รายงานการวิจัย

เรื่อง

สารยับยั้งไลเพสจากพืชสมุนไพร

(Lipase inhibitors from medicinal plants)

จัดทำโดย

อาจารย์ ดร. จรรยา ชัยเจริญพงศ์

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีนาคม 2559

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยสารยับยั้งไลเพสจากพืชสมุนไพรนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2557 และ 2558

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพส ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบเอทานอลของตะไคร้ เหง้าขมิ้น เมล็ดพริกไทยดำ และผลมะเขือพวงมีฤทธิ์การยับยั้งที่สูง มีค่าเท่ากับ 71±2, 75±1, 76±2 และ 87±9% ตามลำดับ และส่วนสกัดหยาบน้ำของเหง้ากระชาย ใบทองพันชั่ง ผลพุทราจีน ผลส้มแขก เหง้าข่า ฐานรองดอกกระเจี๊ยบแดง และใบสะระแหน่ ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 71±5, 76±1, 77±10, 77±7, 88±1, 91±1, 92±2% ตามลำดับ ผลมะเขือพวงถูกคัดเลือกเพื่อการทดลองในขั้นต่อไป สารสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตของผลมะเขือพวงมีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสดีที่สุด มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 67.2±3.6% และรองลงมาคือสารสกัดหยาบเฮกเซนมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 46.0±6.7% ดังนั้นส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและเอทิลแอซิเทตถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้สาร **Hex 1** และ **EA 1**, ตามลำดับ สาร **Hex 1** เป็นสารผสมสเตียรอยด์ คือ 17-(1,5-dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-ol, campesterol, *β*-sitosterol และ stigmasterol และแสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเพสต่ำ ด้วยค่า IC_{50} 82.56 mg/ml สาร **EA 1** คือ 7-hydroxy-6-methoxycoumarin (scopoletin) แสดงฤทธิ์ยับยั้งไลเพสต่ำ ด้วยค่า IC_{50} 91.98 mg/ml

Abstract

Medicinal plants with lipase inhibitory activity were ethanol extracts of stem of *Cymbopogon citratus* Stapf., root of *Curcuma longa*, seed of *Piper nigrum* and fruit of *Solanum torvum* with %inhibition of 71±5, 75±1, 76±2 และ 87±9%, respectively and water extracts of root of *Boesenbergia rotunda*, leaf of *Rhinacanthus nasutus*, fruit of *Ziziphus mauritiana*, fruit of *Garcinia atroviridis*, root of *Alpinia galangal*, receptacle of *Hibiscus sabdariffa* and leaf of *Metha cordifolia* with %inhibition of 71±5, 76±1, 77±10, 77±7, 88±1, 91±1, 92±2%. Fruit of *S. torvum* was selected for next step as active plant. Ethyl acetate crude extract of fruit of *S. torvum* showed the strongest inhibition activity as 67.2±3.6% inhibition and the second was hexane crude extract with value of 46.0±6.7% inhibition. Therefore, hexane and ethyl acetate crude extracts were isolated and purified to obtain **Hex 1** and **EA 1**, respectively. **Hex 1** was a mixture of steroids, 17-(1,5-dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-ol, campesterol, *β*-sitosterol and stigmasterol and showed weak lipase inhibitory activity with IC_{50} 82.56 mg/ml. **EA 1** was 7-hydroxy-6-methoxycoumarin (scopoletin) and exhibited weak lipase inhibitory activity with IC_{50} 91.98 mg/ml.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ช
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	1
วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
วิธีดำเนินการวิจัย	7
สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย	7
วิธีการดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	12
สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป	31
บรรณานุกรม	32
ประวัติผู้วิจัย	34

สารบัญตาราง

ตารางที่	ชื่อตาราง	หน้า
1	ความสัมพันธ์ของค่าดัชนีมวลกายและความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วย	2
2	ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบเอทานอลและส่วนสกัดหยาบน้ำของพืชสมุนไพร	13
3	ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบของผลมะเขือพวง	14
4	ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบเฮกเซนที่แยกได้	15
5	ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของสารสกัดหยาบเฮกเซนที่แยกได้	17
6	ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตที่แยกได้	18
7	ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตที่แยกได้	19
8	ความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H-NMR, ^{13}C- NMR และ HMBC correlation ของสาร **EA1**	29

สารบัญภาพ

ภาพที่	ชื่อภาพ	หน้า
1	การย่อยสลายไทรเอซิลกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์แพนครีเอทิคไลเพส	3
2	โครงสร้างของออร์ลิสแทต (1-(3-hexyl-4-oxo-oxetan-2-yl) tridecan-2-yl-2-formylamino-4-methyl-pentanoate)	4
3	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโทรฟีนิลพาล์มิเทตและแพนครีเอทิกไลเพส	8
4	การสกัดผลมะเขือพวง	14
5	โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (^{1}H NMR spectrum) ของสาร **Hex 1**	20
6	GC-MS สเปกตรัมของสาร **Hex 1**	21
7	สูตรโครงสร้างของสาร **Hex 1**	22
8	โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ของสาร **EA 1**	23
9	คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**	24
10	Dept 90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**	25
11	DEPT 135 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**	26
12	HSQC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**	27
13	HMBC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**	28
14	ความสัมพันธ์แบบ HSQC และ HMBC Correlations ของสาร **EA1**	29
15	สูตรโครงสร้างของสาร **EA1**	30

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

BMI	body mass index
dd	doublet of doublet for NMR spectrum
Dept	distortionless enhancement by polarization transfer
g	กรัม
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
^{1}H NMR	proton Nuclear magnetic resonance spectroscopy
H_2O	น้ำ
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
Hz	Hertz
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration
kg	กิโลกรัม
L	ลิตร
m	multiplet for NMR spectrum
mg	มิลลิกรัม
MHz	Megahertz
mL	มิลลิลิตร
MS	Mass spectrometry
na	no activity
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
ppm	part per million
s	singlet for NMR spectrum
Tris HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloric acid

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคอ้วนจัดเป็นปัญหาหลักทางสาธารณสุขที่พบมากขึ้นในยุคปัจจุบัน คนไทยมีปัญหาเกี่ยวกับโรคอ้วนเนื่องจากพฤติกรรมการบริโภคที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะการนิยมบริโภคอาหารประเภทที่มีแป้ง น้ำตาล และไขมันสูง ทำให้มีน้ำหนักตัวและไขมันสะสมในร่างกายเพิ่มขึ้น การมีน้ำหนักตัวมากเกินไปส่งผลโดยตรงต่อบุคลิกภายนอกและก่อให้เกิดโรคภัยต่างๆ ตามมา ภาวะแทรกซ้อนของโรคอ้วนที่พบได้บ่อย ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โรคเกี่ยวกับถุงน้ำดี โรคมะเร็งบางชนิด โรคกระดูกเสื่อม โรคเกี่ยวกับตับ เป็นต้น ยาลดความอ้วนที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ ยาออร์ลิสแทต (orlistat) ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพส ทำให้ไขมันถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายน้อยลง ร่างกายจึงนำไขมันที่เก็บสะสมไว้ออกมาใช้ ส่งผลให้ความอ้วนลดลงได้ แต่ยาออร์ลิสแทตนี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ ปัจจุบันยาชนิดนี้มีการควบคุมการใช้เฉพาะในสถานพยาบาลเท่านั้น และยังคงติดตามผลการใช้ยาอยู่ ปัจจุบันคนไทยมีความตื่นตัวในเรื่องสุขภาพอนามัยมากขึ้น รู้จักเอาใจใส่ในการรักษาสุขภาพของตนเองและครอบครัว พร้อมกับกระแสความนิยมในการใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ ในปัจจุบันกำลังเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังนิยมนำพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ มาใช้เป็นยาลดความอ้วนอีกด้วย แต่เนื่องจากยังขาดผลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่น่าเชื่อถือ จึงไม่สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยจากการใช้พืชสมุนไพรเหล่านั้นได้

งานวิจัยนี้มีแนวความคิดที่จะศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของพืชสมุนไพร โดยการสกัดและแยกหาองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในสมุนไพร และพิสูจน์ทราบโครงสร้างทางเคมีของสารยับยั้งไลเพส องค์ความรู้ที่จะได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นให้กับผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกินมาตรฐานและผู้ที่ใส่ใจกับสุขภาพ และอาจนำมาพัฒนาเป็นยาลดความอ้วนได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อสกัด แยก และพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารยับยั้งไลเพสจากพืชสมุนไพร

ขอบเขตของโครงการวิจัย

สกัดพืชสมุนไพรด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วแยกสารสกัดนั้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารยับยั้งไลเพสที่แยกได้จากพืชสมุนไพร

ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โรคอ้วนเป็นโรคที่เกิดจากการเสียสมดุลย์ของพลังงานของร่างกาย ผู้ป่วยโรคอ้วนมีลักษณะสำคัญ คือ มีไขมันทั่วร่างกายมากกว่าปกติ สาเหตุของโรคอ้วน ได้แก่ กรรมพันธุ์ โรคของต่อมไร้ท่อ การรับประทานอาหารที่มีแป้งและไขมันมาก การขาดการออกกำลังกาย และการใช้ยาบางชนิดติดต่อกันเป็น

เวลานาน โรคอ้วนเป็นสาเหตุของปัญหามากมาย และบางครั้งอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ โรคแทรกซ้อนของความอ้วนที่พบบ่อย ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โรคเกี่ยวกับถุงน้ำดี โรคมะเร็งบางชนิด โรคกระดูกเสื่อม โรคเกี่ยวกับตับ เป็นต้น

องค์การอนามัยโลกกำหนดมาตราฐานที่เป็นเครื่องบ่งชี้ว่าบุคคลอยู่ในภาวะอ้วนหรือไม่ โดยใช้ค่าดัชนีมวลกาย (Body mass index, BMI) ซึ่งคำนวณจากน้ำหนักตัวและส่วนสูง ดังนี้

$$\text{ดัชนีมวลกาย} = \frac{\text{น้ำหนักตัว หน่วยกิโลกรัม}}{(\text{ส่วนสูง หน่วยเมตร})^2}$$

* หมายเหตุ การคำนวณวิธีนี้ไม่ใช้กับเด็กที่กำลังเจริญเติบโต สตรีมีครรภ์ และนักกีฬา

ซึ่งค่าดัชนีมวลกายในระดับต่างๆ แสดงให้เห็นถึงความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วย แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของค่าดัชนีมวลกายและความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วย

ประเภท	ดัชนีมวลกาย	ความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วย
น้ำหนักตัวต่ำกว่าเกณฑ์	น้อยกว่า 18.5	ต่ำ (เสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ)
น้ำหนักตัวปกติ	18.5 – 24.9	ปกติ
น้ำหนักตัวเกิน	25 – 29.9	เพิ่มกว่าปกติ
โรคอ้วนขั้นที่ 1	30 – 34.9	เพิ่มขึ้นอย่างมาก
โรคอ้วนขั้นที่ 2	35 – 39.9	ต่ำ (เสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ)
โรคอ้วนขั้นที่ 3	40 ขึ้นไป	เพิ่มขึ้นถึงขั้นรุนแรง

จากตารางข้างต้นจะพบว่าผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกิน (ค่า BMI มากกว่า 25) และผู้ที่เป็นโรคอ้วน (ค่า BMI มากกว่า 30) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดการเจ็บป่วยอย่างมาก หรือกล่าวได้ว่าการมีน้ำหนักตัวเกินหรืออ้วนมีผลต่อระบบการทำงานในร่างกาย ก่อให้เกิดโรคหลายชนิด อัตราการเสียชีวิตของคนที่อ้วนมากมีสูงถึง 2-12 เท่า ขึ้นอยู่กับอายุของแต่ละบุคคล

วิธีการรักษาโรคอ้วนที่ดีต้องมีการผสมผสานการรักษาหลายวิธีร่วมกัน คือ การควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่ไม่เหมาะสม ส่วนการรักษาโดยใช้ยานั้นต้องใช้ในกรณีจำเป็นต่อการรักษาโรคอ้วนจริงๆ ซึ่งควรปรึกษาแพทย์และเภสัชกรก่อนจะใช้ยารักษาโรคอ้วน เพราะยาอาจมีผลข้างเคียง โดยเฉพาะต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจ โรคตับ และโรคไต

ยาลดความอ้วน

ยาลดความอ้วนหรือยาลดน้ำหนักแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยา ได้แก่ ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ที่สมอง โดยมีผลต่อศูนย์ควบคุมการรับประทานอาหาร หรือความอยากอาหาร และ

ยาที่ออกฤทธิ์ส่วนนอกสมอง ได้แก่ ยาที่ออกฤทธิ์ที่ทางเดินอาหาร ยาลดความอ้วนซึ่งออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางมีจุดประสงค์เพื่อลดความอยากอาหารหรือทำให้เกิดความรู้สึกอิ่ม โดยเป็นผลมาจากการเพิ่มสารเคมีในสมอง คือ catecholamine และ/หรือ serotonin ซึ่งสารเคมีทั้งสองตัวนี้ออกฤทธิ์ควบคุมความอยากอาหารและอารมณ์ ยากลุ่มที่ออกฤทธิ์ที่สมองนี้แบ่งออกตามฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

ก. กลุ่มที่ออกฤทธิ์ผ่าน catecholamine pathways ได้แก่ amphetermine, phenmetrazine, amfepramone, phetermine, mazindol, cathine และ phenylpropanolamine ซึ่งยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทซิมพาเทติก

ข. กลุ่มที่ออกฤทธิ์ผ่าน serotonin pathways ได้แก่ fenfluramine และ dexfenfluramine ซึ่งยาในกลุ่มนี้ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทซิมพาเทติก

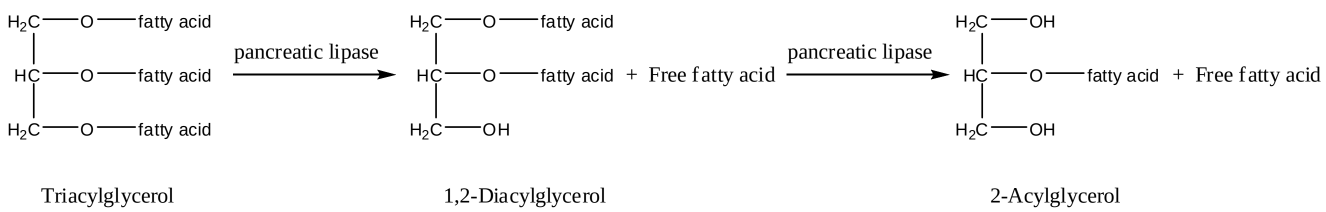
สำหรับยาที่ออกฤทธิ์ที่ทางเดินอาหาร แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

ก. สารที่พองตัวในกระเพาะอาหาร (bulk forming agents) เป็นสารที่ไม่ถูกย่อยสลายให้เป็นพลังงาน ทำให้อิ่มแต่ไม่ให้พลังงาน เช่น glucomannan ซึ่งเป็นแป้งที่เป็นเส้นใยธรรมชาติสกัดจากหัวบุกบางชนิด

ข. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพส (pancreatic lipase inhibitors) เช่น orlistat ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพสจากตับอ่อนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยไขมันให้อยู่ในรูปที่ร่างกายนำไปใช้ได้

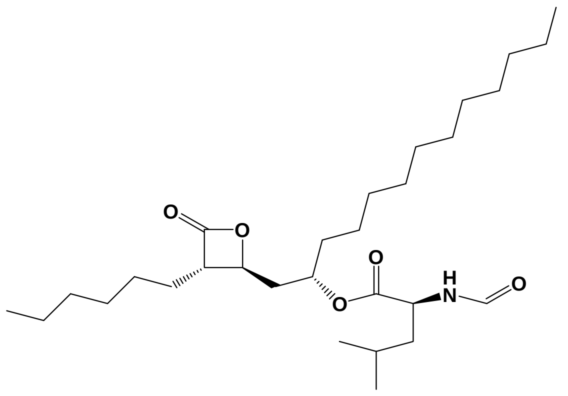
ไลเพส

ไลเพส (acylglycerol acylhydrolase, EC3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายของน้ำมันและไขมัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล นอกจากนี้ไลเพสยังเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นซึ่งเป็นปฏิกิริยาผันกลับในระบบที่มีน้ำน้อยหรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย เอนไซม์นี้สกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย) จุลินทรีย์เป็นแหล่งของไลเพสที่สำคัญ เนื่องจากมีความง่ายในการผลิต การเก็บเกี่ยว และการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ มีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง น้ำยาซักล้าง เชื้อเพลิงชีวภาพ อาหาร เครื่องสำอาง และยา ไลเพสมีหลายชนิด เช่น pancreatic lipase, lipoprotein lipase, hormone sensitive lipase เป็นต้น ในร่างกายมนุษย์มีเอนไซม์ไลเพสที่ผลิตจากตับอ่อน ทำหน้าที่ย่อยสลายไทรเอซิลกลีเซอรอล โดยสลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมกรดไขมันกับกลีเซอรอลตรงตำแหน่งที่ 3 ก่อน แล้วค่อยย่อยตรงตำแหน่งที่ 1 ตามลำดับ ได้กรดไขมันอิสระ (free fatty acids) 1,2-diacylglycerols และ 2-acylglycerols ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยกรดไขมันอิสระมักอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมหรือเกลือโพแทสเซียม



ภาพที่ 1 การย่อยสลายไทรเอซิลกลีเซอรอลด้วยเอนไซม์แพนครีเอทิคไลเพส

การยับยั้งการทำงานของไลเพสจะมีผลทำให้ลดการดูดซึมไขมัน และเพิ่มการขับถ่ายของไตรกลีเซอไรด์ในอุจจาระ ทำให้ไขมันในอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่ถูกย่อยและไม่สามารถดูดซึมไปใช้ได้ จึงเป็นเหตุให้ร่างกายไม่ได้รับพลังงานจากไขมันเหล่านี้ ออร์ลิสแทตเป็นยาตัวแรกของยาลดความอ้วนในกลุ่มยับยั้งไลเพส รู้จักกันในชื่อ tetrahydrolipstatin มีชื่อทางการค้า คือ Xenical ผลิตโดยบริษัท Roche และมีสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2 ซึ่งแยกได้จากแบคทีเรีย *Streptomyces toxytricini* ในปี 1987 โดยปกติอัตราการใช้ยาออร์ลิสแทต คือ วันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 120 มิลลิกรัม ก่อนอาหาร กลไกการทำงานของออร์ลิสแทตคือทำให้ไขมันที่รับประทานเข้าไปประมาณ 1/3 ไม่ถูกดูดซึม และเพิ่มการขับถ่ายของไตรกลีเซอไรด์ในอุจจาระ ทำให้ไขมันในอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่ถูกย่อยและไม่สามารถดูดซึมไปใช้ได้ เป็นเหตุให้ร่างกายไม่ได้รับพลังงานจากไขมันเหล่านั้น ร่างกายต้องนำไขมันที่เก็บสะสมไว้ออกมาใช้ จึงทำให้น้ำหนักลดลง อาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ของการใช้ยาที่เด่นชัดเกี่ยวข้องกับการดูดซึมไขมันที่ผิดปกติ (fat malabsorption) ได้แก่ ไม่สามารถกลั้นอุจจาระได้ (faecal urgency) อุจจาระไม่เกาะรวมกัน (loose) มีแก๊สและไขมันขับออกมาด้วย นอกจากนี้ยังอาจมีผลทำให้การดูดซึมวิตามินที่ละลายในไขมันผิดปกติได้ (fat soluble vitamin malabsorption) ฉะนั้นเมื่อใช้ยานี้จึงแนะนำให้รับประทานยาวิตามินรวมอย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนหรือหลังรับประทานยา ปัจจุบันยาตัวนี้ถูกควบคุมการใช้เฉพาะในสถานพยาบาลเท่านั้น



<u>ภาพที่ 2</u> โครงสร้างของออร์ลิสแทต (1-(3-hexyl-4-oxo-oxetan-2-yl) tridecan-2-yl-2-formylamino-4-methyl-pentanoate)

นอกจากออร์ลิสแทตแล้วยังพบรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารยับยั้งไลเพสอีกหลายชนิด เช่น Gargouri และคณะ (1984) พบโปรตีนบางชนิดที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ซีรัมแอลบูมิน (serum albumin) และบีตาแล็กโตโกลบูลิน (β-lactoglobulin) ที่ความเข้มข้นมากกว่าไมโครโมลาร์มีความสามารถยับยั้งไลเพส

Tani และคณะ (1995) พบโปรตีนขนาดน้ำหนักประมาณ 25 และ 28 กิโลดาลตันในข้าวสาลีสามารถยับยั้งไลเพส ซึ่งโปรตีนเหล่านี้สกัดแยกด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) และอิเล็กโทรโฟริซิสสองมิติ (two dimensional eletrophoresis)

Hatano และคณะ (1997) พบสารประเภทฟลาวานไดเมอร์ (flavan dimer) จากต้น *Cassia nomame* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

Satouchi และคณะ (1998) รายงานการพบโปรตีนในถั่วเหลืองซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติในการยับยั้งไลเพสคล้ายโปรตีนซีรัมแอลบูมิน และบีตาแล็กโตโกลบูลิน

Han และคณะ (2001) สกัดสารซาปอนินจากชาอู่หลง ชาเขียว และชาดำ ด้วยเมทานอล ซึ่งสามารถยับยั้งไลเพส 100, 75 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Moreno และคณะ (2003) สกัดเมล็ดองุ่นด้วยเอทานอล จากนั้นสกัดต่อด้วยน้ำและเฮกเซน (hexane) พบว่าสารสกัดน้ำสามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเพส 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Slanc และคณะ (2004) ศึกษาการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสจาก wood-damaging fungi และ macrofungi จำนวน 60 สปีชีส์ พบสายพันธุ์ที่ออกฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด 3 ชนิด คือ *Laetiporus sulphureus*, *Tylopilus felleus* และ *Hygrocybe conica* โดยมีค่าการยับยั้งคือ 83% ± 5%, 96% ± 3% และ 97% ± 5% ตามลำดับ

Sharma และคณะ (2005) ศึกษาสารสกัดของพืชสมุนไพรเกาหลีจำนวน 75 ชนิด ซึ่งสกัดด้วยเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีพืช 3 ชนิดที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *Eriochloa villosa* (Thunb.) Kunth (83%), *Orixa japonica* Thunb. (81.3%) และ *Setaria italica* (L.) Palib. (80.3%)

Xu และคณะ (2005) พบสารจำพวกไทรเทอร์ปีนอยดอลซาปอนิน (triterpenoidal saponins) ในรากต้น *Platycodon grandiflorum* ได้แก่ สารพลาติโคดิน เอ ซี ดี (platycodin A, C, D) และสารดีอะพิโอพลาติโคดิน ดี (deapioplatylcodin D) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพส 3.3, 5.2, 34.8 และ 11.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

He และคณะ (2006) รายงานการพบสารประเภทโพลีฟีนอล (polyphenol) จากชาเขียวซึ่งสามารถยับยั้งไลเพสได้

วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1) เตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรสำหรับการวิจัย โดยการล้างพืชสมุนไพรด้วยน้ำให้สะอาด อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด

2) สกัดพืชสมุนไพรด้วยเอทานอล และน้ำ ตามลำดับ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธีการระเหยแบบสุญญากาศภายใต้ความดัน (rotary evaporation under reduced pressure) และทำสารสกัดให้แห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry)

3) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของสารสกัดหยาบของพืชสมุนไพร

4) แยกสารสกัดหยาบของพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกัน เช่น เฮกเซน เอทิลแอซิเทต และน้ำ

5) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดที่แยกได้

6) แยกส่วนสกัดในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ให้ค่าการยับยั้งที่มีค่าสูงที่สุดเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์

7) พิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีต่างๆ เช่น NMR MS เป็นต้น

8) วิเคราะห์ผล สรุปผล เขียนรายงานการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ที่จะได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับทางเลือกใหม่ที่ปลอดภัยของผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกินมาตรฐาน และผู้ที่ใส่ใจกับสุขภาพ เป็นผลดีต่อการบรรเทาหรือลดปัญหาสาธารณสุขจากโรคอ้วนให้แก่สังคมได้ นอกจากนี้ผลการวิจัยอาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานวิจัยขั้นประยุกต์ต่อไป โดยสารยับยั้งไลเพสที่แยกได้นี้อาจนำมาศึกษา และพัฒนาเป็นยาลดความอ้วนในอนาคตต่อไป และสามารถนำผลงานวิจัยนี้ไปเผยแพร่ในงานประชุม/สัมมนาทางวิชาการ วารสารทางวิชาการ อีกทั้งยังเป็นโอกาสที่ดีในการสร้างและฝึกฝนนักวิจัยรุ่นใหม่เพื่อพัฒนาทักษะในการทำงานวิจัย ส่งผลให้มีการพัฒนางานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ให้กับประเทศไทยด้วย

วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

<u>สารเคมี</u>

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เฮปเทน เฮกเซน เอทิลแอซิเทต เมทานอล เอทานอล ไดคลอโรมีเทน แอซิโทไนไตรล์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide)
2. เอนไซม์ไลเพส
3. Tris HCl pH 8.5
4. พาราไนโทรฟีนิลพาล์มิเทต (*p*-nitrophenyl palmitate)
5. ออร์ลิสแทต
6. ซิลิกาเจล (no. 7734 E. Merck)

<u>วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์</u>

1. แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Silica gel 60 F_{254} E. Merck)
2. คอลัมน์แก้ว
3. แท่งแก้ว
4. pasteur pipette พร้อมจุกยางซิลิโคน
5. กระดาษกรองเบอร์ 1
6. ตัวอย่างพืชสมุนไพร
7. ถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม (tissue culture plate 96 well)
8. บีกเกอร์ ขนาด 50, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
9. ขวดรูปชมพู ขนาด 50, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
10. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (micropipette)
11. เครื่องชั่ง
12. เครื่องคนชนิดใช้สนามแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
14. ตู้อบ (hot air oven)
15. เครื่องบด
16. เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum rotary evaporator)
17. เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-Vis spectrometer)
18. Nuclear magnetic resonance spectrometer (400 MHz)
19. Gas chromatography – Mass spectrometer

วิธีการดำเนินการวิจัย

การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

1) เตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพร ล้างพืชสมุนไพรด้วยน้ำให้สะอาด อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส และบดพืชให้เป็นชิ้นเล็กๆ

2) สกัดพืชด้วยเอทานอล 200 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และระเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธีการระเหยแบบสุญญากาศภายใต้ความดัน (rotary evaporation under reduced pressure)

3) นำกากของพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยเอทานอลจากข้อ 2) มาสกัดต่อด้วยน้ำ 150 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และระเหยตัวทำละลายด้วยวิธีการระเหยแบบสุญญากาศภายใต้ความดัน (rotary evaporation under reduced pressure)

4) นำส่วนสกัดหยาบเอทานอลและน้ำมาทำให้แห้ง

5) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบของพืชสมุนไพร โดยใช้สารละลายพาราไนโทรฟีนอลที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโทรฟีนิลพาล์มิเทตเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการทำงานของไลเพส โดยความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบพืชสมุนไพรที่ทดสอบคือ 25 mg/mL ส่วนสกัดหยาบเอทานอลละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และส่วนสกัดหยาบน้ำละลายด้วยน้ำ

$$p\text{-Nitrophenyl palmitate} \xrightarrow[\text{Pancreatic lipase}]{H_2O} p\text{-Nitrophenol} + \text{Plamitic acid}$$

<u>ภาพที่ 3</u> ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโทรฟีนิลพาล์มิเทตและแพนครีเอทิกไลเพส

การแยกสารและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไลเพสของผลมะเขือพวง

1) สกัดสารจากพืชทดสอบที่ให้ค่าการยับยั้งที่ดีจากการคัดกรอง คือ ผลมะเขือพวง ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลแอซิเทต เมทานอล และน้ำ ตามลำดับ และนำส่วนสกัดหยาบทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

2) แยกส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

2.1) แยกส่วนสกัดหยาบเฮกเซนด้วยเทคนิคควิกคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่คือ เฮกเซน เฮกเซน:เอทิลแอซิเทต (1:1 โดยปริมาตร) เอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต:เมทานอล (4:1 โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้แฟรกชันรวม 4 ส่วน (A-D) แล้วทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของสาร A-D

2.2) แยกสาร B ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและเอทิลแอซิเทต (1:1 โดยปริมาตร) เอทิลแอซิเทต และสารละลายผสมเอทิลแอซิเทตและเมทานอล (9:1 และ 4:1 โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบ

องค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส

2.3) แยกสาร BA ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและเอทิลแอซิเทต (9:1 โดยปริมาตร) และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 4 แฟรกชัน (BAA-BAD) จากนั้นนำส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส

2.4) แยกสาร BAA ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

2.5) แยกสาร BAAA ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮปเทน สารละลายผสมเฮปเทนและเฮกเซน (1:1 โดยปริมาตร) เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน (1:1 โดยปริมาตร) และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

2.6) แยกสาร BAAAD ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน (1:1 และ 3:2 โดยปริมาตร) และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

2.7) แยกสาร BB ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน (1:1 โดยปริมาตร) และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส

2.8) แยกสาร BBC ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน (4:1 โดยปริมาตร) และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

2.9) แยกสาร BBCC ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน (7:3 และ 3:2 โดยปริมาตร) ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และสารละลายผสมเอทิลแอซิเทตและเมทานอล (9:1 โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

2.10) แยกสาร BBCCD ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน และสารละลายผสมเฮกเซนและแอซิโทน (49:1 และ 19:1 โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

2.11) แยกสาร BBCCDF ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง (preparative thin layer chroatography) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเอทิลแอซิเทต (19:1 โดยปริมาตร) ได้สารบริสุทธิ์ของแข็งสีขาว **Hex 1** 37.6 มิลลิกรัม (0.0009% yield) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของสารที่แยกได้

3) แยกส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

3.1) ส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตถูกแยกด้วยเทคนิคควิกคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่คือ เฮกเซน เฮกเซน:เอทิลแอซิเทต (1:1 โดยปริมาตร) เอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต:เมทานอล (9:1 และ 4:1โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส

3.2) แยกสาร F ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเอทิลแอซิเทต (9:1 และ 1:1โดยปริมาตร) และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกันจากนั้นนำส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส

3.3) แยกสาร FE ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและเอทิลแอซิเทต (19:1, 9:1, 4:1 และ 3:2 โดยปริมาตร) เอทิลแอซิเทต และสารละลายผสมเอทิลแอซิเทตและเมทานอล (4:1 โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

3.4) แยกสาร FEE ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน และสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเอทิลแอซิเทต (1:1 โดยปริมาตร) และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

3.5) แยกสาร FEEA ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน และสารละลายผสมเฮกเซนและแอซีโทน (19:1 และ 1:1 โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

3.6) แยกสาร FEEAC ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน (4:1 โดยปริมาตร) ไดคลอโรมีเทน และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน

3.7) แยกสาร FEH และ FEI ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเอทิลแอซิเทต (1:1 โดยปริมาตร) และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารบริสุทธิ์ของแข็งสีครีม **EA1** 23.1 มิลลิกรัม และนำสารนี้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส

การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร Hex 1 และ EA 1

ทดสอบหาโครงสร้างของสารทั้งสองด้วยเทคนิคโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{1}H NMR), คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{1}C NMR), Dept 90 NMR, Dept 135 NMR และ GC-MS (Gas chromatography mass spectrometry)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

พืชสมุนไพรที่นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสมีจำนวน 16 ชนิด (ตารางที่ 2) ซึ่งทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบเอทานอลและน้ำของพืชสมุนไพร โดยใช้สารละลายพาราไนโทรฟีนอลที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพาราไนโทรฟีนิลปาล์มิเทตเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการทำงานของไลเพส โดยความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบพืชสมุนไพรที่ทดสอบคือ 25 mg/mL พบว่ามีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพสได้ดี ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบเอทานอลของตะไคร้ เหง้าขมิ้น เมล็ดพริกไทยดำ และผลมะเขือพวง ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งเท่ากับ 77±2%, 75±1%, 76±2% และ 87±9% ตามลำดับ สำหรับส่วนสกัดหยาบน้ำของพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งสูง ได้แก่ เหง้ากระชาย ใบทองพันชั่ง ผลพุทราจีน ผลส้มแขก เหง้าข่า ฐานรองดอกกระเจี๊ยบแดง และใบสะระแหน่ ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 71±5%, 76±1%, 77±10%, 77±7%, 88±1%, 91±1% และ 92±2% ตามลำดับ ผู้วิจัยได้เลือกผลมะเขือพวงในการทำงานวิจัยขั้นต่อไป

ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไลเพสของผลมะเขือพวง

1) ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไลเพสของส่วนสกัดหยาบของผลมะเขือพวง

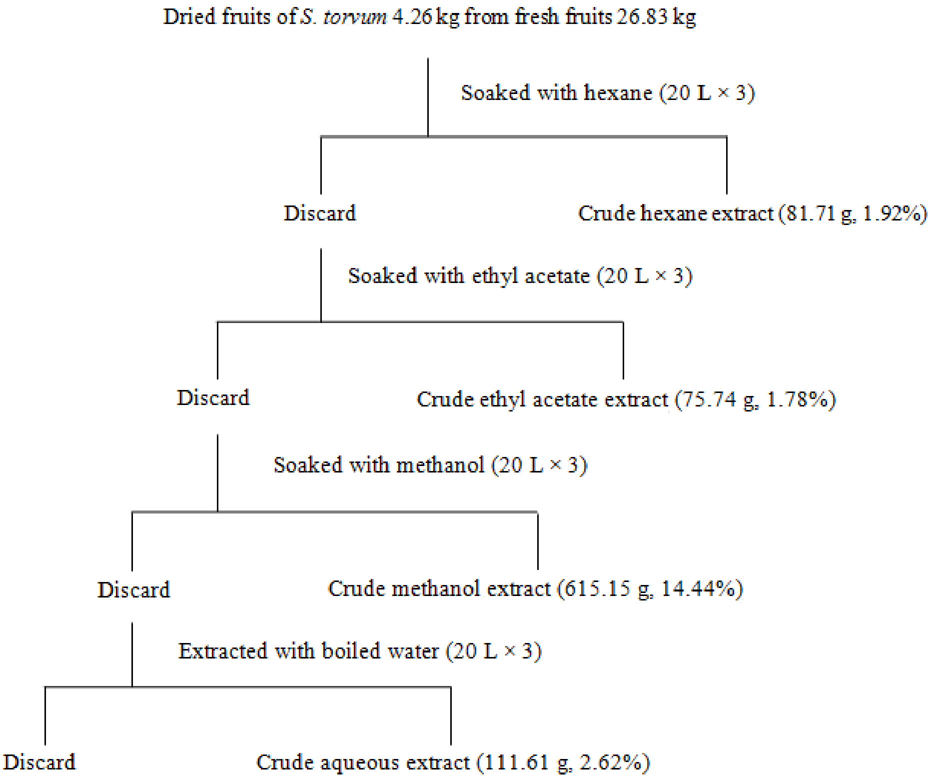
สกัดผลมะเขือพวงด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลแอซิเทต เมทานอล และน้ำ ตามลำดับ (รูปที่ 4) และนำส่วนสกัดหยาบทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเพส (ตารางที่ 3) พบว่าส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตมีฤทธิ์การยับยั้งไลเพสดีที่สุด ซึ่งมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 67±3% รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบเฮกเซนมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 46±6% ส่วนสกัดหยาบเมทานอลและน้ำมีฤทธิ์การยับยั้งที่น้อยมาก คือ 16±1% และ 8±2% ตามลำดับ ดั้งนั้นส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและเอทิลแอซิเทตน่าจะมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไลเพสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย จึงนำมาแยกต่อเพื่อหาสารบริสุทธิ์

<u>ตารางที่ 2</u> ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบเอทานอลและส่วนสกัดหยาบน้ำของพืชสมุนไพร

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ใช้	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	
			ส่วนสกัดหยาบเอทานอล	ส่วนสกัดหยาบน้ำ
Abelmoschus esculentus Linn.	กระเจี๊ยบเขียว	ผล	56±2	32±10
Allium sativum Linn.	กระเทียม	หัว	56±2	52±1
Alpinia galanga (L.) Willd.	ข่า	เหง้า	37±3	88±1
Boesenbergia rotunda (L.) Mansf	กระชาย	เหง้า	na	71±5
Carthamus tinctorius Linn.	คำฝอย	ดอก	42±2	23±3
Curcuma longa Linn.	ขมิ้น	เหง้า	75±1	na
Cymbopogon citratus Stapf.	ตะไคร้	ลำต้น	71±2	4±1
Garcinia atroviridis Griff.	ส้มแขก	ผล	60±12	77±7
Hibiscus sabdariffa Linn.	กระเจี๊ยบแดง	ฐานรองดอก	na	91±1
Metha cordifolia Opiz.	สะระแหน่	ใบ	66±8	92±2
Piper nigrum Linn.	พริกไทยดำ	เมล็ด	76±2	24±10
Rhinacanthus nasutus (L.) Kurz.	ทองพันชั่ง	ใบ	31±3	76±1
Senna alexandrina (P.) Miller.	มะขามแขก	ใบ	62±12	68±8
Solanum torvum Swartz.	มะเขือพวง	ผล	87±9	7±1
Zingiber officinale Roscoe.	ขิง	เหง้า	18±2	67±5
Ziziphus mauritiana Mill.	พุทราจีน	ผล	14±1	77±10
ออร์ลิสแทต* (Positive control)			93±2	

หมายเหตุ * หมายถึง ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 1 x 10^{-5} mg/mL

na หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพส



ภาพที่ 4 การสกัดผลมะเขือพวง

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบของผลมะเขือพวง

ส่วนสกัดหยาบ	ลักษณะ	ปริมาณ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
เฮกเซน	ของแข็ง สีเขียว	81.7	46.0±6.7
เอทิลแอซิเทต	ยางเหนียว สีเขียวเข้ม	75.7	67.2±3.6
เมทานอล	ยางเหนียว สีน้ำตาลเข้ม	615.2	15.8±1.1
น้ำ	ของแข็ง สีน้ำตาลเข้ม	111.6	8.5±1.1
ออร์ลิสแทต*			93.6±1.1

หมายเหตุ * หมายถึง ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 1 x 10^{-5} mg/mL

2) การแยกส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของผลมะเขือพวงและฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

2.1) ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนถูกแยกด้วยเทคนิคควิกคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่คือ เฮกเซน เฮกเซน:เอทิลแอซิเทต (1:1 โดยปริมาตร) เอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต:เมทานอล (4:1 โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้แฟรกชันรวม 4 ส่วน

(A-D) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของสาร A-D (ตารางที่ 4) พบว่าสาร A-C มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 48-50% และสาร D มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุด 11.7±5.7%

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบเฮกเซนที่แยกได้

ส่วนสกัดที่แยกได้	เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้	น้ำหนักสารที่แยกได้ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
A	เฮกเซน	15.2	48.0±7.3
B	เฮกเซน:เอทิลแอซิเทต (1:1)	68.2	48.8±2.3
C	เอทิลแอซิเทต	0.8	50.3±6.1
D	เอทิลแอซิเทต:เมทานอล (4:1)	0.4	11.7±5.7
ออร์ลิสแทต*			93.6±1.1

หมายเหตุ * หมายถึง ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 1 x 10^{-5} mg/mL

2.2) แยกสาร B ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและเอทิลแอซิเทต เอทิลแอซิเทต และสารละลายผสมเอทิลแอซิเทตและเมทานอล ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 8 แฟรกชัน (BA-BH) จากนั้นนำส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส (ตารางที่ 5)

2.3) แยกสาร BA ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและเอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 4 แฟรกชัน (BAA-BAD) จากนั้นนำส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส (ตารางที่ 5)

2.4) แยกสาร BAA ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 5 แฟรกชัน (BAAA-BAAE)

2.5) แยกสาร BAAA ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮปเทน สารละลายผสมเฮปเทนและเฮกเซน เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 5 แฟรกชัน (BAAAA-BAAAE)

2.6) แยกสาร BAAAD ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 5 แฟรกชัน (BAAADA-BAAADE)

2.7) แยกสาร BB ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 5 แฟรกชัน (BBA-BBE) จากนั้นนำส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส (ตารางที่ 5)

2.8) แยกสาร BBC ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 4 แฟรกชัน (BBCA-BBCD)

2.9) แยกสาร BBCC ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเทต และสารละลายผสมเอทิลแอซิเทตและเมทานอล ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 7 แฟรกชัน (BBCCA-BBCCG)

2.10) แยกสาร BBCCD ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน และสารละลายผสมเฮกเซนและแอซิโทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 7 แฟรกชัน (BBCCDA- BBCCDG)

2.11) แยกสาร BBCCDF ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง (preparative thin layer chroatography) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเอทิลแอซิเทต ได้สารบริสุทธิ์ของแข็งสีขาว **Hex 1** 37.6 มิลลิกรัม (0.0009% yield) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของสารที่แยกได้ เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 60.7±0.5% ที่ความเข้มข้น 4 mg/ml (ตารางที่ 5) พร้อมทดสอบหาค่า IC_{50} มีค่าเท่ากับ 82.56 mg/ml

<u>ตารางที่ 5</u> ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของสารสกัดหยาบเฮกเซนที่แยกได้

สารสกัดที่แยกได้	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
BA	92.3±2.4
BB	96.4±1.3
BC	94.1±6.9
BD	75.0±7.1
BE	65.9±2.3
BF	82.9±3.7
BG	70.8±6.8
BH	32.1±7.1
BAA	88.4±2.8
BAB	87.5±1.8
BAC	88.0±13.4
BAD	94.2±7.2
BBA	55.0±3.7
BBB	55.0±3.7
BBC	87.9±1.2
BBD	57.1±9.4
BBE	71.3±2.1
Hex 1	60.7±0.5

3) การแยกส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตของผลมะเขือพวงและฤทธิ์ยับยั้งไลเพส

3.1) ส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตถูกแยกด้วยเทคนิคควิกคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่คือ เฮกเซน เฮกเซน:เอทิลแอซิเทต (1:1 โดยปริมาตร) เอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต:เมทานอล (9:1 และ 4:1โดยปริมาตร) ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้แฟรกชันรวม 5 ส่วน (E-I) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพสของสาร E-I (ตารางที่ 6) พบว่าสาร F และ G มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ดี 82.8±8.2 และ 80.4±4.5% ตามลำดับ สาร H และ I มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปานกลาง 67.9±5.2% และ 62.1±2.8% ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสาร E ต่ำที่สุด อยู่ที่ 38.1±14.9%

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตที่แยกได้

สารสกัดที่แยกได้	เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้	น้ำหนักสารที่แยกได้ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
E	เฮกเซน	30.7	38.1±1.9
F	เฮกเซน:เอทิลแอซิเทต (1:1)	27.7	82.8±8.2
G	เอทิลแอซิเทต	6.7	80.4±4.5
H	เอทิลแอซิเทต:เมทานอล (9:1)	4.9	67.9±5.2
I	เอทิลแอซิเทต:เมทานอล (4:1)	3.9	62.1±2.8
ออร์ลิสแทต*	93.6±1.2		

หมายเหตุ * หมายถึง ความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 1 x 10^{-5} mg/mL

3.2) แยกสาร F ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 10 แฟรกชัน (FA-FJ) จากนั้นนำส่วนที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส (ตารางที่ 7)

3.3) แยกสาร FE ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและเอทิลแอซิเทต เอทิลแอซิเทต และสารละลายผสมเอทิลแอซิเทตและเมทานอล ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกันได้ทั้งหมด 10 แฟรกชัน (FEA-FEJ)

3.4) แยกสาร FEE ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน และสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 3 แฟรกชัน (FEEA- FEEC)

3.5) แยกสาร FEEA ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน และสารละลายผสมเฮกเซนและแอซีโทน ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 4 แฟรกชัน (FEEAA- FEEAD)

3.6) แยกสาร FEEAC ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน สารละลายผสมเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน และเอทิลแอซิเทต

ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 9 แฟรกชัน (FEEACA- FEEACI)

3.7) แยกสาร FEH และ FEI ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเอทิลแอซิเทต และเอทิลแอซิเทต ตามลำดับ ตรวจสอบองค์ประกอบของแฟรกชันที่แยกได้ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และรวมแฟรกชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารบริสุทธิ์ของแข็งสีครีม **EA1** 23.1 มิลลิกรัม และนำสารนี้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไลเพส พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 33.6±1.4% ที่ความเข้มข้น 4 mg/ml (ตารางที่ 7) พร้อมทดสอบหาค่า IC_{50} มีค่าเท่ากับ 91.98 mg/ml

<u>ตารางที่ 7</u> ฤทธิ์ยับยั้งไลเพสของสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตที่แยกได้

สารสกัดที่แยกได้	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
FA	na
FB	49.3±4.9
FC	54.6±2.6
FD	66.7±1.6
FE	77.4±6.8
FF	23.6±5.3
FG	6.1±2.8
FH	54.2±7.3
FI	68.8±6.3
FJ	70.2±8.5
EA 1	33.6±1.4

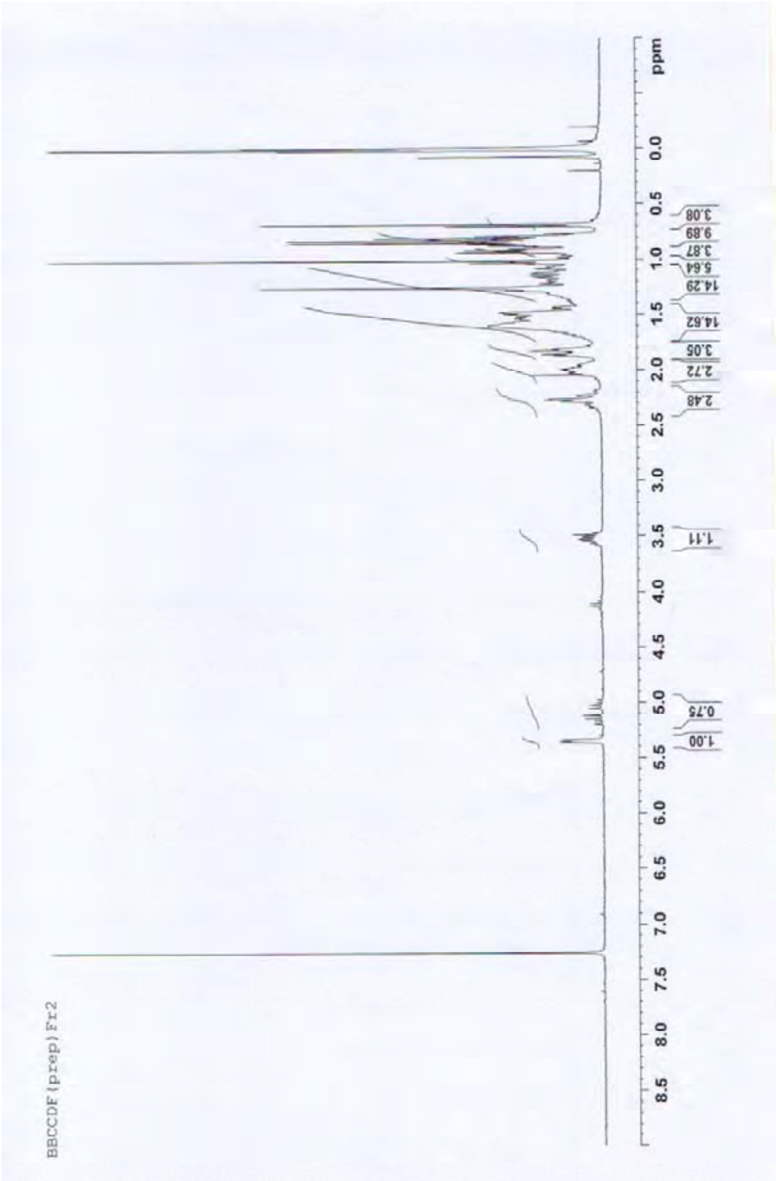
หมายเหตุ * na หมายถึง no activity

4) การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสาร Hex 1 และ EA 1

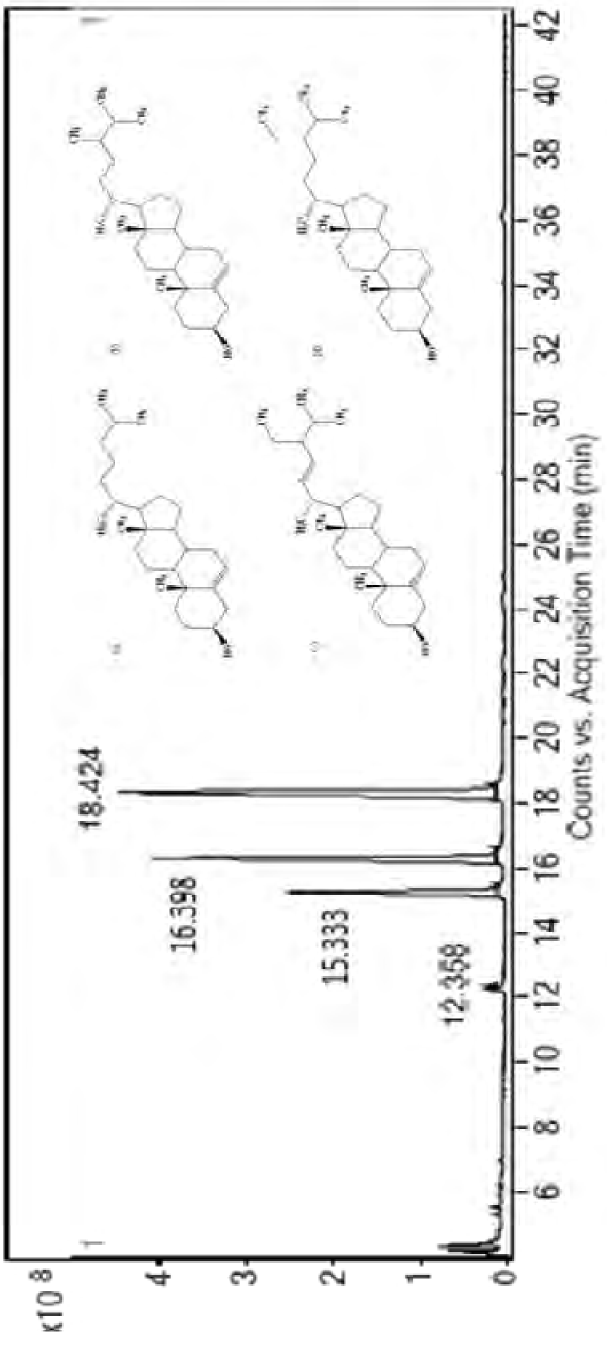
4.1) สาร **Hex 1**

ข้อมูลจากสเปกตรัมของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{1}H NMR) (ภาพที่ 5) พบสัญญาณของ olefinic methine proton 3 ตำแหน่ง คือ δ 5.02 (dd, δ = 8.7, 8.4 Hz), 5.14 (dd, δ = 8.7, 8.4 Hz) และ 5.35 (d, δ = 5.1 Hz) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ระบุว่าเป็นหมู่ฟังก์ชันของพันธะคู่ของคาร์บอนอะตอม และสัญญาณของ carbinyl proton 1 ตำแหน่งคือ δ 3.53 (m) แสดงให้เห็นว่าสารนี้มีหมู่ฟังก์ชันแอลกอฮอล์ และจากข้อมูลของสเปกตรัม GC-MS (Gas chromatography mass spectrometry) พบองค์ประกอบที่ให้เวลาต่างกัน 4 ค่า คือ 12.358, 15.333, 16.398 และ 18.424 นาที (ภาพที่ 6) จากนั้นตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบข้อมูลของ Wiley

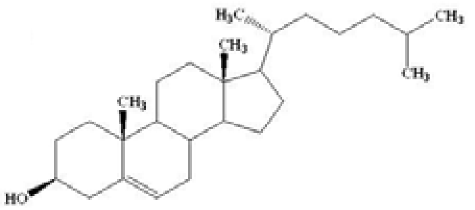
and Nist standard chart library พบว่าสาร **Hex 1** ประกอบด้วยสารประเภทสเตียรอยด์ 4 สาร คือ 17-(1,5-dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-ol, campesterol, *β*-sitosterol และ stigmasterol ในสัดส่วน 1.18**%**, 19.40**%**, 33.14**%** และ 46.29**%** ตามลำดับ สูตรโครงสร้างทั้งหมดแสดงดังภาพที่ 7



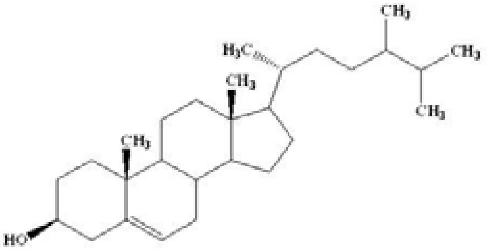
ภาพที่ 5 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (^{1}H NMR spectrum) ของสาร **Hex 1**



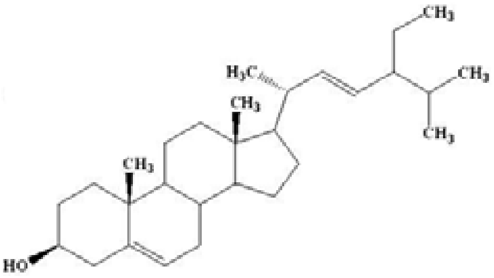
<u>ภาพที่ 6</u> GC-MS สเปกตรัมของสาร **Hex 1**



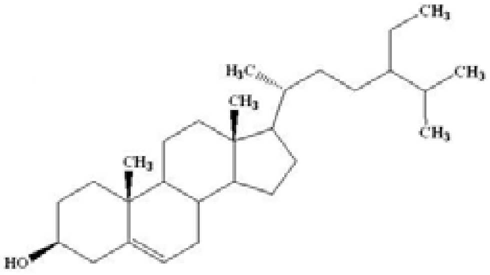
17-(1,5-Dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-ol



Campesterol



β-Sitosterol



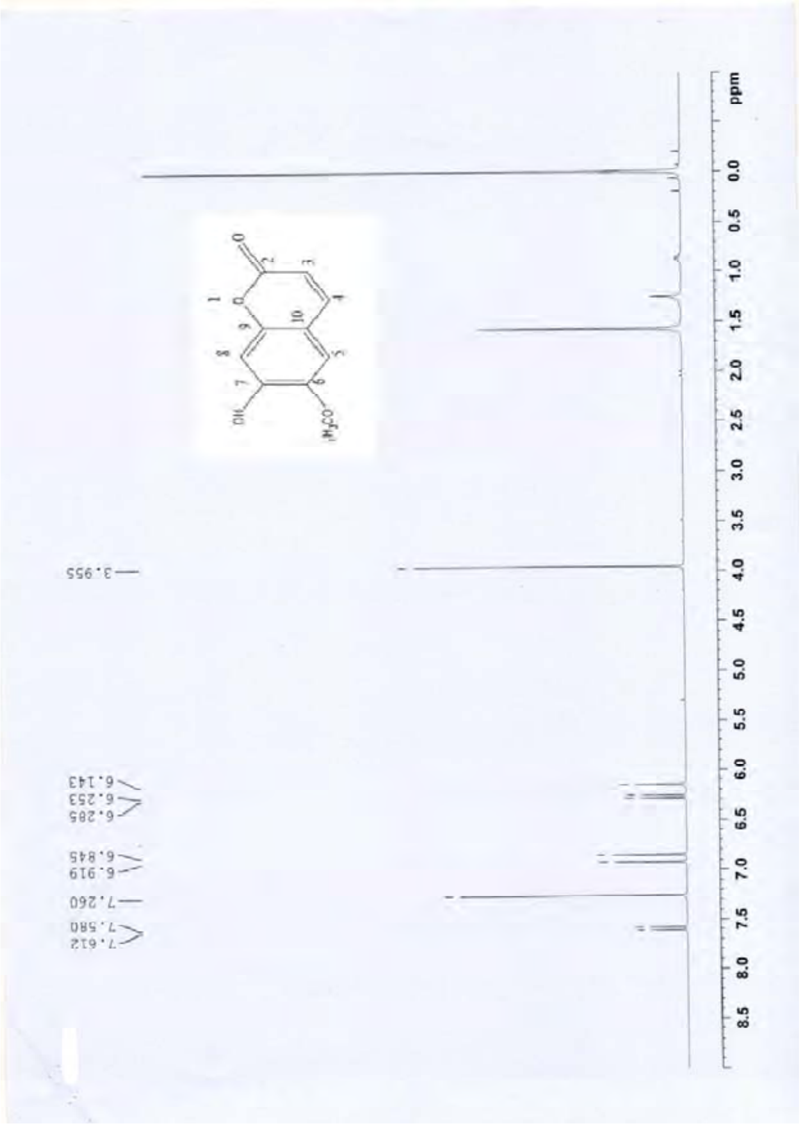
Stigmasterol

<u>ภาพที่ 7</u> สูตรโครงสร้างของสาร **Hex 1**

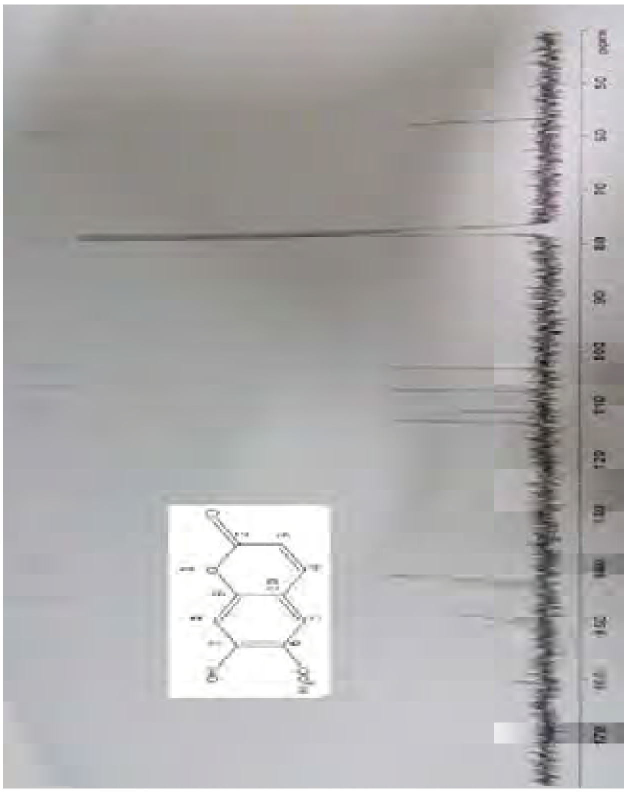
4.2) สาร **EA 1**

ข้อมูลจากสเปกตรัมของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{1}H NMR) (ภาพที่ 8) พบสัญญาณของ hydroxyl และ methoxyl proton ที่ตำแหน่ง δ 6.15 (s) และ 3.95 (s) ตามลำดับ คาร์บอนสเปกตรัมในภาพที่ 9 แสดงสัญญาณของคาร์บอนอะตอมที่มีพันธะคู่ในอะตอม 2 ตำแหน่ง คือ δ 7.59 และ 6.26 ppm และสัญญาณของคาร์บอนอะตอมประเภท aromatic proton ที่ δ 6.92 และ 6.85 ppm และจากข้อมูลของคาร์บอนสเปกตรัมพบว่าสารนี้มีจำนวนคาร์บอนอะตอม 10 อะตอม โดยค่า δ 161.42 ppm แสดงลักษณะเฉพาะของ sp^2 carbon atom ของสารประกอบคูมาริน (coumarin compound) สัญญาณของค่า δ 56.40 ppm แสดงลักษณะเฉพาะของ sp^3 carbon atom ที่เกิดพันธะโดยตรงกับอะตอมของออกซิเจน ซึ่งอาจเป็น methoxy group ($O-CH_3$) นอกจากนี้ข้อมูลของสเปกตรัม DEPT90 (ภาพที่ 10) และ DEPT135 (ภาพที่ 11) พบว่าคาร์บอนอะตอมที่ให้ค่าสัญญาณ δ 103.19, 107.47, 113.43 และ 143.27 ppm คืออะตอมคาร์บอนประเภท sp^2 carbon =CH– และค่าสัญญาณ δ 111.49, 143.98, 149.67 และ 150.26 ppm คืออะตอมคาร์บอนประเภท quaternary sp^2 carbon นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จาก HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy) (ภาพที่ 12) และ HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy) (ภาพที่ 13) ทำให้สามารถระบุตำแหน่งของ hydroxyl และ methoxyl carbon ได้ โดยดูจากความสัมพันธ์ของ C-6, C-7 และ C-8 ดังแสดง

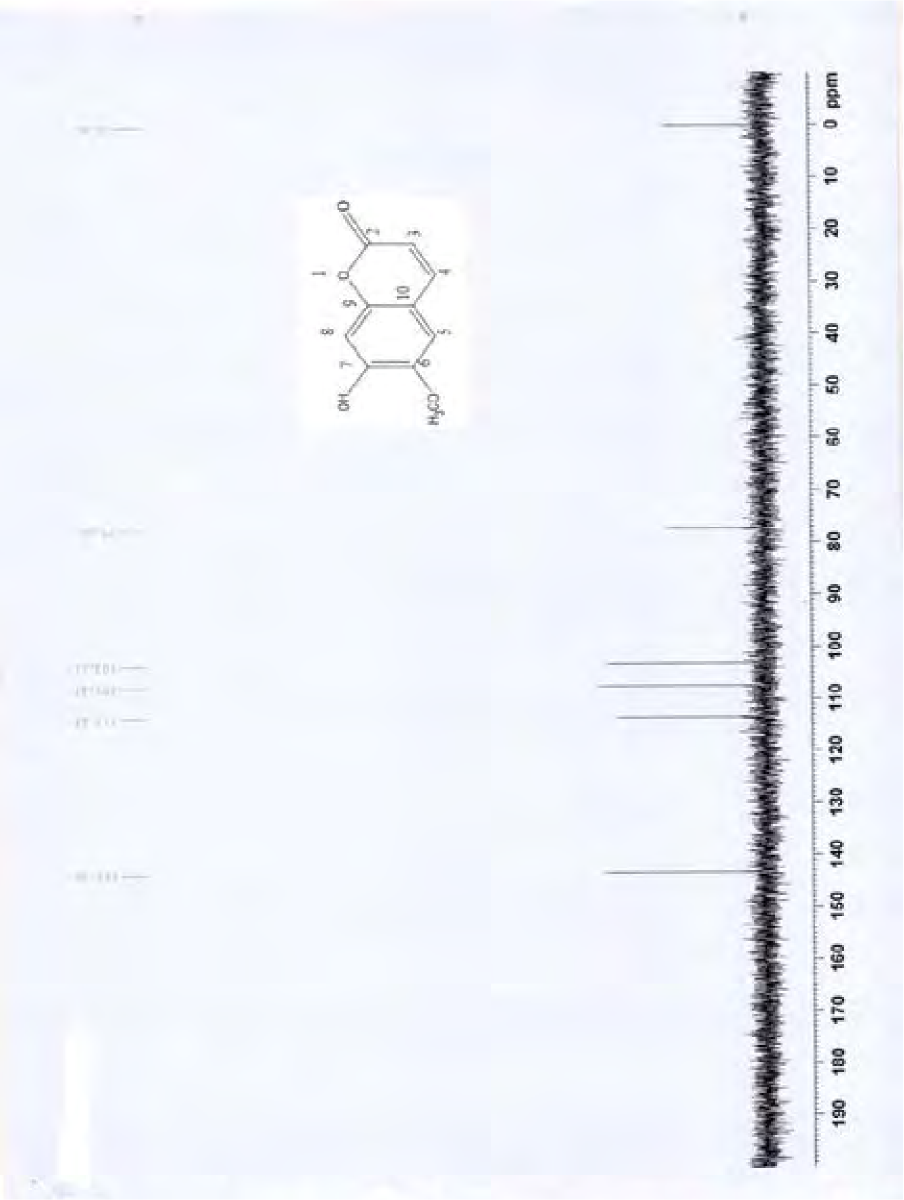
ในตารางที่ 8 และภาพที่ 14 จากข้อมูลทั้งหมดทำให้สามารถระบุโครงสร้างทางเคมีของสาร **EA 1** ดังแสดงในภาพที่ 15 ซึ่งมีชื่อเรียกกว่า 7-hydroxy-6-methoxycoumarin หรือ scopoletin สารนี้สามารถแยกได้จากพืชหลายชนิด เช่น *Saussure aeopygmae, Morinda officinalis* and *Coriarian epalensis* เป็นต้น ซึ่งมีรายงานพบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร scopoletin นี้ เช่น hepatoprotective activity, antipyretic, hypothermic และ anti-inflammatory activities



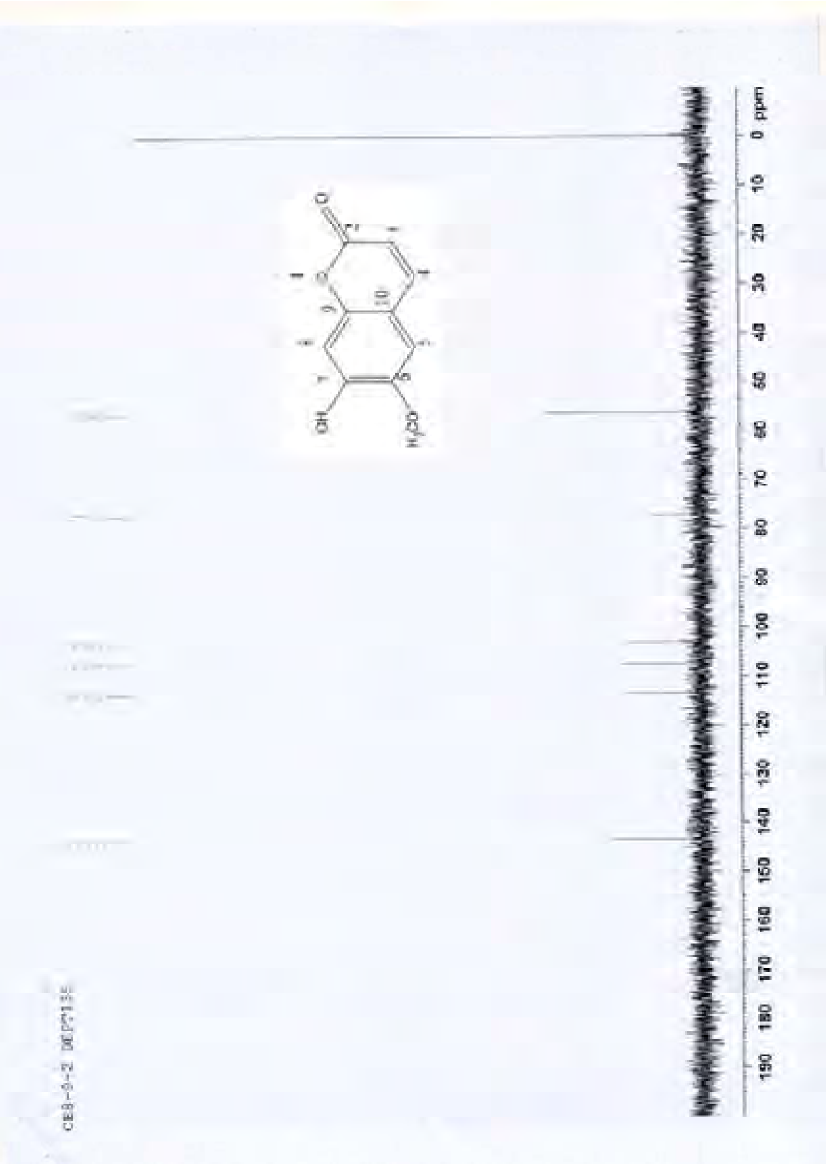
<u>ภาพที่ 8</u> โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ของสาร **EA 1**



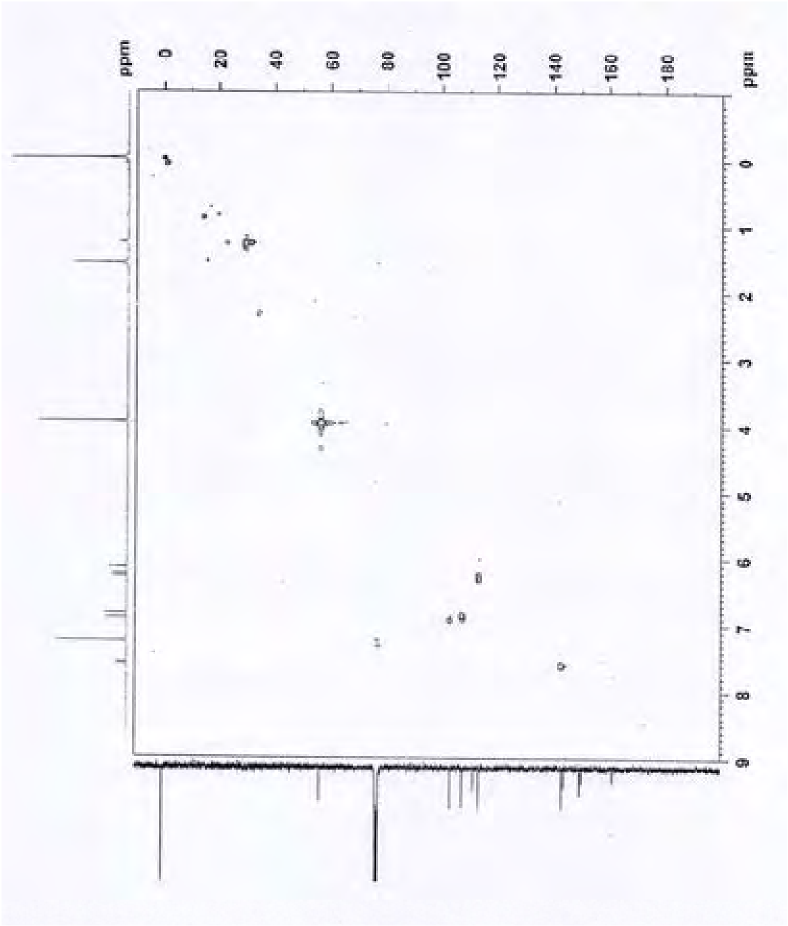
<u>ภาพที่ 9</u> คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**



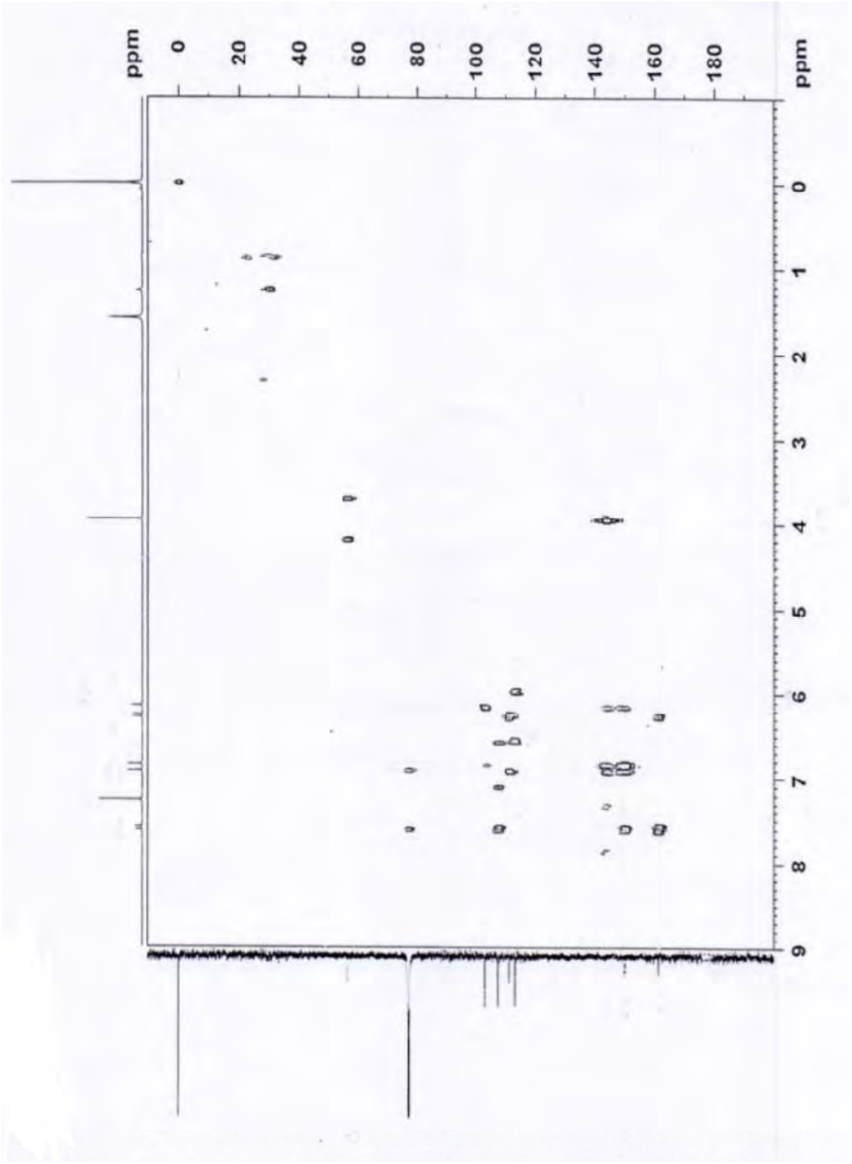
ภาพที่ 10   Dept 90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**



<u>ภาพที่ 11</u>   DEPT 135 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**



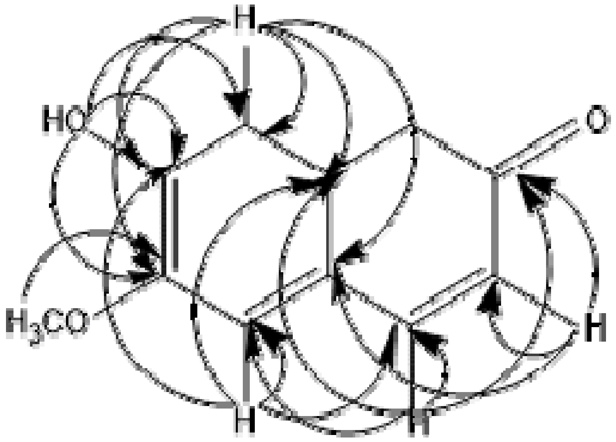
ภาพที่ 12   HSQC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**



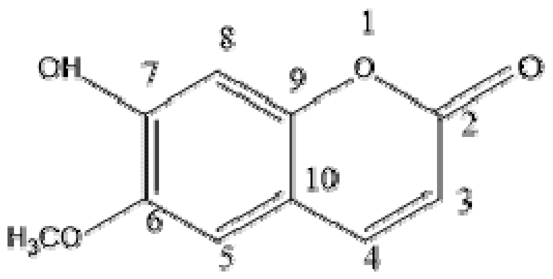
<u>ภาพที่ 13</u> HMBC เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร **EA 1**

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง [1]H-NMR, [13]C- NMR และ HMBC correlation ของสาร **EA1**

Position	δ_H mult. (J Hz)	δ_C	HMBC Correlations
1	-	-	-
2	-	161.42	-
3	6.26 d (9.6 Hz)	113.43	C-2, C-10
4	7.59 d (9.6 HZ)	143.27	C-2, C-5, C-9
5	6.85 s	107.47	C-4, C-7, C-9
6	-	143.98	-
7	-	149.67	-
8	6.92 s	103.19	C-6, C-7, C-9, C-10
9	-	150.26	-
10	-	111.49	-
OH	6.15 s	-	C-6, C-7, C-8
OCH_3	3.95 s	56.40	C-6



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์แบบ HSQC และ HMBC Correlations ของสาร **EA1**



ภาพที่ 15 สูตรโครงสร้างของสาร **EA1** (7-Hydroxy-6-methoxycoumarin หรือ scopoletin)

สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิจัยในขั้นต่อไป

งานวิจัยนี้สามารถคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพส ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบเอทานอลของตะไคร้ เหง้าขมิ้น เมล็ดพริกไทยดำ และผลมะเขือพวง ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งเท่ากับ 77±2%, 75±1%, 76±2% และ 87±9% ตามลำดับ สำหรับส่วนสกัดหยาบน้ำของพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ได้แก่ เหง้ากระชาย ใบทองพันชั่ง ผลพุทราจีน ผลส้มแขก เหง้าข่า ฐานรองดอกกระเจี๊ยบแดง และใบสะระแหน่ ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 71±5%, 76±1%, 77±10%, 77±7%, 88±1%, 91±1% และ 92±2% ตามลำดับ และผู้วิจัยได้เลือกผลมะเขือพวงเพื่อแยกสารยับยั้งไลเพสในขั้นต่อไป พบว่าส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตมีฤทธิ์การยับยั้งไลเพสดีกว่าส่วนสกัดหยาบส่วนอื่นๆ ของผลมะเขือพวง มีค่าการยับยั้งเท่ากับ 67.2±3.6% รองลงมาคือส่วนสกัดหยาบเฮกเซนมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 46.0±6.7% ส่วนสกัดหยาบเมทานอลและน้ำมีฤทธิ์การยับยั้งต่ำ ดั้งนั้นส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและเอทิลแอซิเทตน่าจะมีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไลเพสเป็นองค์ประกอบอยู่ ผลจากการแยกส่วนสกัดหยาบเฮกเซนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟีและทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟีเชิงปริมาณพบสารสเตียรอยด์ 4 ชนิดคือ 17-(1,5-dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1*H*-cyclopenta[α]phenanthren-3-ol, campesterol, *β*-sitosterol และ stigmasterol ในสัดส่วน 1.18**%**, 19.40**%**, 33.14**%** และ 46.29**%** ตามลำดับ โดยสารผสมนี้มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสต่ำ มีค่าเท่ากับ 60.67 ± 0.53**%** ที่ความเข้มข้น 4.00 mg/ml และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 82.56 mg/ml และส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซิเทตที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทรกราฟีพบสารประกอบคูมารินคือ 7-hydroxy-6-methoxycoumarin (scopoletin) มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสต่ำเช่นกัน มีค่าเท่ากับ 60.67 ± 0.53**%** ที่ความเข้มข้น 4.00 mg/ml และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 91.98 mg/ml

องค์ประกอบของผลมะเขือพวงที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ทั้งสาร **Hex 1** และ **EA 1** มีค่าการยับยั้งไลเพสที่ต่ำ แต่ค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งจากการคัดกรองเบื้องต้นมีค่าสูง ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสอยู่ในส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและเอทิลแอซิเทตแฟรกชันอื่นที่ยังไม่ได้ถูกแยก ซึ่งหากทดลองแยกต่อไปในอนาคตอาจพบสารองค์ประกอบที่อาจมีฤทธิ์ยับยั้งไลเพสที่ดี และนอกจากนี้พืชสมุนไพรชนิดอื่นๆ เช่น ตะไคร้ เหง้าขมิ้น เมล็ดพริกไทยดำ เหง้ากระชาย ใบทองพันชั่ง ผลพุทราจีน ผลส้มแขก เหง้าข่า ฐานรองดอกกระเจี๊ยบแดง และใบสะระแหน่ ที่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเพสที่ดีในขั้นตอนการคัดกรองก็เป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจและน่าศึกษาหาองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไลเพสต่อไป

บรรณานุกรม

มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา. โภชนาการและคุณค่าผักพื้นบ้านอาหารต้านโรค ศูนย์พัฒนาตำรา การแพทย์แผนไทย มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา 2548.

เมฆ จันทน์ประยูร. ผักพื้นบ้าน เคล็ดลับของคนอายุยืน 2541.

Barbier P, Schneider F. Syntheses of tetrahydrolipstatin and absolute configuration of tetrahydrolipstatin and lipstatin. *Helv Chim Acta.* 1987; **70**: 196–202.

Delporte C, Backhouse N, Negrete R, Salinas P, Rivas P, Cassels B, et al. Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. *Phytotherapy Research*. 1998; **12**(2): 118-122.

Gargouri Y, Julien R, Sugihara A, Verger R, Sarda L. Inhibition of pancreatic and microbial lipases by proteins. *Biochem Biophys Acta*. 1984; **795**: 326-331.

Hadvay P, Lengsfeld H, Wolfer H. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem J* 1988; **256**: 357-361.

Han LK, Kimura Y, Kawashima M, Takaku T, Taniyama T, Hayashi T, Zheng YN, Okuda H. Antiobesity effects in rodents of dietary tea saponin, a lipase inhibitor. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**: 1459-1464.

Hatano T, Yamashita A, Hashimoto T, Ito H, Kubo N, Yoshiyama M, Shimura S, Itoh Y, Okuda T, Yoshida T. Flavandimmers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*. *Phytochemistry* 1997; **46**: 893-900.

He Q, Lv Y, Yao K. Effects of tea polyphenols on the activities of α-amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chem* 2006; **101**: 1178-1182.

Hochuli E, Kupfer E, Maurer R, Meister W, Mercadal Y, Schmidt K. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. II. Chemistry and structure elucidation. *J Antibiot* 1987; **40**: 1086-1091.

Kang SY, Sung SH, Park JH, Kim YC. Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum Lyratum*. *Archives of pharmacal research*. 1998; **21**(6): 718-722.

Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 2003; **19**: 876-879.

Satouchi K, Hirano K, Fujino O, Ikoma M, Tanaka T, Kitamura K. Lipoxygenase-1 from soybean seed inhibiting the activity of pancreatic lipase. *Biosci Biotecthnol Biochem* 1998; **62**: 1498-1503.

Sharma N, Sharma VK, Seo SY. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *Journal of Ethnopharmacol* 2005; **97**: 453-456.

Shen YH, Li SH, Han QB, Li RT, Sun HD. Coumarins from *Coriaria nepalensis*. *Journal of Asian natural products research*. 2006; **8**(4): 345-350.

Slanc P, Doljak B, Mlinaric A, Strukelj B. Screening of wood damaging fungi and macrofungi for inhibitors of pancreatic lipase. *Phytother Res* 2004; **18**: 758-762.

Tani H, Ohishi H, Watanabe K. Wheat flour lipase inhibitor decrease serum lipid levels in male rats. *J Nutr Vitaminol* 1995; **41**: 699-706.

Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot* 1987; **40**: 1081-1085.

Xu BJ, Han LK, Zheng YN, Lee JH, Sung CK. *In vitro* inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Platycodi radix* on pancreatic lipase. *Arch Pharm Res* 2005; **28**: 180-185.

Zhang BB, Yuan D, Zhi XL. Chemical constituents of *Saussurea eopygmaea*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2011; **9**(1): 33-37.

Zhang HI, Zhang QW, Zhang XG, Ye W, Wang Y. Chemical constituents from the root of Morinda officinalis. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2010; **8**: 192-195.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. จรรยา ชัยเจริญพงศ์

   ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)Chanya Chaicharoenpong, Ph.D.

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 2102 00084 76 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

   สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

   โทรศัพท์ 02-2188073 โทรสาร 02-2533543

   E-mail Chanya.C@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

   พ.ศ. 2546 Ph.D. (Fundamental Science and Technology) Keio University ประเทศญี่ปุ่น

   พ.ศ. 2540 วท. ม. (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   พ.ศ. 2537 วท. บ. (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, การสังเคราะห์สารอินทรีย์

7. ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1) Kijprayoon S., Tolieng V., Petsom A. and Chaicharoenpong C. (2014). Molluscicidal activity of *Camellia oleifera* seed meal. *ScienceAsia*. 40(6), 393-399.

2) Mkhize S., Suzuki N., Kurosawa A., Fujinami M., Chaicharoenpong C. and Ishikawa T. New synthetic procedure for 2-aryl-1,4-naphthoquinone-1-oxime methyl ethers with potent anti-tumor activity. *Synlett*. 2014; 25, 2059-2063.

3) Chanmee W., Chaicharoenpong C. and Petsom A. Lipase inhibitor from fruits of *Solanum stramonifolium* Jacq. *Food and Nutrition Sciences*. 2013; 4, 554-558.

4) Techaprempreecha S., Khongchareonporn N., Chaicharoenpong C., Aranyakananda P., Chunhabundit S. and Petsom A. Nutritional composition of farmed and wild sandworms, *Perinereis nuntia*. *Animal Feed Science and Technology*. 2011; *169*, 265-269.

5) Chaicharoenpong C. and Petsom A. Quantitative thin layer chromatographic analysis of saponins in tea seed meal. *Phytochem Anal*. 2009; *20*, 253-255.

6) Chaicharoenpong C., Kato K. and Umezawa K. Preparation of radioactively labeled dehydroxymethylepoxyquinomicin, an NF-κB function inhibitor. *Drugs Exp Clin Res*. 2003; *29*, 1-3.

7) Chaicharoenpong C., Kato K. and Umezawa K. Synthesis and structure-activity relationship of dehydroxymethylepoxyquinomicin analogues as inhibitors of NF-κB functions. *Bioorg Med Chem* 2002; *10*: 3933-3939.

8) Umezawa K. and Chaicharoenpong C. Molecular design and biological activities of NF-κB inhibitors. *Mol Cells* 2002; *14*: 163-167.

9) Saito Y., Nakamura M., Ohno T., Chaicharoenpong C., Ichikawa E., Yamamura S., Kato K. and Umezawa K. Synthesis of sugar-modified derivatives of the unusual nucleoside oxanosine and its carbocyclic analogs as potential inhibitors of HIV. *J Chem Soc Perk T 1* 2001; 298-304.

10) Saito Y., Nakamura M., Ohno T., Chaicharoenpong C., Ichikawa E., Yamamura S., Kato K. and Umezawa K. Synthesis of oxanosine and carbocyclic oxanosine derivatives as anti-HIV agent. *J Antibiot*. 2000; *53*, 309-13.

11) Saito, Y., Chaicharoenpong, C., Ohno, O., Ichikawa, E., Yamamura, S., Kato, K., Nakamura, M., Ohno, T. and Umezawa, K. Synthesis and anti-HIV activity of unusual nucleoside oxanosine derivatives. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999; *42*, 19-20.