%inhibition	S.D.
F3-1	1-3	10	N.T.	-
F3-2	4-5	200	83.17	1.51
F3-3	6-9	70	N.T.	-
F3-4	10-11	530	11.34	2.53
F3-5	12-13	940	21.74	1.52
F3-6	24-28	60	N.T.	-
F3-7	29-32	60	N.T.	-
F3-8	33	18.3	N.T.	-
F3-9	34	150	N.T.	-

หมายเหตุ N.T. คือ ไม่ได้นำไปตรวจสอบ (not tested)

จากการนำส่วนสกัดย่อยต่างๆ F3-2, F3-4 และ F3-5 ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส พบว่า F3-2 มี %inhibition สูงที่สุด คือ 83.17 % ซึ่งถูกพิจารณาในการแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ต่อไป

<u>การแยกบริสุทธิ์สารจาก F3-2 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส</u>

เนื่องจากปริมาณของ F3-2 ค่อนข้างน้อยสำหรับการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป จึงได้ทำเตรียมสารสกัด EtOH crude extract จากใบลำบิดดงอีกครั้ง พบว่ามีผลึก ตกตะกอนออกมา ก่อนการนำไป partition ด้วย hexane และ EtOH จึงได้กรองผลึกนั้นและแยกไว้ นำผลึกที่ได้มาทำการตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2: methanol และทำการล้างผลึกด้วย methanol จนได้ผลึกรูปเข็มสีขาว (colorless fine needle-like crystal : C) และนำไปตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบกับ fraction ที่เกี่ยวข้อง ได้ผลดังตารางที่ 4

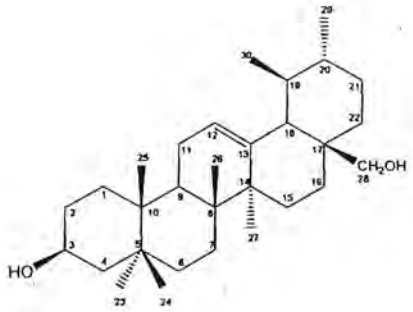
ตารางที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ของ F3, F3-2 และ ผลึก (C)

ส่วนที่สกัดแยกเบื้องต้น	น้ำหนักสารสกัดที่เตรียมได้ (g)	% inhibition ที่ความเข้มข้น 1mg/mL			average	SD
		1	2	3		
F3	2.44	72.35	74.51	68.14	72.63	0.72
F3-2	0.20	84.87	81.97	82.67	83.17	1.51
C	1.12	81.19	83.67	80.62	81.83	1.62

<u>การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้</u>

นำสารที่แยกได้ คือผลึก C นำไปหาข้อมูลทาง spectrophotometry ได้แก่ข้อมูล proton และ carbon NMR (nuclear magnetic resonance) พบว่า สาร C คือสาร uvaol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triterpenoid มีสูตรโครงสร้างที่แสดงในรูปที่ 4 และมีข้อมูลของ ^{1}H-NMR spectra และ ^{13}C-NMR spectra ดังที่แสดงในตารางที่ 5 และ 6

I 26794755



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของ uvaol

ตารางที่ 5 ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของสารที่แยกได้ (C) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ uvaol ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้(C)		ข้อมูล uvaol ที่ตีพิมพ์
carbon		
1	-	2.95 (m), 1.41 (m)
2	-	2.60 (m), 2.35 (m)
3	3.42 (dd, 10.5, 4.8)	-
4	-	-
5	-	1.28
6	-	1.54, 1.03
7	-	1.64, 1.45
8	-	-
9	-	2.44 (s)
10	-	-
11	-	-
12	-	5.62 (s)
13	-	-
14	-	-
15	-	1.18, 1.81 (br)
16	-	0.98, 2.09

17	-	2.14 (m)
18	-	1.64, 1.10
19	-	-
20	-	-
21	-	1.37, 1.18
22	-	1.45, 1.31
23	1.19 (s)	1.07 (s)
24	0.99 (s)	1.10 (s)
25	1.15 (s)	1.27 (s)
26	1.19 (s)	1.18 (s)
27	1.30 (s)	1.37 (s)
28	3.73 (d, 11.1) 3.39 (d, 11.1)	-
29	1.14 (d, 5.7)	0.91 (s)
30	1.00 (d, 5.7)	0.89 (s)

หมายเหตุ * ที่มา Mahato and Kundu, 1994.

ตารางที่ 6 ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของสารที่แยกได้ (C) เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ uvaol ในliterature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว มีดังนี้

ข้อมูลสารที่แยกได้ (C)		ข้อมูล uvaol ที่ตีพิมพ์
carbon	^{13}C Chemical shift	^{13}C Chemical shift
1	38.8	38.8
2	27.3	27.3
3	79.0	79.0
4	38.8	38.8
5	55.2	55.4
6	18.3	18.4
7	32.8	32.9
8	40.0	39.4

9	47.7	47.8
10	36.9	37.2
11	23.4	23.4
12	125.0	125.0
13	138.7	138.0
14	42.0	42.8
15	26.0	29.2
16	23.3	22.6
17	38.0	36.8
18	54.0	54.1
19	39.4	38.9
20	39.4	39.4
21	30.6	30.7
22	35.2	30.6
23	28.1	28.1
24	15.6	15.4
25	15.7	15.6
26	16.8	16.9
27	23.4	23.4
28	69.9	69.7
29	21.3	21.3
30	17.4	16.2

หมายเหตุ * ที่มา Mahato and Kundu, 1994.

สรุปและวิจารณ์ผล

มีรายงานการวิจัยจากหลายแหล่งพบว่าพืชหลายชนิด และสารเคมีหลายกลุ่มสามารถยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส (Hasani-Ranjbar et. al., 2013; Sahib et. al., 2012) อย่างไรก็ดียังไม่มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพนี้จากลำบิดดง (*Diospyros filipendula* Pierre ex Lecomte.) จากการทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับลำบิดดง ซึ่งอยู่ในวงศ์ Ebenaceae ยังไม่มีการใช้เป็นยาพื้นบ้านอย่างชัดเจน และยังไม่มีข้อมูลทางพฤกษเคมีจากใบของลำบิดดง แต่มีรายงานสารสำคัญที่ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากลำบิดดงคือ stigmasterol taraxerol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triterpenoids (วารี เนื่องจำนงค์, 2555)

จากการสกัดแยกสารสำคัญจากใบของลำบิดดง โดยคัดเลือกจากพืชที่มีการคัดกรองแล้วว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส (งานวิจัยปีที่ผ่านมาแล้ว) โดยอาศัยเทคนิค bioassay-guided fractionation ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในทุกส่วนที่แยกเป็น fraction ต่างๆ และเลือกแยกสารสำคัญเฉพาะส่วนที่มีฤทธิ์เท่านั้น สารบริสุทธิ์ที่แยกได้คือ uvaol จัดเป็นสารกลุ่ม triterpenoid ซึ่งพบในธรรมชาติที่แยกได้จากพืชหลายชนิด เช่น ส่วนของใบและน้ำมันจากผล olive (*Olea europaea*) ที่กำลังสุก (Casas et al., 2004) ดอกของ chrysanthemum (Ukiya et. al., 2002) ใบของพืชในสกุล *Diospyros* ต่างๆ เช่น *D. kaki* (Fan and He, 2006) *D. melanoxylon* (Mallavahani et. Al., 2001) *D. montana* (Dutta et. Al., 1972) ส่วนรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของ uvaol มีหลากหลายแต่ไม่เด่นชัด (Sun et. al., 2006) และยังไม่มีการรายงานฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส

จากข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของ uvaol ที่แยกได้จากลำบิดดง ที่สามารถต้านเมตาบอลีซึมของไขมันผ่านทางกลไกการยับยั้งเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส ถือได้ว่าเป็นการค้นพบที่ได้องค์ความรู้ใหม่ และสามารถนำไปศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แพนครีเอติกไลเปสในสภาวะที่มี uvaol ในปฏิกิริยา ซึ่งจะทำให้สามารถทราบได้ว่าการยับยั้งนั้นมีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพดีอย่างไร การศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตจะช่วยให้ทราบถึงศักยภาพของ uvaol ในการพัฒนาเป็นยาต้านไขมันได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Ballinger, A. and Peikin, S,R. (2002). Orlistat: its current status as an anti-obesity drug. *Eur. J. Pharmacol.* 404: 109 – 117.
2. Birari, R.B. and Bhutani, K.K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov. Today.* 12: 879 – 889.
3. Casas, J.S., Bueno, E.O., Garcia, A.M.M. and Cano, M.M. (2004). Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oil from cultivars of Extremadura (Spain). *Food Chem.* 87: 225 – 230.
4. Dutta, P.K., Dutta, N.L and Chakravarthi, R.N. (1972). Sterols and triterpenes of *Diospyros montana*. *Phytochem.* 11(3): 1180 – 1181.
5. Fan, J. and He, C. (2006). Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 950 – 956.
6. Gholamhoseinian, A., Shahouzehi, B. and Sharifi-far, F. (2010). Inhibitory effect of some plant extracts on pancreatic lipase. *Int. J. Pharmacol.* 6: 18 – 24.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. Jurenka, J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Altern. Med. Rev.* 13: 128 – 144.
12. 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.
13. Mahato, S.B. and Kundu, A.P. (1994). ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A complication and some silent features. *Phytochemistry* 37(6): 1517 – 1575.
14. Mallavahani, U.V., Panda, A.K. and Rao, Y.R. (2001). *Diospyros melanoxylon* leaves: A rich source of pentacyclic triterpenes. *Pharm. Biol.* 39(1): 20 – 24.
15. McDougall, G.J., Kulkarni, N.N. and Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chem.* 115: 193 – 199.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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
20. 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.
21. Sharma, N., Sharma, V.K. and Seo, S.Y. (2005). Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *J. Ethnopharmacol.* 97: 453 – 456.

22. Sun, H., Fang, W., Wang, W. and Hu, C. (2006). Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. *Bot. Studies* 47: 339 – 368.

23. Ukiya, M., Akihisa, T., Tokuda, H., Suzuki, H., Mukainaka, T., Ichiishi, E., Yasukawa, K., Kasahara, Y. and Nishino, H. (2002). Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. Cancer Letters 177: 7 – 12.

24. 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.

25. วารี เนื่องจำนงค์. องค์ประกอบทางเคมีของลำบิดดงและเท้าแสนปม. งานวิจัยมหาวิทยาลัยบูรพา. 2555 http://www.lib.buu.ac.th/buuir/research/node/428

26. 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 "แยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเมตาบอลีซึมของไขมัน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แพนครีเอติกไลเปส" ได้รับทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2556 ระยะเวลา 1 ปี

   7.2.2 โครงการวิจัยเรื่อง "การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเมตาบอลีซึมของไขมัน 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. Cheun-Arom, T., Chanvorachote, P., Sirimangkalakitti, N., **Chuanasa, T.**, Naoki, S., Abe, I. and Suwanborirux. Replacement of a quinine 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* 2013

2. 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* 2013 (accepted)

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): 655-668, 2007.

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) : 1986-1999, 2007.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย

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