

สารบัญ้งเอนไซม์ไลเปสจากเอื้องผึ้ง

นางสาวเกศกมล จันทรโกคาไพบูลย์
นางสาวธมลวรรณ ตระการรังสี
นายพิชญาตรี ชุนฤทธิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Lipase inhibitors from *Dendrobium lindleyi*

Miss Kaskamol Chanpokapaiboon

Miss Thamonwan Trakranrungsie

Mr. Pichayatri Khoonrit



A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Doctor of Pharmacy Program in Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการปริญญาานิพนธ์	สารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจากเอื้องผึ้ง
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาวเกศกมล จันทร์โกคาไพบุลย์ นางสาวธมลวรรณ ตระการรังสี นายพิชญาตรี ชุนฤทธิ์
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนา ยา / เภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์	รศ. ภก. ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศ. ภก. ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพ็ชร สกุลบำรุงศิลป์)

..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญชู ศรีตุลารักษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์วุฒิ)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำนำ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2560 ซึ่งได้ทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจากเอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi*) โดยมุ่งเน้นให้นิสิตเกิดกระบวนการเรียนรู้ การวางแผนการทำงาน ความรับผิดชอบ ตลอดจนสามารถแก้ไขปัญหาต่างๆ ได้ โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ควรให้คำแนะนำและความช่วยเหลืออยู่ตลอด ซึ่งทางคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้จะได้ประโยชน์สำหรับผู้สนใจดำเนินงานวิจัย และเป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาวิชาชีพเภสัชกรรมต่อไปในอนาคต

หากโครงการปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำโครงการขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย



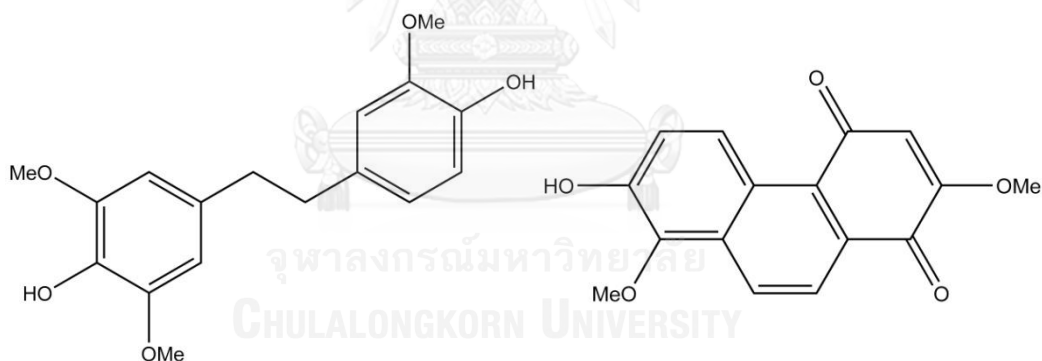
คณะผู้จัดทำ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทคัดย่อภาษาไทย

จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบด้วย methanol ของเอื้องผึ้งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสมากกว่าร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดแยกสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีจาก *Dendrobium lindleyi* หรือเอื้องผึ้ง และพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจะใช้วิธี bioassay guided fractionation ในการคัดกรองฤทธิ์ในแต่ละขั้นของการแยกสกัด ส่วนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จะใช้วิธี column chromatography ผ่าน silica gel column และ Sephadex LH-20 column อีกทั้งยังใช้วิธี thin layer chromatography มาช่วยในการหา solvent system ที่เหมาะสมในการสกัดและช่วยทำนายแนวโน้มการสกัดได้ จากนั้นนำสารที่ได้ไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี lipase inhibitory assay โดยผลการวิจัยพบว่าสามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด และเมื่อนำสารดังกล่าวไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี พบว่าเป็นสาร moscatilin (1) และ cyripedin (2) ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสพบว่าสาร moscatilin ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ส่วนสาร cyripedin สามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 320.34 ไมโครโมลาร์ จากผลงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า cyripedin เป็นสารสำคัญที่พบในเอื้องผึ้งที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส



moscatilin (1)

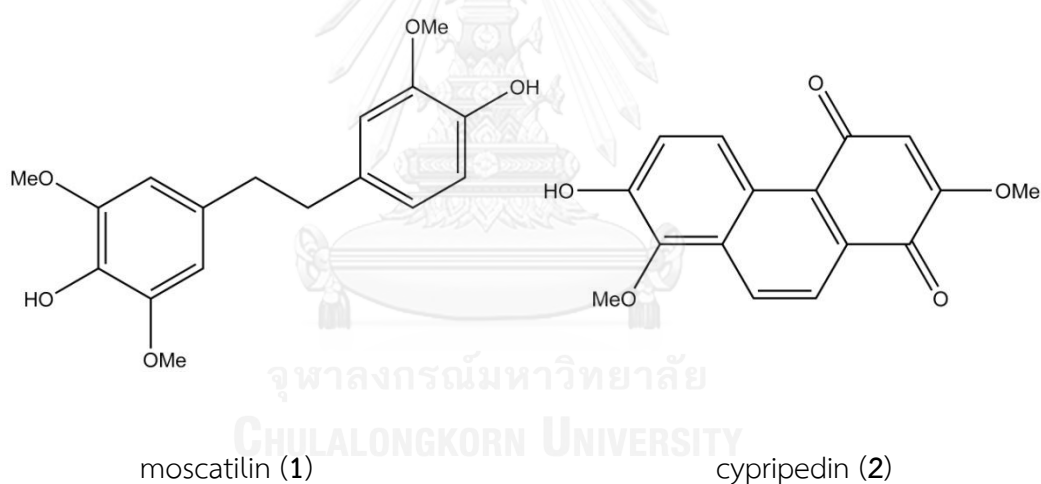
cyripedin (2)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

In a preliminary study, the methanol extract of *Dendrobium lindleyi* showed more than 80% anti-lipase activity at the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$. The aim of this project was to isolate and identify the constituents responsible for the anti-lipase activity from *D. lindleyi*. In a bioassay-guided fractionation, we were able to isolate the active compounds using a combination of chromatographic techniques, including column chromatography (silica gel and Sephadex LH-20) and thin layer chromatography (silica gel). Through NMR spectroscopic studies, the compounds were characterized as moscatilin (1) and cyripedin (2). The two isolates were then evaluated for their lipase inhibitory activities. Only cyripedin showed lipase inhibitory activities with IC_{50} values of 320.34 μM .



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทฉบับนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ การสนับสนุนจาก ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์และศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิจัย รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญชู ศรีตุลาภักษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้ รวมถึงนิสิตระดับมหาบัณฑิตและ คุชฌีบัณฑิตที่คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ที่กรุณาให้ความสะดวกในการทำโครงการนี้



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทฉบับนี้ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทฉบับนี้ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ง
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญรูปภาพ	ญ
สารบัญตาราง	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โรคอ้วนและยารักษาโรคอ้วน	3
2.2 เอนไซม์ไลเปสและสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (lipase and lipase inhibitor)	4
2.2.1 เอนไซม์ไลเปส (lipase)	4
2.2.2 สารยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (lipase inhibitor)	5
2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารยับยั้งไลเปสในกล้วยไม้สกุล <i>Dendrobium</i>	6
2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส	7
2.4 พืชที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย	7
3 วิธีดำเนินการวิจัย	9
3.1 พืชสมุนไพร อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ	9
3.2 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบ	11
3.3 การสกัดสารบริสุทธิ์	12
3.4 การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy	13
3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส	13
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	20
4.1 การสกัดสารบริสุทธิ์	20

บทคัดย่อและบทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส	23
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	25
รายการอ้างอิง	27
ภาคผนวก	30



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การส่งสัญญาณของ appetite-regulating hormone, neuropeptide และ neurotransmitter และยาที่ออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ pathway	4
รูปที่ 2 กลไกการย่อยและดูดซึมไขมันจากอาหาร	5
รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ (a) 4-MUO และ (b) 4-MU	7
รูปที่ 4 เอื้องผึ้ง (<i>Dendrobium lindleyi</i>)	8
รูปที่ 5 แผนภาพการสกัดสารจากเอื้องผึ้ง	11
รูปที่ 6 รูปแบบการทดสอบการละลายใน microtiter plate ที่ 1	15
รูปที่ 7 รูปแบบการทดสอบการละลายใน microtiter plate ที่ 2	16
รูปที่ 8 รูปแบบการทดสอบการละลายใน microtiter plate ที่ 3	17
รูปที่ 9 รูปแบบการทดสอบการละลายใน microtiter plate ที่ 4	19
รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ (1) compound 1 และ (2) compound 2	20
รูปที่ 11 กราฟแสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (% inhibition) ของ cypripedin	24
รูปที่ 12 ¹ H NMR spectrum ของ compound 1 (cypripedin)	30
รูปที่ 13 ¹³ C NMR spectrum ของ compound 1 (cypripedin)	31
รูปที่ 14 NOESY spectrum ของ compound 1 (cypripedin)	32
รูปที่ 15 NOESY spectrum ของ compound 1 (cypripedin)	33
รูปที่ 16 HSQC spectrum ของ compound 1 (cypripedin)	34
รูปที่ 17 HMBC spectrum ของ compound 1 (cypripedin)	35
รูปที่ 18 HMBC spectrum ของ compound 1 (cypripedin)	36
รูปที่ 19 mass spectrum ของ compound 1 (cypripedin)	37
รูปที่ 20 ¹ H NMR spectrum ของ compound 2 (moscatilin)	38
รูปที่ 21 ¹³ C NMR spectrum ของ compound 2 (moscatilin)	39

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารจากธรรมชาติ	6
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ของ compound 1 ใน acetone- d_6	21
ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ของ compound 2 ใน acetone- d_6	22
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส	23



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคอ้วนถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก เกิดจากความผิดปกติในการเผาผลาญสารอาหาร (metabolic disease) ทำให้มีการเพิ่มการสะสมของไขมันในร่างกาย โรคอ้วนจะส่งผลเสียต่อร่างกายทั้งระบบต่อมไร้ท่อ ระบบหัวใจและหลอดเลือด และการเกิดมะเร็งตามมา ผู้ป่วยโรคอ้วนมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละปี ยาที่ใช้รักษาโรคอ้วนมีทั้งออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการลดความอยากอาหารหรือทำให้อิ่ม ได้แก่ lorcaserin, phentermine/topiramate extended release, bupropion/naltrexone และ liraglutide และยาที่ไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ orlistat ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (lipase) ทั้งจากตับอ่อนและกระเพาะอาหาร ทำให้ไม่เกิดการย่อยไขมันส่งผลให้การดูดซึมไขมันจากอาหารเข้าสู่ร่างกายลดลง

orlistat ได้ขึ้นทะเบียนเป็นยารักษาโรคอ้วนตั้งแต่ปี 1999 โดยเป็นยาที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายน้อยมากและมีผลข้างเคียงไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง orlistat ยังเป็นยารักษาโรคอ้วนเพียงชนิดเดียวที่อนุญาตให้จำหน่ายในร้านยาได้ แต่เมื่อปี 2010 the United State food and drug administration (USFDA) ได้เพิ่มข้อมูลบนฉลากยาว่ามีความเป็นไปได้ที่ orlistat จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิด severe liver injury [1] ปัจจุบันมีงานวิจัยหลากหลายที่พยายามค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสชนิดใหม่ โดยหวังว่าจะนำไปพัฒนาเป็นยาที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยมากขึ้น

งานวิจัยหลายฉบับค้นพบสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจากธรรมชาติ [2] เช่น ในปี 2007 Li และคณะพบว่าใบของ *Acanthopanax sessiliflorus* มีสาร sessiloside และ chiisanoside ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ส่วนในปี 2010 Matsumoto และคณะพบว่า fucoxanthin ที่ได้จากสาหร่าย *Undaria pinnatifida* และ *Sargassum fulvellum* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสในหนู และสามารถลดการดูดซึมของ triglyceride และควบคุมการเพิ่มปริมาณ triglyceride ในระบบไหลเวียนเลือดได้ หรือในปี 2013 Kumar และ Alagawadi พบว่า galangin สารในกลุ่ม flavonol ที่ได้จากเหง้าของ *Alpinia galanga* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส เป็นต้น

พืชในสกุล *Dendrobium* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Orchidaceae ก็เป็นอีกหนึ่งเป้าหมายในการค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปส จากงานวิจัยที่ศึกษาสารเคมีในพืชสกุล *Dendrobium* [3] พบว่ามีสารในกลุ่ม bibenzyls และงานวิจัยที่ศึกษาใน *Dioscorea opposita* (พืชในสกุลกลอย) ก็พบว่ามีสารในกลุ่ม bibenzyls เช่นเดียวกัน ซึ่งสารที่พบมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส [4] นอกจากนี้ในปี 2017 Inthongkaew และคณะ [5] ได้รายงานผลการศึกษาศาสตร์จากเอื้องเงินหลวง (*Dendrobium formosum*) ซึ่งพบว่า

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

confusarin และ 5-methoxy-7-hydroxy-9,10- dihydro-1,4- phenanthrenequinone มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

"เอื้องผึ้ง" เป็นหนึ่งในพืชสกุล *Dendrobium* มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Dendrobium lindleyi* Steud. ซึ่งพบว่ายังไม่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ประกอบกับการคัดกรองฤทธิ์สารสกัดจากเอื้องผึ้ง เมื่อนำสารสกัดหยาบ methanol ของเอื้องผึ้งมาทดสอบฤทธิ์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส และ 4-methylumbelliferyl oleate (4-MUO) เป็น substrate พบว่าสารสกัดหยาบ methanol สามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจากเอื้องผึ้ง ซึ่งการศึกษานี้มีความสำคัญในการพัฒนาการรักษาโรคอ้วนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ทั้งจากตับอ่อนและกระเพาะอาหาร และอาจสามารถพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อเป็นทางเลือกให้ผู้ป่วยต่อไป

การศึกษานี้ใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟีในการสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์ และใช้เทคนิค NMR spectroscopy ในการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้เทียบกับข้อมูลอ้างอิงที่เคยมีการรายงานมาก่อนแล้ว นอกจากนี้ยังนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสและ 4-MUO ในการทดสอบ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อสกัดสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจากเอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi*)
2. เพื่อศึกษาและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีจากสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลเบื้องต้นของพืชสกุล *Dendrobium* เกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส
2. ทราบข้อมูลของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคอ้วนและยารักษาโรคอ้วน

โรคอ้วนเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติในการเผาผลาญสารอาหาร (metabolic disease) ทำให้มีการเพิ่มการสะสมของไขมันในร่างกาย เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น พันธุกรรม [6] สิ่งแวดล้อม โรคอื่นๆ [7] ยา [8] เป็นต้น โรคอ้วนจะส่งผลเสียต่อร่างกายทั้งระบบต่อมไร้ท่อ ระบบหัวใจและหลอดเลือด และการเกิดมะเร็งตามมา การมีไขมันที่ท้องส่งผลต่อการเกิดภาวะต้านอินซูลินโดยการลดความไวของฮอร์โมนอินซูลินทำให้มีผลต่อทั้งการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ การเผาผลาญไขมัน และการควบคุมการผลิตกลูโคสจากตับ ภาวะต้านอินซูลินนี้จะทำให้มีระดับอินซูลินในเลือดเพิ่มมากขึ้นและไปเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นโรคต่างๆ ได้

ในช่วงปี 1980 โรคอ้วน (obesity) เริ่มเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย ประชากรในเกือบทุกประเทศทั่วโลกต้องประสบกับปัญหาภาวะน้ำหนักเกินหรือโรคอ้วนเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งในปี 1997 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้จัดโรคอ้วนเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ในปี 2013 พบว่าประชากร 1 ใน 3 ของโลกมีภาวะน้ำหนักเกินหรืออ้วน ในปี 2010 การมีภาวะน้ำหนักเกินและมีภาวะโรคอ้วน เป็นสาเหตุการตาย 3.4 ล้านคน [9] โดยความชุกของโรคอ้วนในประเทศไทยพบว่าเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ข้อมูลจากโครงการสำรวจสุขภาพประชาชนไทย โดยการตรวจร่างกายและสัมภาษณ์ (National Health examination surveys; NHES) แสดงความชุกของโรคอ้วนในผู้ใหญ่ โดยใช้ค่าดัชนีมวลกาย (BMI) มากกว่าหรือเท่ากับ 25 kg/m^2 เป็นเกณฑ์ในการตัดสิน พบว่าในปี 1991 1997 และ 2004 ความชุก ของโรคอ้วนในผู้ชายเป็นร้อยละ 13.0 18.6 และ 22.4 ตามลำดับ ส่วนความชุกของโรคอ้วนในผู้หญิงเป็น ร้อยละ 23.2 29.5 และ 34.3 ตามลำดับ [9]

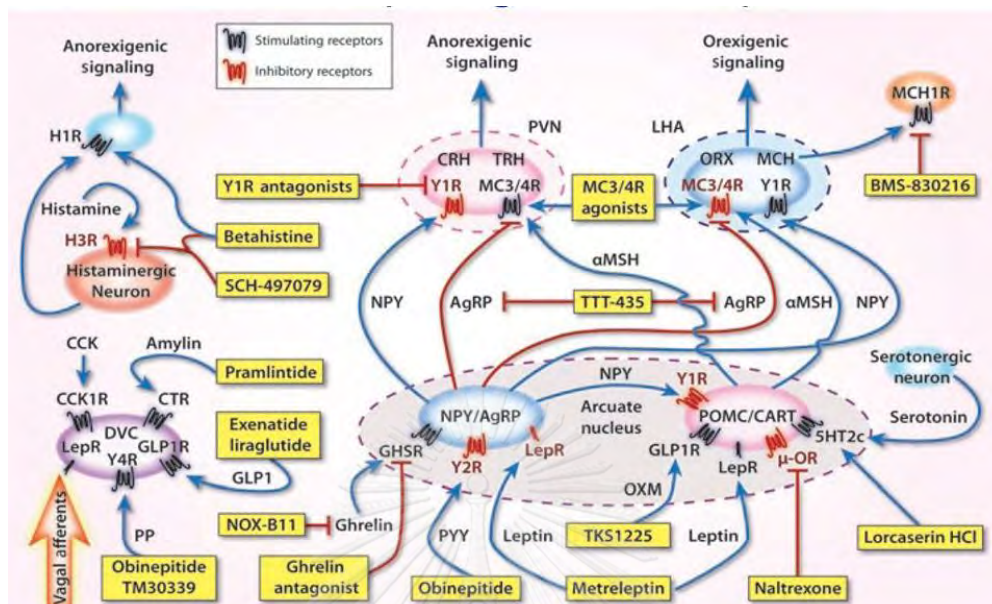
ปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคอ้วน แบ่งออกเป็นยาที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางและยาที่ไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยยาที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางแสดงดังรูปที่ 1 ได้แก่ 1) lorcaserin [10] มีกลไกการออกฤทธิ์เป็น selective 5-HT_{2C} receptor agonist ซึ่ง receptor นี้ อยู่บน pro-opiomelanocortin neuron ของสมองส่วน hypothalamus ทำให้เกิดความอึด 2) phentermine/topiramate extended release (ER) [11,12] โดย phentermine ทำให้มีการเพิ่มปริมาณสารสื่อประสาทอีพิเนฟริน (norepinephrine; NE) และ โดปามีน (dopamine; DA) ในสมองส่วน hypothalamus ทำให้ความอยากอาหารลดลง 3) bupropion/naltrexone [13] ซึ่ง bupropion ทำให้โดปามีนและนอร์อีพิเนฟรินเพิ่มขึ้น โดยยับยั้งการดูดกลับ และ 4) liraglutide [14] ออกฤทธิ์จับกับ GLP1R ซึ่งอยู่บน pro-opiomelanocortin neuron ของ hypothalamus ทำให้เกิดความอึด ส่วนยาที่ไม่ได้ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ orlistat [15] โดยทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจาก

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตัวยับยั้งและกระเพาะอาหาร ทำให้ไม่เกิด triglyceride hydrolysis จึงเป็นการลดการดูดซึมไขมันจากอาหาร



รูปที่ 1 การส่งสัญญาณของ appetite-regulating hormone, neuropeptide และ neurotransmitter และยาที่ออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ pathway [16]

2.2 เอนไซม์ไลเปสและสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (lipase and lipase inhibitor)

2.2.1 เอนไซม์ไลเปส (lipase)

เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมและการย่อยไขมัน ซึ่งในร่างกายมนุษย์ เอนไซม์ไลเปสถูกสร้างขึ้นจากหลายอวัยวะ โดยเอนไซม์หลักคือเอนไซม์ไลเปสที่มาจากตับอ่อน (pancreatic lipase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในน้ำย่อยจากตับอ่อน (pancreatic juice) ทำหน้าที่ย่อย triglyceride จากอาหาร ภายในลำไส้เล็ก [2] ซึ่งมีกลไกการย่อยไขมันเป็นดังรูปที่ 2 เริ่มตั้งแต่เอนไซม์ไลเปสที่มาจากกระเพาะอาหาร (gastric lipase) และ เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในน้ำลาย (lingual lipase) ย่อย triglyceride บางส่วนให้เป็น free fatty acids และ diacylglycerol ต่อมาไขมันที่ได้จะเกิด emulsification กับน้ำดี (bile salts) กลายเป็นหยดไขมันเล็กๆ ซึ่งเป็นโครงสร้าง emulsion ที่ซับซ้อน ประกอบด้วย triglycerides และ diglycerides ที่อยู่ตรงกลาง ถัดมาจะมี polar lipids, phospholipids, cholesterol, และ free fatty acids และรอบนอกจะมี oligosaccharides, denatured proteins และ bile salts ต่อมา pancreatic lipase ที่หลังจาก pancreatic acinar cell จะเข้าทำปฏิกิริยากับหยด emulsion นี้จนได้เป็น micelle ที่ประกอบด้วย free fatty acids,

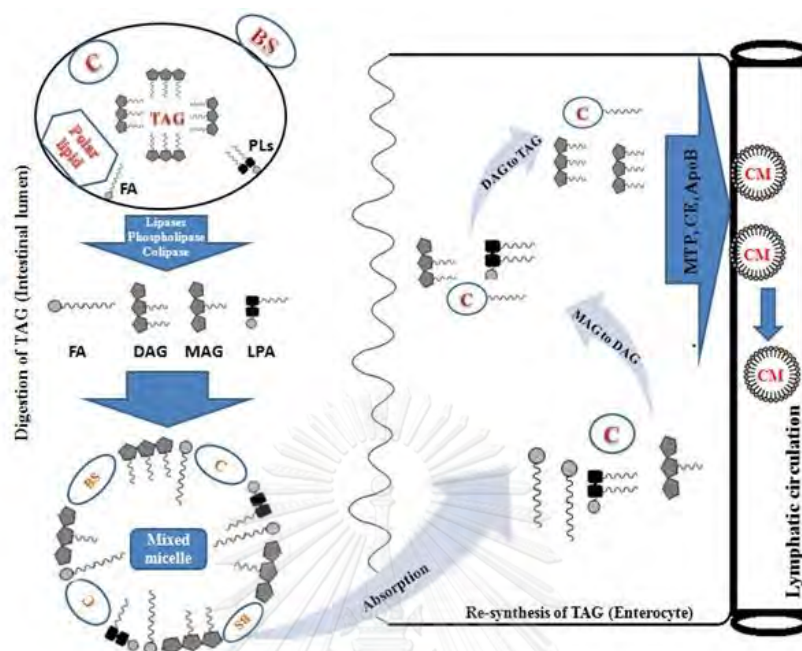
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

monoacylglycerols, diacylglycerols binds with cholesterol, bile salts, fat soluble vitamins และ lysophosphatidic acid ซึ่ง micelle นี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดย enterocyte [2]



รูปที่ 2 กลไกการย่อยและดูดซึมไขมันจากอาหาร [2]

2.2.2 สารยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (lipase inhibitor)

สารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสที่ถูกค้นพบครั้งแรกคือ lipstatin ซึ่งได้มาจากแบคทีเรีย *Streptomyces toxytricini* ต่อมาได้พัฒนาเป็น tetrahydrolipstatin หรือที่รู้จักกันในชื่อ orlistat ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีที่คงตัวมากขึ้น [17] ด้วยคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ดังนั้น orlistat จึงถูกวิจัยและพัฒนาเพื่อรักษาผู้ป่วย dyslipidemia ต่อมาภายหลังมีการศึกษาจนมีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคอ้วน เนื่องจากสามารถลดน้ำหนักผู้ป่วยโรคอ้วนได้ [18] ซึ่งเป็นเหตุจากการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ทำให้ triglyceride ถูกย่อยได้น้อยลง ไขมันจึงถูกดูดซึมได้น้อยลง

งานวิจัยหลายฉบับพยายามศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส [2] ซึ่งส่วนมากจะเริ่มค้นหาสารจากธรรมชาติโดยเฉพาะพืช สารจากธรรมชาติที่มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ได้แก่สารในกลุ่ม alkaloids, carotenoid, glycosides, polyphenols, polysaccharides, saponins และ terpenoids ดังแสดงตัวอย่างสารจากกลุ่มต่างๆ ในตารางที่ 1

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารจากธรรมชาติ [2]

กลุ่มสาร	ตัวอย่างงานวิจัย
Alkaloids	ในปี 2012 Wikiera และคณะพบว่า caffeine, theophylline และ theobromine สามารถยับยั้งการไฮโดรไลซิสของ tributyrin และ tripalmitate ซึ่งถูกเร่งโดย human pancreatic lipase
Carotenoids	ในปี 2010 Matsumoto และคณะพบว่า fucoxanthin ที่ได้จากสาหร่าย เช่น <i>Undaria pinnatifida</i> และ <i>Sargassum fulvellum</i> มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ในหนู และสามารถลดการดูดซึมของ lymphatic triglyceride และควบคุมการเพิ่มของความเข้มข้น triglyceride ในระบบไหลเวียนเลือดได้
Glycosides	ในปี 2013 Habtemariam และคณะพบว่า Kaempferol 3-O-rutinoside ที่ได้จาก <i>Cassia auriculata</i> ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรในทวีปเอเชีย นั้น มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสที่ดี นอกจากนี้ยังพบสารนี้ได้จาก <i>Ginkgo biloba</i> และพืชในสกุล <i>Ficus</i>
Polyphenols	ในปี 2013 Kumar และ Alagawadi พบว่า galangin สารในกลุ่ม flavonol ที่ได้จากเหง้าของ <i>Alpinia galanga</i> มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส นอกจากนี้ในปี 2006 Ono และคณะพบว่าใบของ <i>Nelumbo nucifera</i> ที่นำมาใช้เพื่อลดความอ้วนในประเทศจีนก็มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
Polysaccharides	ในปี 2006 Sumiyoshi และ Kimura พบว่า Chitosan จากเปลือกกุ้งและสัตว์จำพวก crustacean มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส
Saponins	ในปี 2007 Li และคณะพบว่าใบของ <i>Acanthopanax sessiliflorus</i> มีสาร sasiloside และ chiisanoside ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส
Terpenes	ในปี 2005 Lee และคณะพบว่าการสกัด <i>Gasdenia jasminoides</i> โดยใช้ น้ำ ทำให้ได้สาร crocin และ crocetin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารยับยั้งไลเปสในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium*

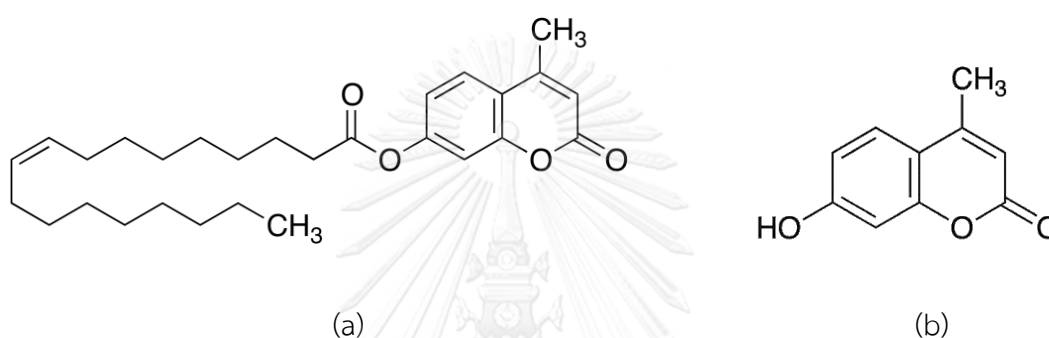
ในปี 2015 Lam และคณะ [3] ได้ตีพิมพ์บทความปริทัศน์ซึ่งรายงานกลุ่มสารที่พบในพืชสกุล *Dendrobium* ทั้ง 42 ชนิด พบว่ามีสารในกลุ่ม alkaloids 32 ชนิด coumarins 6 ชนิด bibenzyls 15 ชนิด fluorenones 4 ชนิด phenanthrenes 22 ชนิด และ sesquiterpenoids 7 ชนิด และจากการศึกษาของ Min Hye Yang และคณะ [4] ในปี 2013 แสดงให้เห็นว่าสารในกลุ่ม bibenzyls ที่ผู้วิจัยสกัดได้จาก *Dioscorea opposita* (พืชในสกุลถอย) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ซึ่งสารในกลุ่ม bibenzyls นี้เป็นสารกลุ่มหลักที่สามารถพบได้ในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* เช่นกัน นอกจากนี้ในปี 2017 Inthongkaew และคณะ [5] ได้รายงานผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส จากพืชสกุล *Dendrobium* โดยพบว่าสาร confusarin และ 5-methoxy-7-hydroxy-9,10-dihydro-1,4-phenanthrenequinone จากเอื้องเงินหลวง (*Dendrobium formosum*) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

4-methylumbelliferyl oleate (4-MUO) เป็นสารที่ไม่มีคุณสมบัติเรืองแสง (nonfluorescent) แต่เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับเอนไซม์ไลเปสแล้วจะให้สาร 4-methylumbelliferone (4-MU) ซึ่งมีคุณสมบัติเรืองแสง (fluorescent) [19] แสดงโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 3 โดยมีความยาวคลื่น excitation ที่ 355 นาโนเมตร และความยาวคลื่น emission ที่ 460 นาโนเมตร หลักการทดสอบคือเมื่อ 4-MUO ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปสจนเป็น 4-MU จะสามารถตรวจพบ fluorescence ได้ โดยใช้ microplate reader แต่หากสารที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปส จะทำให้ตรวจพบ fluorescence ได้น้อยลง และสามารถคำนวณออกมาเป็น % inhibition ได้



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ (a) 4-MUO และ (b) 4-MU

2.4 พืชที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

ชื่อไทย : เอื้องผึ้ง

ชื่อทางวิทยาศาสตร์: *Dendrobium lindleyi*

วงศ์ : Orchidaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : กล้วยไม้อิงอาศัย สูง 6 - 10 เซนติเมตร ลำลูกกล้วยรูปรี เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 - 3 เซนติเมตร ใบรูปรีแกมขอบขนาน กว้าง 3 เซนติเมตร ยาว 8 - 10 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อตามข้อ ห้อยลง ก้านช่อยาว 15 - 25 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีเหลืองเข้ม กลีบปากแผ่กว้าง รูปรีแกมกลม มีแต้มสีส้มที่โคนกลีบและมีขนนุ่ม ดอกบานเต็มที่กว้าง 3 เซนติเมตร มีกลิ่นหอม [20]

ฤดูออกดอก : เดือนกุมภาพันธ์ - เดือนเมษายน [20]

แหล่งที่พบในประเทศไทย : พบทั่วประเทศตามป่าผลัดใบ ป่าดิบ ที่ระดับความสูง 300 - 1,500 เมตร [20]

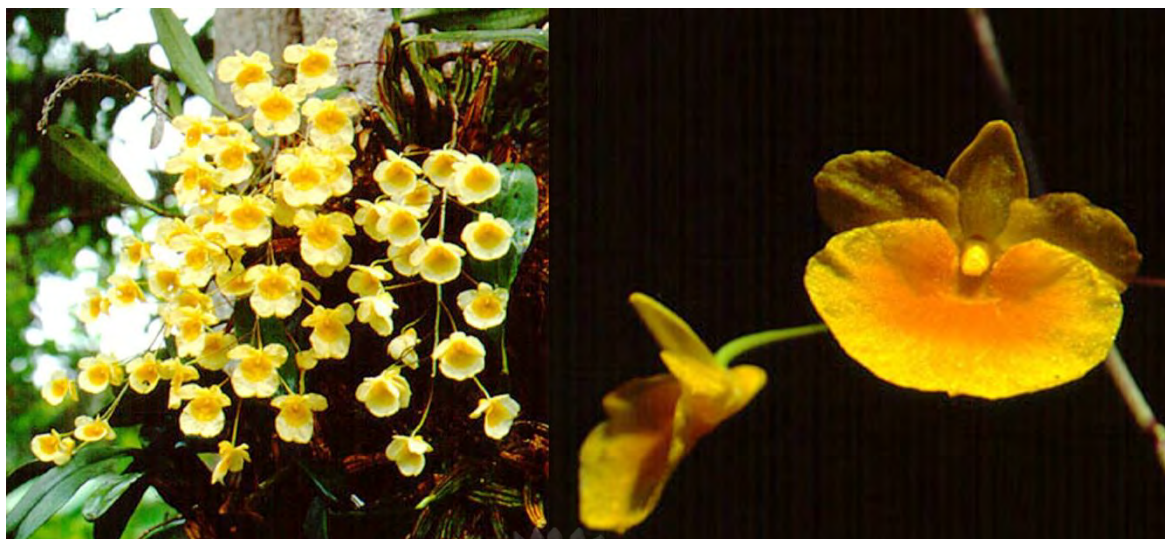
การกระจายพันธุ์ : อินเดีย จีนตอนใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ [20]

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 4 เอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi*) [20]



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชสมุนไพร อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

พืชสมุนไพร

เอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi*) (น้ำหนักแห้ง 1.1 กิโลกรัม)

อุปกรณ์

1. round bottom flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
2. erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร
3. cylinder ขนาด 10 มิลลิลิตร 100 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร
4. beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร 250 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร
5. sintered glass funnel เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นิ้ว
6. glass column เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว และ 2 นิ้ว
7. stainless steel tank
8. separatory funnel ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
9. thin Layer Chromatography tank
10. silica gel 60 F254 บนแผ่น aluminium สำหรับ TLC; Merck®
11. capillary tubes
12. forceps
13. กระจกทรง
14. สำลี
15. ขวดรับ fraction ขนาด 100 มิลลิลิตร
16. aluminium foil
17. pasteur pipette
18. ช้อนเขา
19. 96-well microtiter plate
20. micropipette tip ขนาด 100 ไมโครลิตร 200 ไมโครลิตร และ 1,000 ไมโครลิตร
21. eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารเคมี

1. methanol
2. butanol
3. ethyl acetate
4. น้ำ
5. hexane
6. acetone
7. silica gel ขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร
8. silica gel ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร
9. Sephadex LH 20
10. acetone- d_6
11. dimethyl sulfoxide (DMSO)
12. 4-methylumbelliferyl oleate (4-MUO)
13. orlistat
14. lipase
15. Tris-HCl
16. NaCl
17. $CaCl_2$
18. sodium citrate

เครื่องมือ

1. tray and truck dryer
 2. grinder
 3. เครื่องชั่งไฟฟ้า ยี่ห้อ Mettler[®] รุ่น AG135
 4. rotary evaporator (Buchi rotavapor R-114)
 5. asparator (vacuum pump: Buchi B-169)
 6. เครื่องกลั่นสารเคมี
 7. เครื่องฉายแสง UV
 8. NMR spectrometer
 9. fluorescent lamp
 10. micropipette 2-20 ไมโครลิตร, 20-100 ไมโครลิตร และ 100-1,000 ไมโครลิตร
 11. microplate reader ยี่ห้อ Victor3[®] รุ่น wallac1420
- เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

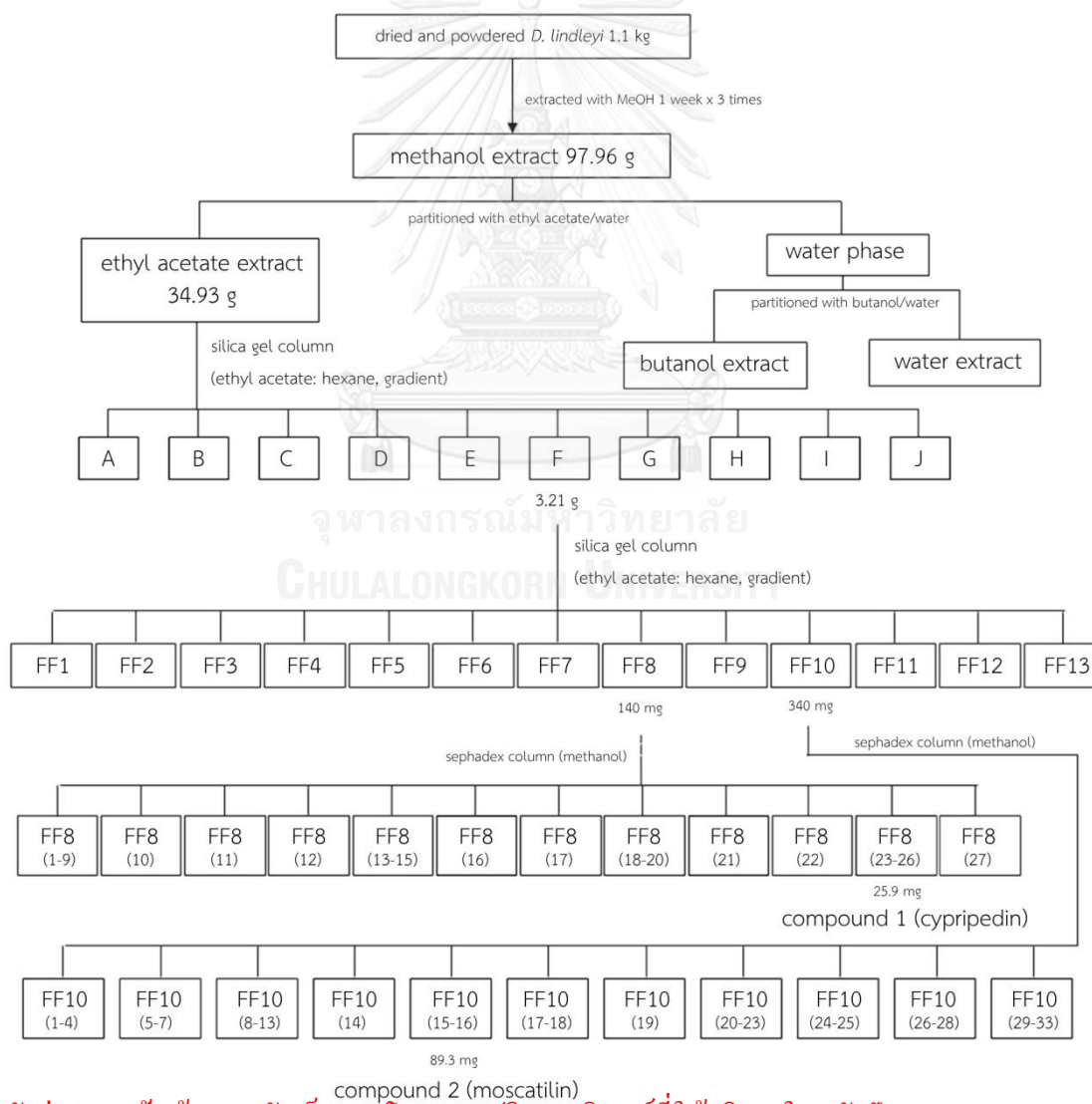
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

12. Vortex® shaker

13. pH meter

3.2 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบ

นำเอื้องผึ้งที่ผ่านการล้างให้สะอาดแล้วไปอบแห้งด้วย tray and truck dryer แล้วนำไปบดหยาบ ได้น้ำหนักแห้ง 1.1 กิโลกรัม จากนั้นนำไปแช่สกัดใน aluminium tank โดยใช้ methanol จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1 สัปดาห์ นำสิ่งสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้เป็นสิ่งสกัดหยาบน้ำหนัก 97.96 กรัม จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธี partition โดยใช้ ethyl acetate และน้ำ แล้วสกัดด้วยวิธี partition อีกครั้งหนึ่งด้วย น้ำและ butanol จะได้สิ่งสกัดหยาบ 3 ส่วนคือ ethyl acetate extract (34.93 กรัม) butanol extract และ water extract ดังรูปที่ 5



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) รูปที่ 5 แผนภาพการสกัดสารจากเอื้องผึ้ง เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.3 การสกัดสารบริสุทธิ์

นำสิ่งสกัดหยาบ ethyl acetate 34.93 กรัม ไปสกัดด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 นิ้ว ใช้ silica gel ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) บรรจุ silica gel สูง 15 เซนติเมตร ใช้ ethyl acetate และ hexane เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเริ่มจากการใช้ hexane 100% แล้วค่อยๆ เพิ่มสัดส่วนของ ethyl acetate ขึ้นทีละน้อยจนเป็น ethyl acetate 100% จากนั้นใช้ methanol 100% โดยเก็บสารจาก column ครั้งละประมาณ 300 มิลลิลิตร ได้เป็น 27 fraction โดยแต่ละ fraction นำไปประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วนำแต่ละ fraction ที่แห้งแล้วไปทำการทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane โดย fraction 1-10 ใช้ตัวทำละลายในสัดส่วน ethyl acetate: hexane 1: 9 fraction 11-17 ใช้ตัวทำละลายในสัดส่วน 4: 6 และ fraction 18-27 ใช้ตัวทำละลายในสัดส่วน 9: 1 จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ TLC band ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 10 fraction นั่นคือ fraction A-J

นำ fraction F ซึ่งมีน้ำหนัก 3.21 กรัม มาแยกสารด้วยวิธี column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 นิ้ว ใช้ silica gel ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร เป็น stationary phase บรรจุ silica gel สูง 15 เซนติเมตร ใช้ ethyl acetate และ hexane เป็น mobile phase โดยเริ่มจากการใช้ hexane 100% แล้วค่อยๆ เพิ่มสัดส่วนของ ethyl acetate ขึ้นทีละน้อยจนเป็น ethyl acetate 100% จากนั้นใช้ methanol 100% โดยเก็บสารจาก column ครั้งละประมาณ 300 มิลลิลิตร ได้เป็น 29 fraction โดยแต่ละ fraction นำไปประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายด้วย rotary evaporator แล้วนำแต่ละ fraction ที่แห้งแล้วไปทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane ในสัดส่วน ethyl acetate: hexane 3: 7 จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ TLC band เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 12 fraction นั่นคือ FF1-FF12

นำ fraction FF8 น้ำหนัก 140 มิลลิกรัม มาแยกสารด้วยวิธี column chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว ใช้ sephadex LH 20 เป็น stationary phase และใช้ methanol เป็น mobile phase เก็บสารจาก column ครั้งละประมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บ fraction ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้เป็น 27 fraction โดยแต่ละ fraction นำไปประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายด้วย rotary evaporator แล้วนำแต่ละ fraction ที่แห้งแล้วไปทำการทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมระหว่าง ethyl acetate และ hexane ในสัดส่วน ethyl acetate: hexane 3: 7 จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ TLC band เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 12 fraction นั่นคือ FF8(1-9), FF8(10), FF8(11), FF8(12), FF8(13-15), FF8(16), FF8(17), FF8(18-20), FF8(21), FF8(22), FF8(23-26), FF8(27) แล้วสังเกตลักษณะ TLC band ของแต่ละ fraction เพื่อเลือก fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียว ซึ่งหมายถึงค่า R_f fraction นั้นอาจเป็นสารบริสุทธิ์ โดยบันทึกชื่อและเพิ่มข้อมูลเบื้องต้นของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียว นั่นคือ FF8(23-26) น้ำหนัก 25.9 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็น compound 1 ซึ่งจะนำไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy ต่อไป

นำ fraction FF10 ซึ่งมีน้ำหนัก 340 มิลลิกรัม มาแยกสารด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว มี sephadex LH 20 เป็น stationary phase และใช้ methanol เป็น mobile phase โดยเก็บสารจาก column ครั้งละประมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บ fraction ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้จำนวน 33 fraction โดยแต่ละ fraction นำไปประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายด้วย rotary evaporator แล้วนำแต่ละ fraction ที่แห้งแล้วไปทำการทดสอบด้วยวิธี thin layer chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมของ ethyl acetate และ hexane ในสัดส่วน ethyl acetate: hexane 3: 7 จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ TLC band เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 11 fraction นั่นคือ FF10(1-4), FF10(5-7), FF10(8-13), FF10(14), FF10(15-16), FF10(17-18), FF10(19), FF10(20-23), FF10(24-25), FF10(26-28), FF10(29-33) แล้วสังเกตลักษณะ TLC band ของแต่ละ fraction เพื่อเลือก fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียว ซึ่งหมายความว่า fraction นั้นอาจเป็นสารที่บริสุทธิ์ โดย fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียว นั่นคือ FF10(15-16) น้ำหนัก 89.3 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็น compound 2 ซึ่งจะนำไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy ต่อไป

3.4 การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี NMR spectroscopy

แบ่ง compound 1 มาเล็กน้อยแล้วนำไปละลายใน acetone- d_6 สำหรับวิเคราะห์ผลด้วยวิธี NMR spectroscopy ในรูปแบบ ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC NMR, HMBC NMR และ NOESY และ mass spectrometry แล้วนำ spectrum ที่ได้มาวิเคราะห์หาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าว และนำไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับสารที่เคยมีการรายงานในงานวิจัย

แบ่ง compound 2 มาเล็กน้อยแล้วนำไปละลายใน acetone- d_6 สำหรับวิเคราะห์ผลด้วยวิธี NMR spectroscopy ในรูปแบบ ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC NMR, HMBC NMR และ NOESY แล้วนำ spectrum ที่ได้มาวิเคราะห์หาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าว และนำไปตรวจสอบเปรียบเทียบกับสารที่เคยมีการรายงานในงานวิจัย

3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

ชั่งน้ำหนัก ethyl acetate extract, fraction F, orlistat (positive control) และ compound 2 อย่างละ 1 มิลลิกรัม ใส่ลงใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งน้ำหนัก compound 1 น้ำหนัก 1 มิลลิกรัม ใส่ลงใน **บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)**

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ependorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียม buffer solution ซึ่งมีส่วนประกอบคือ Tris-HCl 204.93 มิลลิกรัม NaCl 876.64 มิลลิกรัม และ CaCl_2 14.42 มิลลิกรัม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8

เตรียม 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร lipase solution in buffer 0.1 M sodium citrate โดยการเตรียม buffer ที่มีส่วนประกอบคือ sodium citrate 2.58068 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 4.2 ชั่งน้ำหนักเอนไซม์ไลเปส 1 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย buffer ที่เตรียมไว้ให้ได้ 2 มิลลิลิตร

ดูดสารละลายที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้นด้วย micropipette ใส่ลงใน 96-well microtiter plate 3 อัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) microtiter plate ที่ 1 (แสดงดังรูปที่ 6)

- หลุม A1-A3 เป็น negative control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย 20% DMSO 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม A4-A6 เป็น negative control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย 20% DMSO 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม B1-B3 เป็น positive control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย orlistat solution 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม B4-B6 เป็น positive control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย orlistat solution 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม C1-C3 หยดสารละลายที่มาจาก ethyl acetate extract โดยแต่ละหลุม ประกอบด้วย ethyl acetate solution 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม C4-C6 หยดสารละลายที่มาจาก ethyl acetate extract โดยแต่ละหลุม ประกอบด้วย ethyl acetate solution 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

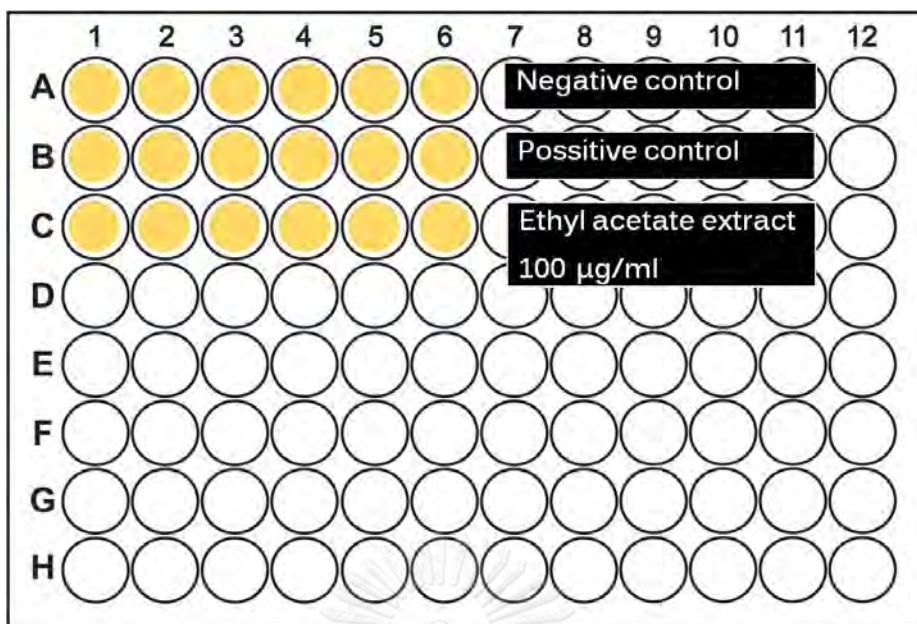
หลังจากหยดสารแล้ว ปิดฝา microtiter plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม sodium citrate 100 ไมโครลิตรทุกหลุม แล้วนำไปวัด fluorescence ด้วย Victor3[®] microplate reader รุ่น wallac1420

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 6 รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiter plate ที่ 1

2) microtiter plate ที่ 2 (แสดงดังรูปที่ 7)

- หลุม A1-A3 เป็น negative control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย 20% DMSO 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม A4-A6 เป็น negative control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย 20% DMSO 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม B1-B3 เป็น positive control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย orlistat solution 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม B4-B6 เป็น positive control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย orlistat solution 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม C1-C3 หยดสารละลายที่มาจาก fraction F โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย fraction F solution 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม C4-C6 หยดสารละลายที่มาจาก fraction F โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย fraction F solution 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

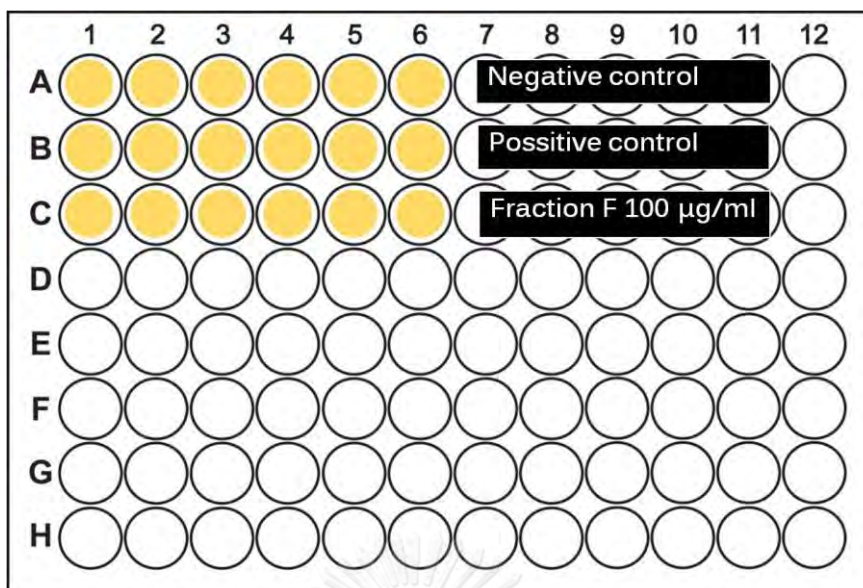
หลังจากหยดสารแล้ว ปิดฝา microtiter plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม sodium citrate 100 ไมโครลิตรทุกหลุม แล้วนำไปวัด fluorescence ด้วย Victor3[®] microplate reader รุ่น wallac1420

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 7 รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiter plate ที่ 2

3) microtiter plate ที่ 3 (แสดงดังรูปที่ 8)

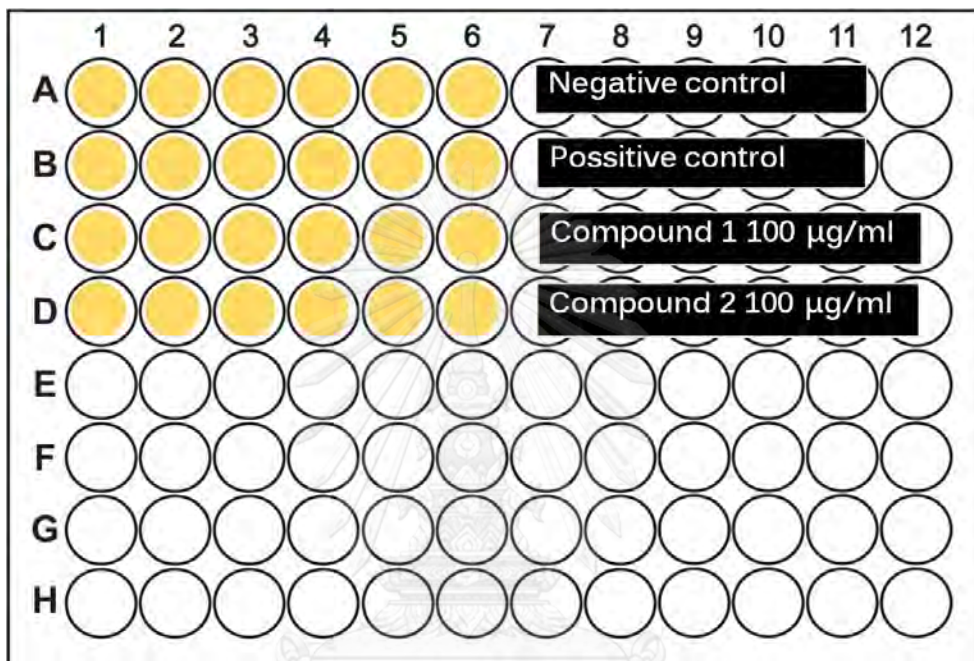
- หลุม A1-A3 เป็น negative control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย 20% DMSO 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร
- หลุม A4-A6 เป็น negative control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย 20% DMSO 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร
- หลุม B1-B3 เป็น positive control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย orlistat solution 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร
- หลุม B4-B6 เป็น positive control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย orlistat solution 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร
- หลุม C1-C3 หยดสารละลายที่มาจาก compound 1 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 1 solution (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร
- หลุม C4-C6 หยดสารละลายที่มาจาก compound 1 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 1 solution (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร
- หลุม D1-D3 หยดสารละลายที่มาจาก compound 2 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 2 solution (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- หลุม D4-D6 หยดสารละลายที่มาจาก compound 2 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 2 solution (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

หลังจากหยดสารแล้ว ปิดฝา microtiter plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม sodium citrate 100 ไมโครลิตรทุกหลุม แล้วนำไปวัด fluorescence ด้วย Victor3[®] microplate reader รุ่น wallac1420



รูปที่ 8 รูปแบบการหยดสารละลายใน microtiter plate ที่ 3

4) microtiter plate ที่ 4 (แสดงดังรูปที่ 9)

- หลุม A1-A3 เป็น negative control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย 20% DMSO 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม A4-A6 เป็น negative control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย 20% DMSO 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม B1-B3 เป็น positive control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย orlistat solution 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม B4-B6 เป็น positive control โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย orlistat solution 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม C1-C3 หยดสารละลายที่มาจาก compound 1 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 1 solution (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

บทความนี้เป็นลิขสิทธิ์ของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นข้อมูลเพิ่มเติมของนิตินิตีของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

- หลุม C4-C6 หยดสารละลายที่มาจาก compound 1 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 1 solution (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

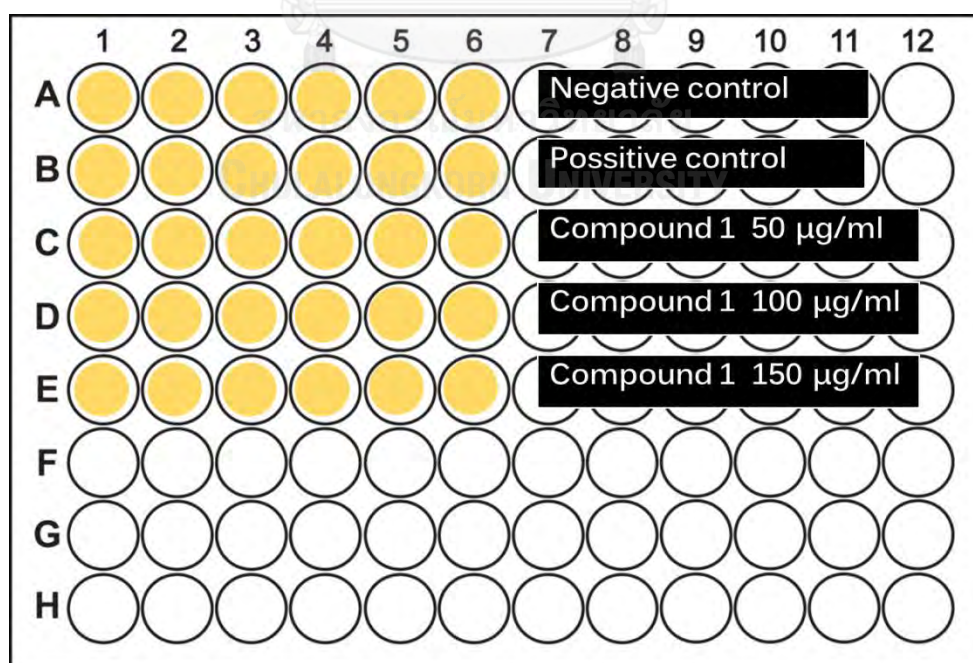
- หลุม D1-D3 หยดสารละลายที่มาจาก compound 1 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 1 solution (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม D4-D6 หยดสารละลายที่มาจาก compound 1 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 1 solution (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม E1-E3 หยดสารละลายที่มาจาก compound 1 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 1 solution (150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร lipase solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

- หลุม E4-E6 หยดสารละลายที่มาจาก compound 1 โดยแต่ละหลุมประกอบด้วย compound 1 solution (150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร buffer solution 25 ไมโครลิตร และ 4-MUO 50 ไมโครลิตร

หลังจากหยดสารแล้ว ปิดฝา microtiter plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม sodium citrate 100 ไมโครลิตรทุกหลุม แล้วนำไปวัด fluorescence ด้วย Victor3[®] microplate reader รุ่น wallac1420 เพื่อนำผลที่ได้มาสร้างกราฟ หาค่า IC₅₀ ของสารแต่ละตัว



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานปริญญาโทฉบับแรกที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานปริญญาโทฉบับแรกที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หลังจากที่วัด fluorescence ของหลุมต่างๆ นำมาคำนวณหา % inhibition ของสารจากสูตร

$$\% \text{ lipase inhibition} = \frac{(A_0 - b_0) - (A_1 - b_1)}{(A_0 - b_0)} \times 100$$

กำหนดให้ A_0 คือค่าเฉลี่ย fluorescence ของ negative control

A_1 คือค่าเฉลี่ย fluorescence ของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่ง

b_0 คือค่าเฉลี่ย fluorescence ของสารที่เป็น blank ของ negative control

b_1 คือค่าเฉลี่ย fluorescence ของสารที่เป็น blank ของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่ง

คำนวณหา IC_{50} โดยจากการคำนวณด้วยสูตรข้างต้น ในสารตัวอย่าง 1 ชนิดจะได้ผลลัพธ์เป็น % inhibition ของสารในแต่ละความเข้มข้น ทั้งหมด 3 ความเข้มข้น จากนั้นนำ % inhibition ดังกล่าวไปสร้างกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง และแกน Y เป็นค่า % inhibition จะได้เป็นสมการเส้นตรง ซึ่งสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างนั้นๆ จากสมการเส้นตรงนี้ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 4

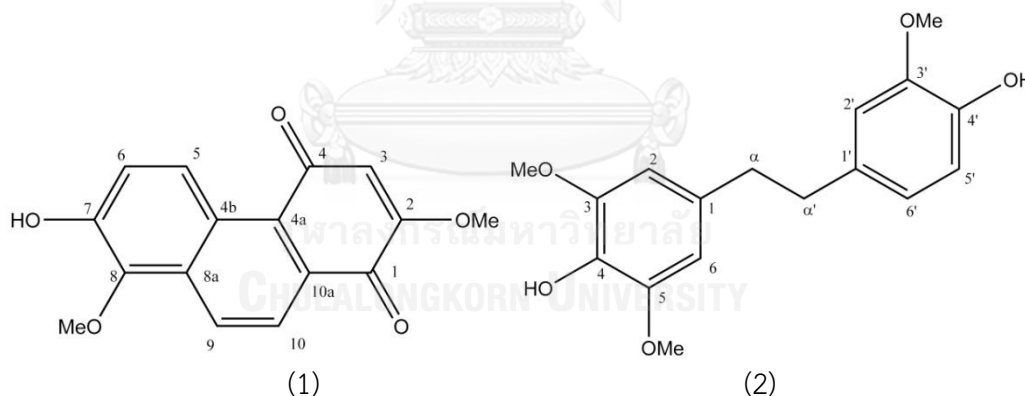
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การสกัดสารบริสุทธิ์

จากกระบวนการแยกสกัดตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น พบ fraction ที่มีลักษณะของ TLC band เป็น spot เดียว นั่นคือ FF8(23-26) และ FF10(15-16) ซึ่งมีน้ำหนัก 25.9 มิลลิกรัม (% yield เท่ากับ 0.0024%) และ 89.3 มิลลิกรัม (% yield เท่ากับ 0.0081%) ตามลำดับ

4.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

fraction FF8(23-26) และ FF10(15-16) ซึ่งพบว่ามี spot ที่มีการเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรเพียง spot เดียว อาจแสดงว่า fraction ดังกล่าวมีสารบริสุทธิ์เพียงสารเดียว เมื่อนำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy รูปแบบ ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC และ NOESY แล้วนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ร่วมกันได้เป็นสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร โดยที่ fraction FF8(23-26) ได้โครงสร้างดังรูปที่ 1 กำหนดให้เป็น compound 1 ส่วน FF10(15-16) มีโครงสร้างดังรูปที่ 2 กำหนดให้เป็น compound 2



รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ (1) compound 1 และ (2) compound 2

จากนั้นนำสูตรโครงสร้างที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูลว่าสารทั้งสองชนิดเคยถูกค้นพบหรือรายงานมาก่อนหรือไม่ ซึ่งพบว่าไม่เคยมีรายงานองค์ประกอบทางเคมีของเอื้องผึ้งมาก่อน โดยพบว่า compound 1 คือสารที่มีชื่อว่า cyripedin ส่วนสาร compound 2 คือสารที่มีชื่อว่า moscatilin หรือ dendrophenol หรือ 4,4'-dihydroxy-3,3',5-trimethoxybiphenyl และมีผู้ทำการศึกษาวิจัยและรายงานค่า chemical shift และ NMR spectrum ของทั้งสาร cyripedin และ moscatilin มาก่อน

แล้วเขียนค้น จึงนำ ^1H NMR spectrum ของสาร compound 1 ใน acetone d_6 มาเปรียบเทียบกับ

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

NMR spectrum ของสาร cypripedin ใน acetone- d_6 [21] ซึ่งแสดงในตารางที่ 2 และนำ NMR spectrum ของสาร compound 2 ใน acetone- d_6 มาเปรียบเทียบกับ NMR spectrum ของสาร moscatilin ใน acetone- d_6 [22] ซึ่งแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ของ compound 1 ใน acetone- d_6 และ cypripedin ใน acetone- d_6

Position	compound 1		cypripedin [21]	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	181.1	-	181.2
2	-	159.6	-	159.6
3	6.20 (s)	111.9	6.20 (s)	111.9
4	-	189.1	-	189.1
4a	-	128.3	-	128.3
4b	-	125.7	-	125.7
5	9.27 (d, 9.6)	126.2	9.27 (d, 9.6)	126.2
6	7.43 (d, 9.6)	123.4	7.43 (d, 9.6)	123.4
7	-	149.5	-	149.5
8	-	141.0	-	141.1
8a	-	133.9	-	134.0
9	8.38 (d, 9)	127.1	8.37 (d, 9)	127.2
10	8.09 (d, 9)	122.6	8.09 (d, 9)	122.7
10a	-	130.0	-	130.0
2-MeO	3.94 (s)	56.6	3.93 (s)	56.7
8-MeO	3.92 (s)	61.5	3.94 (s)	61.5

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ของ compound 2 ใน acetone- d_6
และ moscatilin ใน acetone- d_6

Position	compound 2		moscatilin [22]	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	133.1	-	133.1
2	6.47 (s)	106.7	6.48 (s)	106.7
3	-	148.4	-	148.3
4	-	134.8	-	134.8
5	-	148.4	-	148.3
6	6.47 (s)	106.7	6.48 (s)	106.7
1'	-	134.1	-	134.1
2'	6.78 (d, 1.8)	112.9	6.78 (d, 2.0)	112.9
3'	-	148.0	-	147.9
4'	-	145.4	-	145.3
5'	6.72 (d, 8.0)	115.5	6.75 (d, 8.0)	115.4
6'	6.64 (dd, 8.0, 1.8)	121.6	6.64 (dd, 8.0, 2.0)	121.6
α	2.78 (s)	38.9	2.78 (m)	38.8
α'	2.78 (s)	38.4	2.78 (m)	37.3
3-OMe	3.75 (s)	56.5	3.75 (s)	56.5
3'-OMe	3.77 (s)	56.1	3.76 (s)	56.1
5-OMe	3.75 (s)	56.5	3.75 (s)	56.5

จากผลการเปรียบเทียบข้อมูล NMR spectrum ในส่วนของ ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, HMBC และ NOESY ระหว่างสาร compound 1 กับสาร cypripedin และสาร compound 2 กับสาร moscatilin พบว่าค่า chemical shift ของการเปรียบเทียบสารทั้ง 2 คู่ มีความใกล้เคียงกันมากพอที่จะสรุปได้ว่าสาร compound 1 คือ สาร cypripedin และสาร compound 2 คือ สาร moscatilin

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

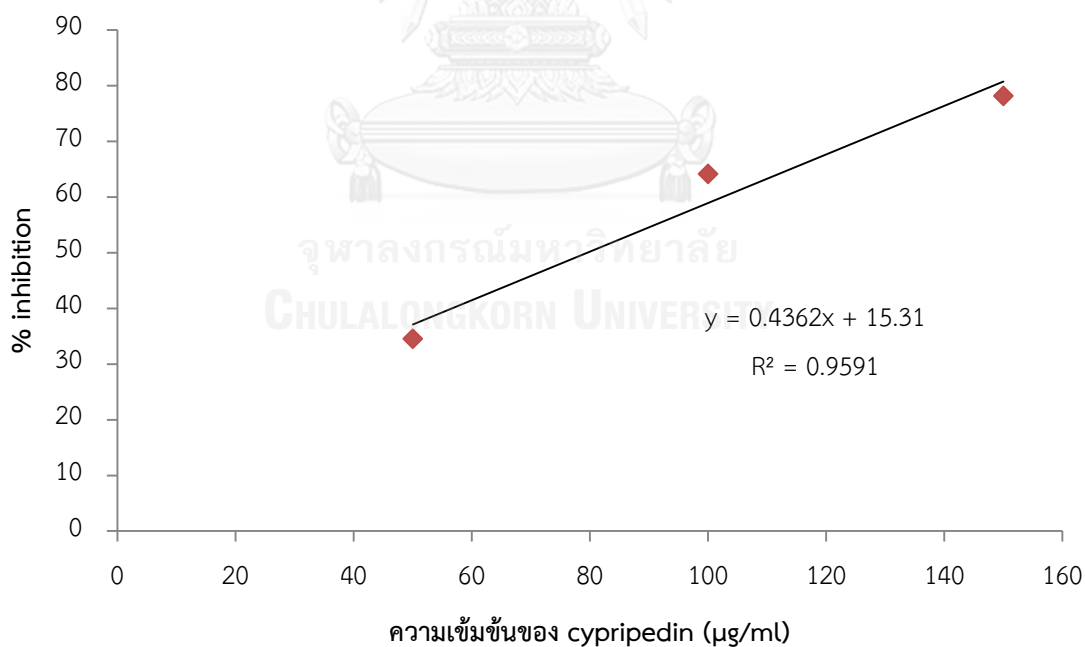
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

ผลการทดสอบหา % inhibition แสดงดังตารางที่ 4 ส่วนกราฟที่ใช้คำนวณ IC_{50} แสดงดังรูปที่ 11

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส

สารที่ทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition	%RSD
DMSO (negative control)	-	0.00	
ethyl acetate extract	100	84.17	2.83
fraction F	100	82.05	11.12
cypripedin (compound 1)	100	57.91	9.62
moscatilin (compound 2)	100	26.53	5.09
cypripedin (compound 1)	50	34.52	8.35
	100	64.13	19.08
	150	78.14	34.82



รูปที่ 11 กราฟแสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (% inhibition) ของ cypripedin ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

จากรูปที่ 11 จะได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการ $y = 0.4362x + 15.31$ ซึ่งสาร cypripedin สามารถยับยั้งไลเปสได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 79.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า สาร cypripedin (284.267 g/mol) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 79.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 320.34 ไมโครโมลาร์



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากสารสกัดหยาบ methanol ของ *Dendrobium lindleyi* หรือเอื้องผึ้ง ซึ่งคัดกรองฤทธิ์เบื้องต้นพบว่ายับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดมาคัดกรองฤทธิ์ในแต่ละขั้นของการแยกสกัด หลังจากแยกสารด้วยวิธี partition พบว่าส่วนของ ethyl acetate extract สามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 84.17 เมื่อนำ ethyl acetate extract มาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ผ่าน silica gel column พบว่า fraction F ที่ได้สามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 82.05 ต่อมาเมื่อสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วย silica gel และ sephadex LH-20 column จากผลการทำ TLC ทำให้ทราบว่าสกัดสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด จึงนำสารที่ได้ไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy พบว่าเป็นสาร cypripedin และ moscatilin

ในปัจจุบันมีสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสเพียงชนิดเดียวที่ใช้เป็นยารักษาโรคอ้วน นั่นคือ orlistat ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ดี ส่วนสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสที่มีผู้ศึกษานั้นมีมากมาย [2] ซึ่งในครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดที่สกัดได้จากเอื้องผึ้ง ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สารความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่า cypripedin สามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่าร้อยละ 50 ในขณะที่ moscatilin ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้น้อยกว่าร้อยละ 50 ซึ่งถือได้ว่า moscatilin ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส จึงนำเฉพาะสาร cypripedin ไปหาค่า IC_{50} โดยใช้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 50 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณค่า IC_{50} ได้เท่ากับ 320.34 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้น้อยมาก เมื่อเทียบกับ orlistat ที่มีการรายงานค่า IC_{50} ต่อ human pancreatic lipase เท่ากับ 122 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรหรือเท่ากับ 0.246 ไมโครโมลาร์ [23] และ IC_{50} ต่อ porcine pancreatic lipase ซึ่งได้จากวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสโดยมี 4-MUO เป็น substrate เช่นเดียวกับการวิจัยครั้งนี้ เท่ากับ 0.013 ไมโครโมลาร์ [5] การค้นหาสารโดยการทดสอบฤทธิ์สารสกัดหยาบไปพร้อมๆ กับการแยกสาร โดยเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ หรือวิธี bioassay guided fractionation ทำให้ค้นพบสารที่มีฤทธิ์ที่ต้องการ แต่จะเห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสของสารบริสุทธิ์จะน้อยกว่าสารสกัดหยาบ เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ ที่สารบริสุทธิ์จะมีฤทธิ์น้อยกว่าสารสกัดหยาบ [5,24] เนื่องจากในสารสกัดหยาบนั้นมีสารหลายชนิดที่อาจออกฤทธิ์ร่วมกัน แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่สารบริสุทธิ์จะมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดหยาบ เช่น ฤทธิ์ของ 7-phloroecol ที่ได้จาก *Eisenia bicyclis* [25] หรือฤทธิ์ของ atractylodin ที่ได้จาก *Atractylodes lancea* [26] ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของพืช

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารในกลุ่ม polyphenols หลายชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส [2] และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารจาก *Dioscorea opposita* ซึ่งเป็นสารกลุ่ม bibenzyls นั้น มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส [4] จากงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยสามารถสกัดสารบริสุทธิ์ออกมาได้ 2 ชนิด คือ moscatilin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม bibenzyls และ cypripedin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม benzonaphthoquinone ถึงแม้ว่า moscatilin จะไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส แต่ก็ทำให้พบสาร cypripedin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ทั้งนี้ในเบื้องต้นอาจมีสารอื่นๆ ที่อาจจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่า cypripedin แต่ยังไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ ดังนั้นในการศึกษาเพิ่มเติมอาจใช้วิธีการแยกสารที่สามารถแยกสารอื่นๆ ออกจากกันได้ เช่น เลือกใช้เฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการทำโครมาโทกราฟี หรือใช้เทคนิคอื่นๆ ในการแยกสาร

โรคอ้วนเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติในการเผาผลาญสารอาหาร ทำให้มีการเพิ่มการสะสมของไขมันในร่างกาย ดังนั้นการควบคุมการได้รับปริมาณไขมันจากอาหารเข้าสู่ร่างกายจึงเป็นสิ่งสำคัญ ประกอบกับยาที่ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสมีแนวโน้มว่าจะมีผลข้างเคียงที่ไม่รุนแรง เมื่อเทียบกับยาที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง เนื่องจากเป็นยาที่ไม่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย แต่ในปัจจุบันมียาเพียงชนิดเดียวคือ orlistat ที่ออกฤทธิ์โดยยับยั้งเอนไซม์ไลเปส และไม่นานมานี้มีรายงานความเป็นไปได้ที่ orlistat จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิด severe liver injury [1] ดังนั้นการพยายามค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสจึงมีความสำคัญต่อผู้ป่วยโรคอ้วน ผลจากการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนารักษาโรคอ้วนต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

รายการอ้างอิง

- [1] The U.S. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: completed safety review of Xenical/Alli (orlistat) and severe liver injury [Internet]. 2010 [cited 2018 Apr 6]. Available from: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm213038.htm>.
- [2] Lunagariya NA, Patel NK, Jagtap SC, Bhutani KK. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. EXCLI Journal. 2014;13:897-921.
- [3] Lam Y, Ng TB, Yao RM, Shi J, Xu K, Sze SC, et al. Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in dendrobium plants. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:841752.
- [4] Yang MH, Chin YW, Yoon KD, Kim J. Phenolic compounds with pancreatic lipase inhibitory activity from Korean yam (*Dioscorea opposita*). J Enzyme Inhib Med Chem. 2014;29(1):1-6.
- [5] Inthongkaew P, Chatsumpun N, Supasuteekul C, Kitisripanya T, Putalun W, Likhitwitayawuid K, et al. α -Glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activities and glucose uptake stimulatory effect of phenolic compounds from *Dendrobium formosum*. Rev Bras Farmacogn. 2017;27(4):480-7.
- [6] Li X, Yang J, Zhu Y, Liu Y, Shi X, Yang G. Mouse maternal high-fat intake dynamically programmed mRNA m(6)A modifications in adipose and skeletal muscle tissues in offspring. Int J Mol Sci. 2016;17(8).
- [7] Raj M, Kumar RK. Obesity in children & adolescents. Indian J Med Res. 2010;132(5):598-607.
- [8] Breum L, Fernstrom MH. Drug-induced Obesity. In: Björntorp P, editor. International textbook of obesity. NJ: John Wiley & Sons, Ltd; 2001. p. 269-81.
- [9] Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2014;384(9945):766-81.

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

**The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.**

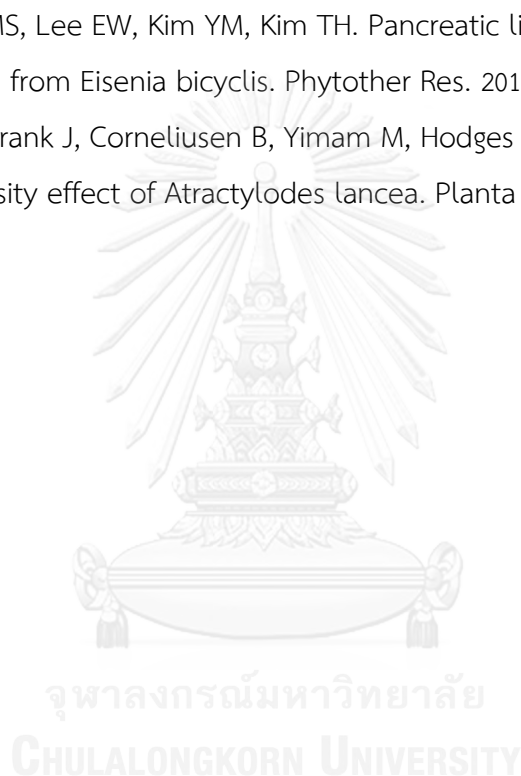
- [10] Pi-Sunyer X, Shanahan W, Fain R, Ma T, Garvey WT. Impact of lorcaserin on glycemic control in overweight and obese patients with type 2 diabetes: analysis of week 52 responders and nonresponders. *Postgrad Med*. 2016;128(6):591-7.
- [11] Alfaris N, Minnick AM, Hopkins CM, Berkowitz RI, Wadden TA. Combination phentermine and topiramate extended release in the management of obesity. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(8):1263-74.
- [12] Reference.medscape.com. Qsymia (phentermine/topiramate) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more: Reference.medscape.com [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 6]. Available from: <https://reference.medscape.com/drug/qsymia-phentermine-topiramate-999759#10>.
- [13] Guzman F. The psychopharmacology of bupropion: an illustrated overview [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 6]. Available from: <https://psychopharmacologyinstitute.com/antidepressants/bupropion-%20psychopharmacology/>.
- [14] Isaacs D, Prasad-Reddy L, Srivastava SB. Role of glucagon-like peptide 1 receptor agonists in management of obesity. *Am J Health Syst Pharm*. 2016;73(19):1493-507.
- [15] Kim S. Drugs to treat obesity: do they work?. *Postgrad Med J*. 2016;92(1089):401-6.
- [16] Valentino MA, Lin JE, Waldman SA. Central and peripheral molecular targets for antiobesity pharmacotherapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87(6):652-62.
- [17] Bouchard C. *Progress in Obesity Research: 9*. Surrey: John Libbey Eurotext; 2003.
- [18] Wilding JPH. Intestinal lipase inhibitors. In: Wilding JPH, editor. *Pharmacotherapy of obesity*. Switzerland: Birkhäuser Verlag; 2008. p. 47-57.
- [19] Jacks TJ, Kircher HW. Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. *Anal Biochem*. 1967;21(2):279-85.
- [20] The botanical garden organization. *Dendrobium lindleyi Steud* [Internet]. 2016 [cited 2018 Apr 6]. Available from: http://www.qsbg.org/Database/Botanic_Book%20full%20option/search.asp?txtsearch=%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%9C%E0%B8%B6%E0%B9%89%E0%B8%87.
- [21] Wattanathamsan O, Treesuwan S, Sritularak B, Pongrakhananon V. Cyripedin, a phenanthrenequinone from *Dendrobium densiflorum*, sensitizes non-small cell lung cancer H460 cells to cisplatin-mediated apoptosis. *J Nat Med*. 2018;72(2):503-13.

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

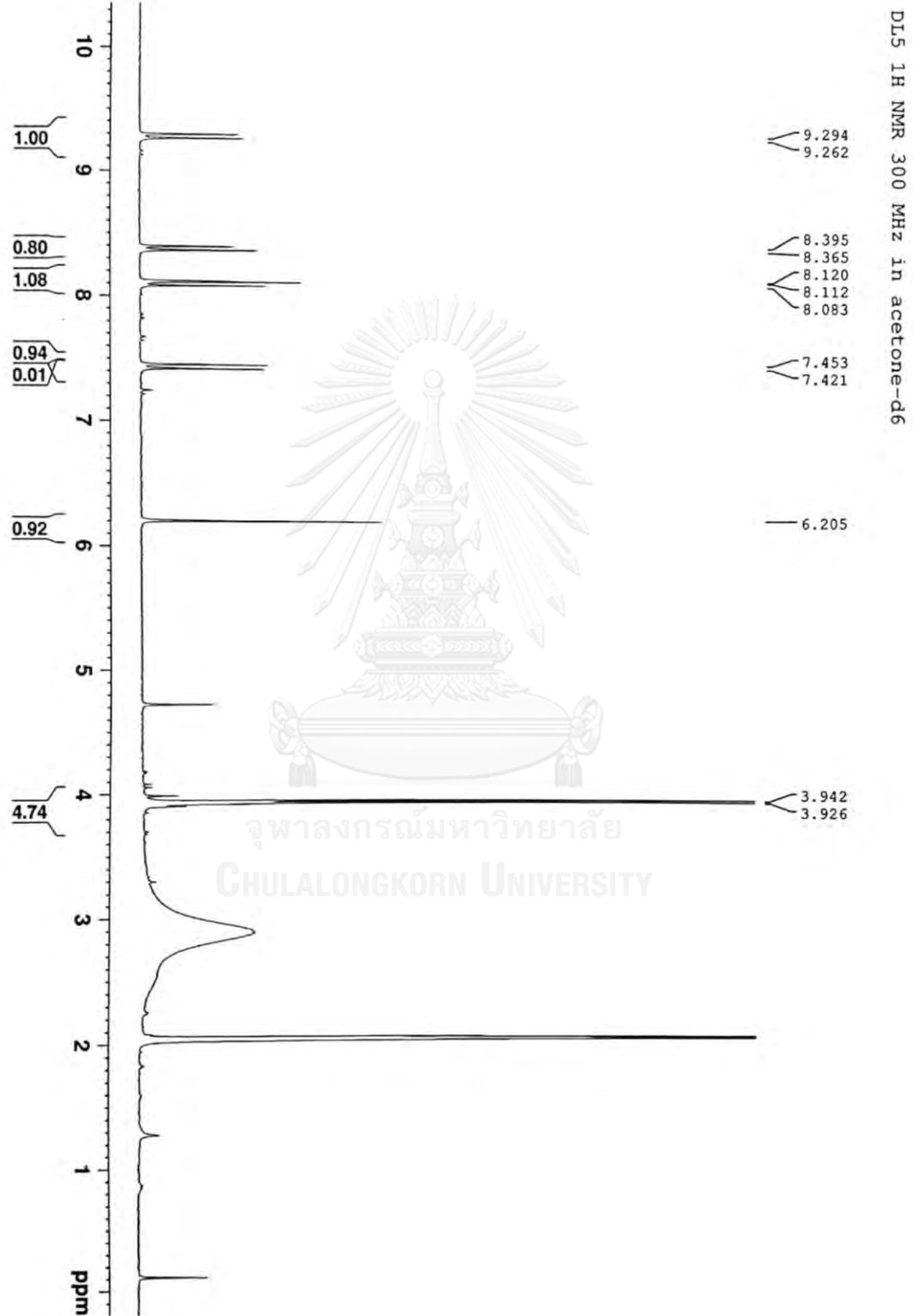
- [22] Klongkumnuankarn P, Busaranon K, Chanvorachote P, Sritularak B, Jongbunprasert V, Likhitwitayawuid K. Cytotoxic and Antimigratory Activities of Phenolic Compounds from *Dendrobium brymerianum*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:350410.
- [23] Selleckchem.com. Orlistat [Internet]. 2018s [cited 2018 Apr 7]. Available from: [http://www.selleckchem.com/products/Orlistat\(Alli\).html](http://www.selleckchem.com/products/Orlistat(Alli).html).
- [24] Ninomiya K, Matsuda H, Shimoda H, Nishida N, Kasajima N, Yoshino T, et al. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14(8):1943-6.
- [25] Eom SH, Lee MS, Lee EW, Kim YM, Kim TH. Pancreatic lipase inhibitory activity of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis*. *Phytother Res*. 2013;27(1):148-51.
- [26] Jiao P, Tseng-Crank J, Corneliusen B, Yimam M, Hodges M, Hong M, et al. Lipase inhibition and antiobesity effect of *Atractylodes lancea*. *Planta Med*. 2014;80(7):577-82.



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

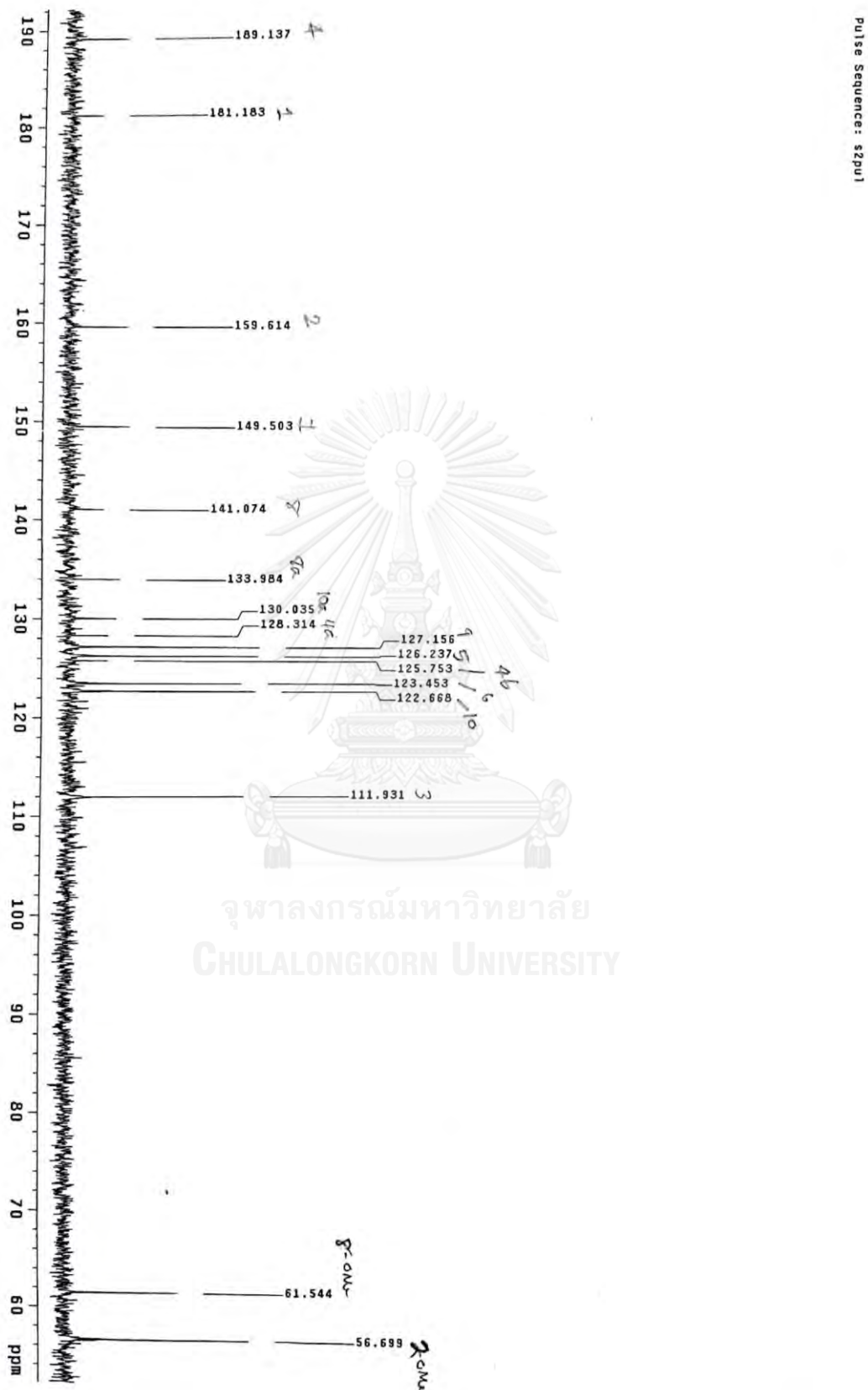
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ภาคผนวก



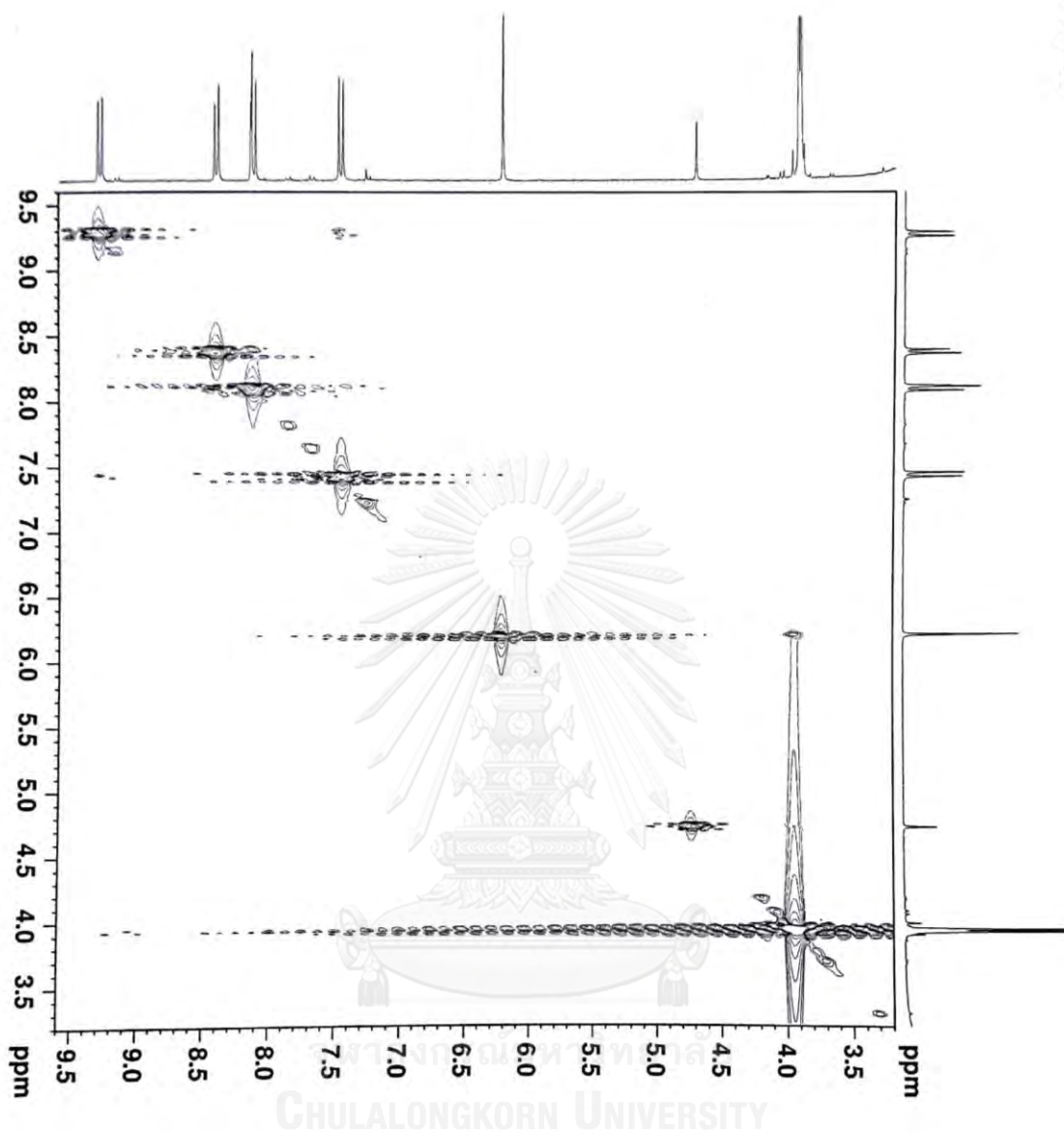
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
 รูปที่ 13 ^{13}C NMR spectrum ของ compound 1 (cypripedin)
 เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

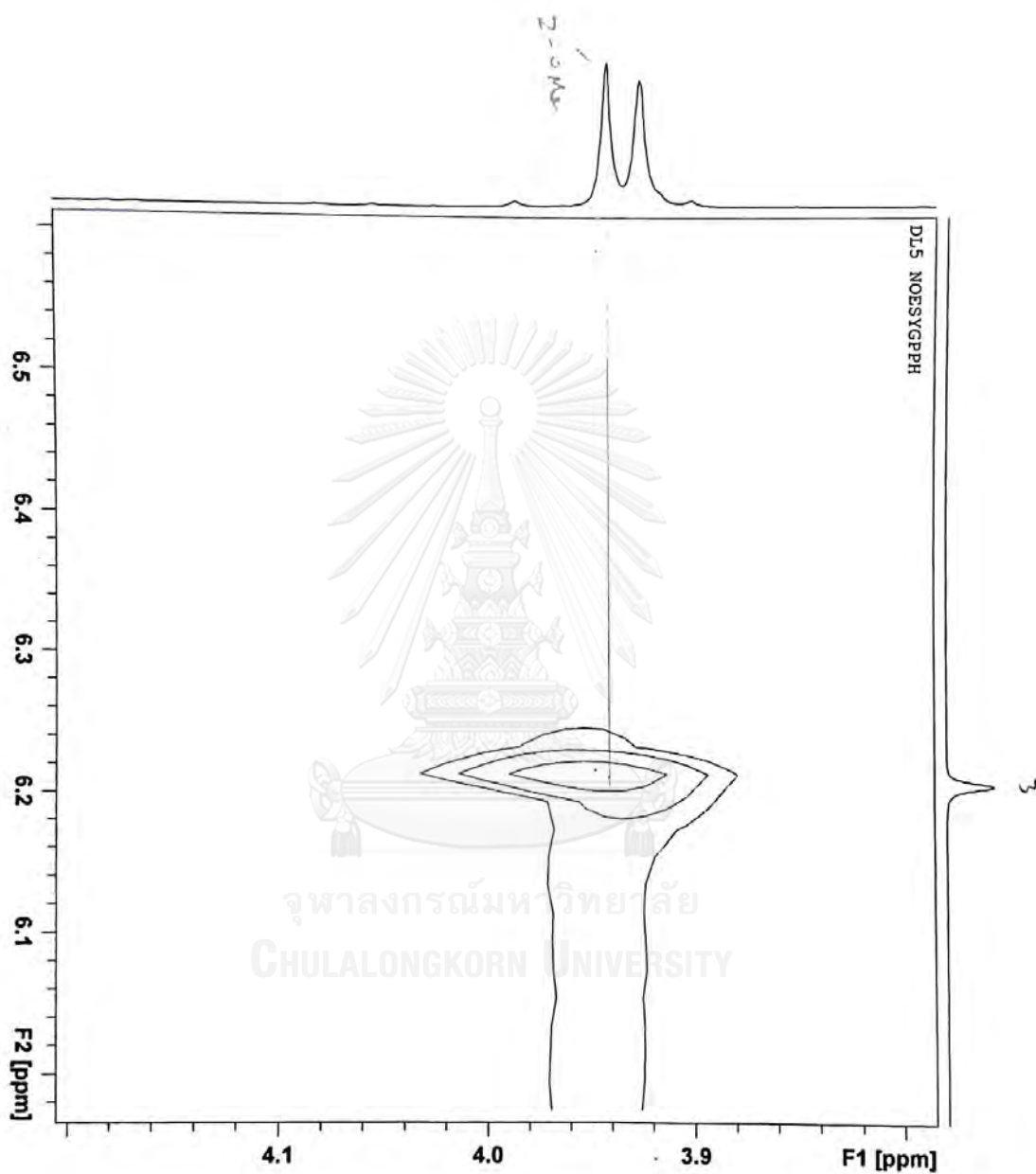
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
 are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ 14 NOESY spectrum ของ compound 1 (cypripedin)

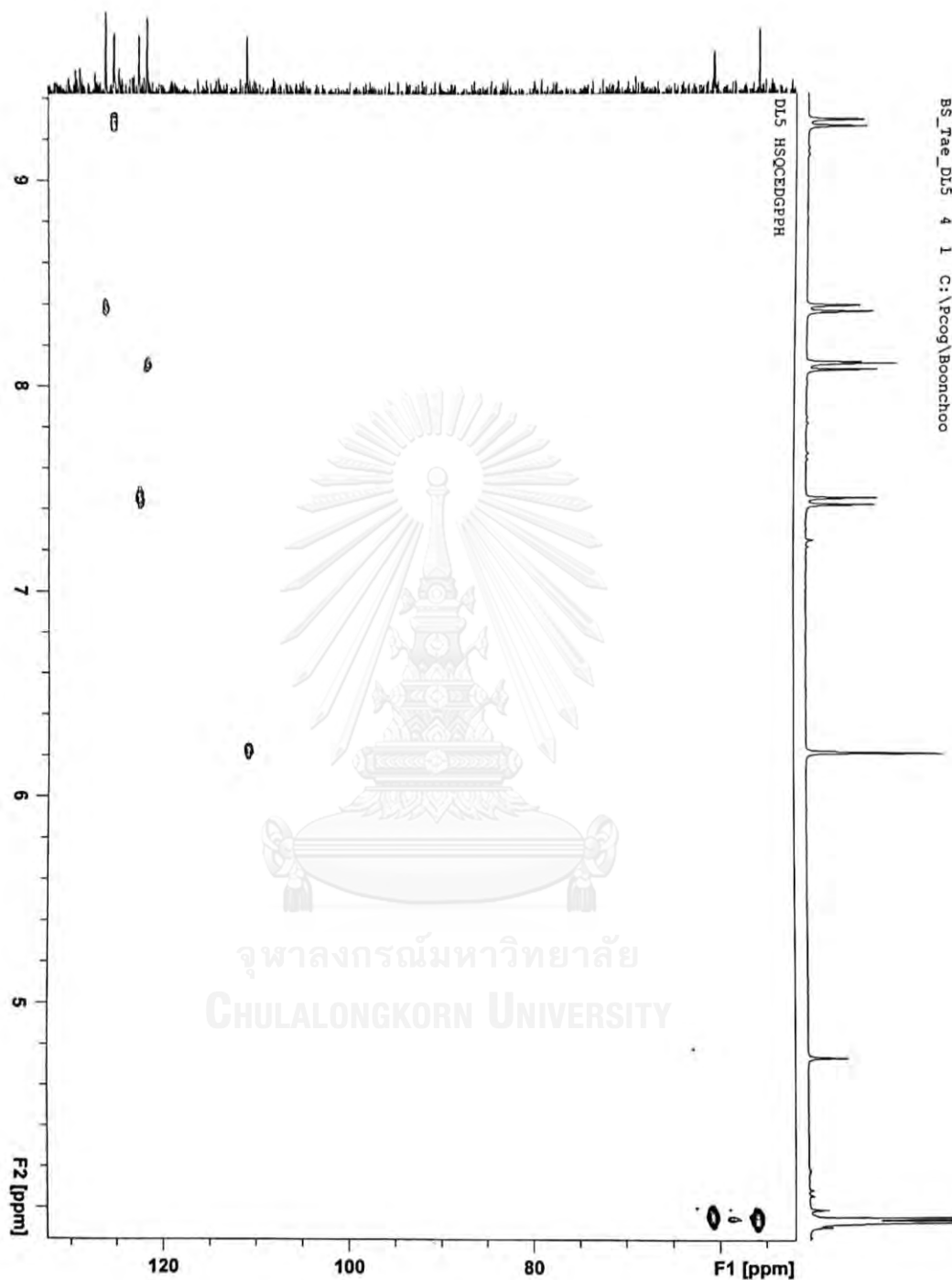
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนักศึกษาของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



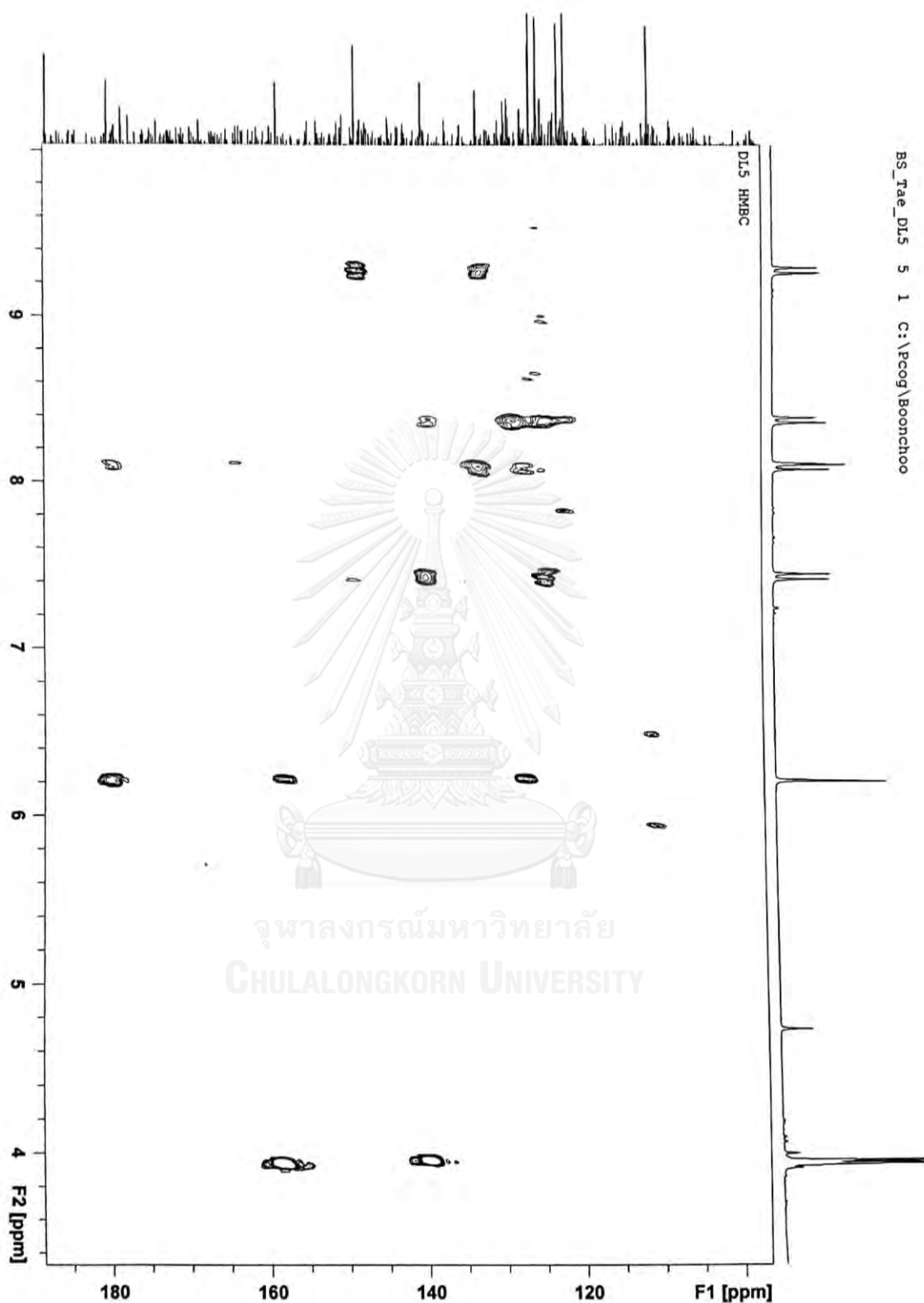
รูปที่ 16 HSQC spectrum ของ compound 1 (cypripedin)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลงานที่แต่งของโครงการงานปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
รูปที่ 18 HMBC spectrum ของ compound 1 (cypripedin)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Mass Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name OSPN20171003005.d
 Method Tune_low_POS_Natee20130403.m
 Sample Name DL-5
 DL-5

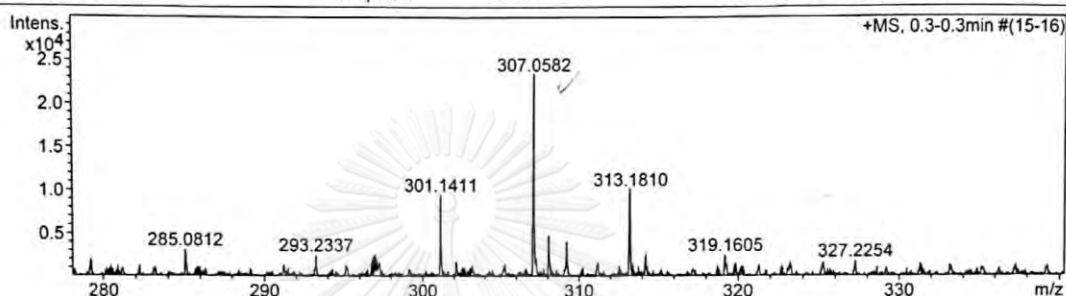
Acquisition Date 10/3/2017 9:49:01 AM
 Operator Administrator
 Instrument micrOTOF 72

Acquisition Parameter

Source Type ESI
 Scan Range n/a
 Scan Begin 50 m/z
 Scan End 3000 m/z

Ion Polarity Positive
 Capillary Exit 130.0 V
 Hexapole RF 150.0 V
 Skimmer 1 45.0 V
 Hexapole 1 24.3 V

Set Corrector Fill 50 V
 Set Pulsar Pull 337 V
 Set Pulsar Push 337 V
 Set Reflector 1300 V
 Set Flight Tube 9000 V
 Set Detector TOF 2295 V

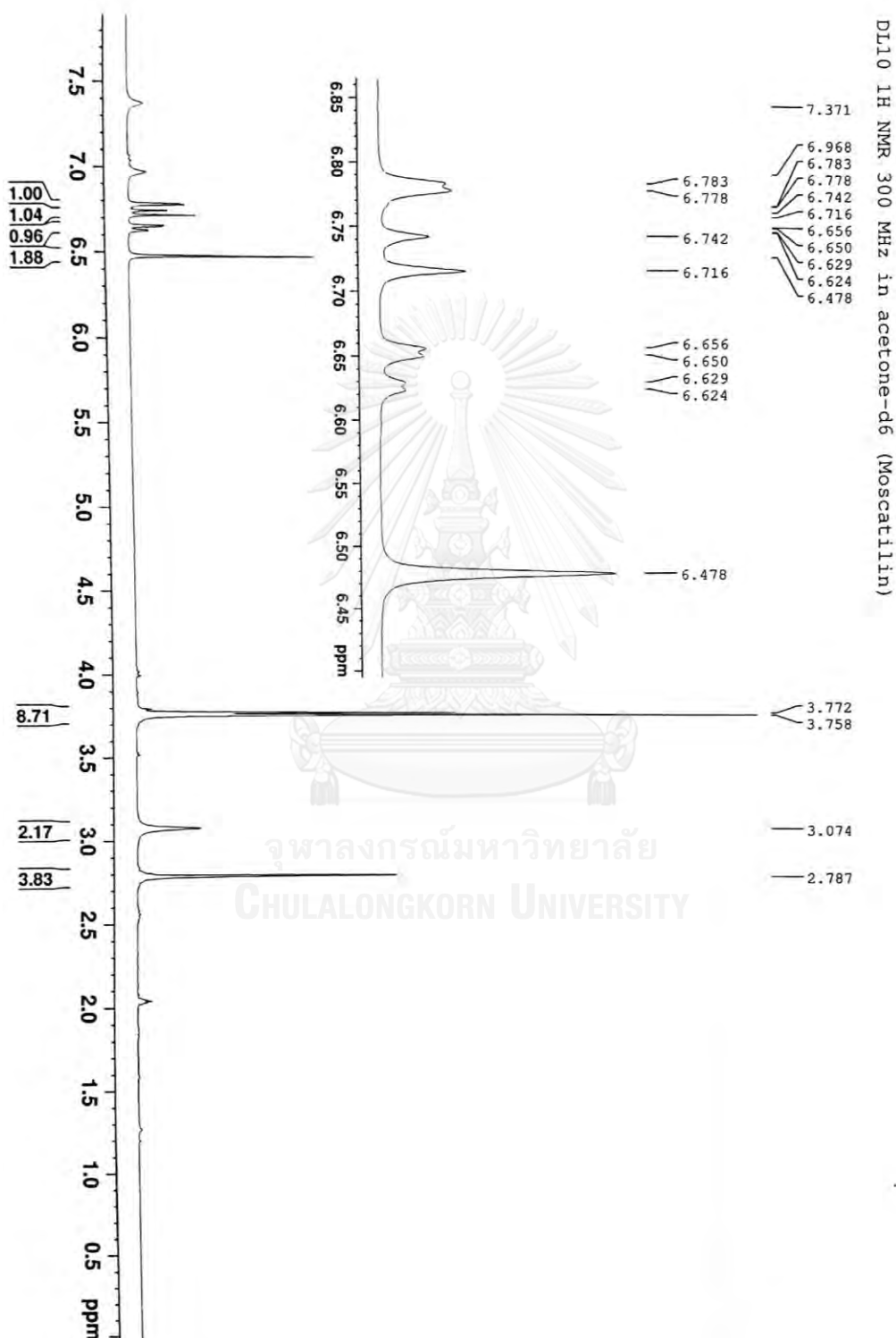


#	m/z	I	I%	S/N	FWHM	Res.
1	279.2203	2039	8.7	5.3	0.0777	3593
2	280.8750	1090	4.7	3.1	0.0113	24931
3	282.2180	600	2.6	1.7	0.0134	21034
4	283.1673	851	3.6	2.5	0.0829	3416
5	285.0812	2727	11.7	7.9	0.0788	3618
6	289.1261	660	2.8	1.9	0.0845	3423
7	290.4535	488	2.1	1.4	0.0129	22450
8	293.2337	2043	8.8	5.9	0.0690	4248
9	296.4751	672	2.9	2.0	0.0147	20179
10	299.1546	752	3.2	2.2	0.0943	3172
11	301.1411	9305	39.9	27.1	0.0617	4883
12	303.1651	788	3.4	2.3	0.1198	2531
13	304.4535	582	2.5	1.7	0.0098	31129
14	305.2319	1260	5.4	3.7	0.0979	3117
15	307.0582	23333	100.0	68.2	0.0624	4918
16	308.0604	4558	19.5	13.3	0.0595	5179
17	313.1810	10095	43.3	29.6	0.0762	4110
18	314.1845	2498	10.7	7.3	0.0868	3620
19	319.1605	2303	9.9	6.8	0.0834	3828
20	319.7975	569	2.4	1.7	0.0792	4037
21	321.2533	1056	4.5	3.1	0.1044	3076
22	322.6791	1067	4.6	3.1	0.0175	18472
23	325.5168	708	3.0	2.1	0.0162	20120
24	327.2254	1597	6.8	4.7	0.0891	3673
25	328.5923	888	3.8	2.6	0.0122	27005
26	331.2754	1303	5.6	3.9	0.0378	8764
27	333.1557	1116	4.8	3.3	0.0865	3853
28	336.2432	745	3.2	2.2	0.0857	3921
29	337.2400	997	4.3	3.0	0.1186	2844
30	339.2154	931	4.0	2.8	0.1091	3108

calcd 307.0582

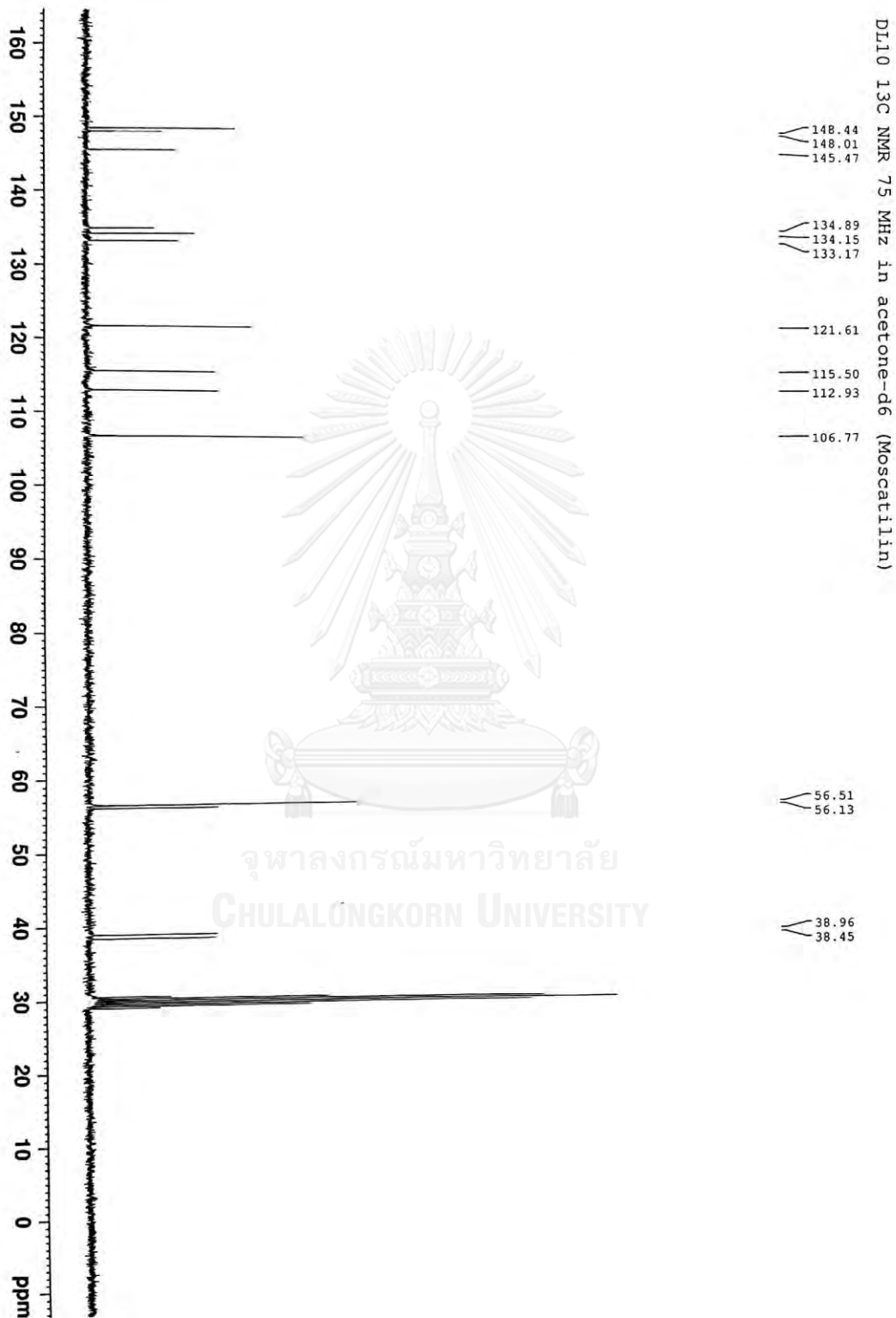
รูปที่ 19 mass spectrum ของ compound 1 (cypripedin)
 บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
 เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
 are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
รูปที่ 20 ^1H NMR spectrum ของ compound 2 (moscatilin)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานปริญญาานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานปริญญาานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.