

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเถาชิงช้าสะแกราช



นางสาวบงกช พิทักษ์ชาติวงศ์
นายชยากร เหลืองสะอาด
นายอรรถเดช อุณหเลขกะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

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.

Chemical constituents and biological activities of *Tinospora siamensis* vine

Bonggot Pitakchatwong
Chayakorn Luangsaard
Attadech Unhalekka



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

Chulalongkorn University

2014

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.

หัวข้อโครงการปริญญาโท	องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเถาชิงช้าสะแกราช
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาวบงกช พิทักษ์ชาติวงศ์ นายชยากร เหลืองสะอาด นายอรรถเดช อุณหเลขกะ
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนา ยา / เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.ศุภกัญญา ชำนิ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพชร สุกุลบำรุงศิลป์)

..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนา ยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรสุรพงษ์ เก่งทอง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.ศุภกัญญา ชำนิ)

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.

คำนำ

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาด้านหลักสูตรเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้บัณฑิตเภสัชศาสตร์ได้มีการเรียนรู้ให้มีความเชี่ยวชาญในด้านที่ตนสนใจ รวมถึงฝึกฝนตนเอง ทั้งในเรื่องของการคิดวิเคราะห์ การคิดและวางแผนการทำงานอย่างเป็นระบบ การทำงานเป็นทีม รวมถึงการวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้ทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวิชาชีพ และส่งเสริมสุขภาพที่ดีให้แก่ประชาชน

รายงานโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อเสนอผลการวิจัยในหัวข้อเรื่อง องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเถาชิงช้าสะแกราช ซึ่งมีเนื้อหาในเรื่องของที่มาและความสำคัญของโครงการ ขั้นตอนและวัสดุที่ใช้ในการศึกษา รวมถึงผลการวิจัย การอภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย ซึ่งคณะผู้วิจัยมีความมุ่งหวังว่ารายงานฉบับนี้จะสามารถนำไปพัฒนาเพื่อหาสารสำคัญซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อพัฒนาเป็นยาที่สามารถใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยสปีไป หากโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้วิจัยขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

ในการศึกษาโครงการปริญญาโท คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหรั่ง อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่มีประโยชน์ รวมถึงช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการปริญญาโทฉบับนี้ จนทำให้โครงการปริญญาโทและรายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เกษักร ดร.รุทธิ สุทธิศรี ภาควิชาเกษตรและเกษตรศึกษาศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำในการแยกสัปดาห์และวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ และให้ความช่วยเหลือรวมถึงข้อแนะนำต่างๆ จนทำให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ เกษักร ดร.บุญชู ศรีตุลาภิรักษ์ ภาควิชาเกษตรและเกษตรศึกษาศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ขอขอบคุณ คุณศศิมา จันทร์แย้ม นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาเกษตรและเกษตรศึกษาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเกษตรและเกษตรศึกษาศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ ตลอดการดำเนินงาน จนกระทั่งโครงการปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณพี่น้องบัณฑิตปริญญาเอกและปริญญาโททุกท่านในภาควิชาเกษตรและเกษตรศึกษาศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำต่างๆ จนทำให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จด้วยดี



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.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์	ก
คำนำ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 วิธีดำเนินการโดยย่อ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 การปริทรรศน์วรรณกรรม	4
2.1 ซิงช้าสะแกราช (<i>Tinospora siamensis</i> Forman)	4
2.2 Bioassay-guided fractionation	5
2.3 Alpha – glucosidase inhibitors (AGIs)	6
3 วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย	7
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	7
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	8
3.3 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย	9
3.4 วิธีการศึกษา	9
4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	20
4.1 ผลการวิจัย	20
4.1.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy	20
4.1.1.1 สาร TS1	20
4.1.1.2 สาร TS2	22
4.1.1.3 สาร TS3	24
4.1.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ	24
4.1.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในสารสกัดหยาบเถา ซิงช้าสะแกราช	24
4.1.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ในสารสกัดหยาบเถาซิงช้าสะแกราช	25

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.

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดสในสารสกัดหยาบเถา ชิงช้าสะแกราช	26
4.1.2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา <i>Candida albicans</i> ในสารสกัดหยาบ เถาชิงช้าสะแกราช	27
4.1.2.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสในสารบริสุทธิ์ TS1 และ TS2	27
4.2 อภิปรายผล	30
4.2.1 อภิปรายผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy	30
4.2.1.1 สาร TS1	30
4.2.1.2 สาร TS2	31
4.2.1.3 สาร TS3	31
4.2.2 อภิปรายผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ	32
4.2.2.1 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์	32
4.2.2.2 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
4.2.2.3 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส	33
4.2.2.4 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา <i>Candida albicans</i>	33
4.1.2.5 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	34
5 สรุปผลการวิจัย	35
รายการอ้างอิง	37
ภาคผนวก	41
ภาคผนวก ก แผ่น thin layer chromatography ที่ใช้ในการวิจัย	41
ภาคผนวก ข NMR Spectrum ของสารบริสุทธิ์	48

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	10
ตารางที่ 2	21
ตารางที่ 3	23
ตารางที่ 4	25
ตารางที่ 5	26
ตารางที่ 6	26
ตารางที่ 7	27
ตารางที่ 8	28



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.

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ต้นชิงช้าสะแกราชในธรรมชาติ	4
รูปที่ 2 เถาของชิงช้าสะแกราช	9
รูปที่ 3 ขั้นตอนการแยกสกัดสาร TS1 และ TS2	11
รูปที่ 4 ขั้นตอนในการแยกสกัดสาร TS3	13
รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Naringenin	20
รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide	22
รูปที่ 7 %inhibition ของ TS2 เปรียบเทียบกับ Acarbose	28
รูปที่ 8 เปรียบเทียบค่า IC ₅₀ ของ TS2 และ Acarbose	29
รูปที่ ก. 1 ผลการศึกษา TLC ของสิ่งสกัด (1)Hexane (2)EtOAc (3)Acetone (4)MeOH ภายใต้ A.สภาวะห้อง B. UV 254 nm C. UV 365 nm เมื่อใช้ solvent system คือ Hexane : EtOAc = 1:1	41
รูปที่ ก. 2 ผลการศึกษา TLC ของสิ่งสกัด EtOAc เมื่อสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution และใช้ solvent system คือ CH ₂ Cl ₂ : Acetone 8 : 1	41
รูปที่ ก. 3 ผลการศึกษารวม fraction จากสิ่งสกัด EtOAc ที่สามารถแยกได้ หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ CH ₂ Cl ₂ : Acetone 6 : 4	42
รูปที่ ก. 4 ผลการศึกษารวม fraction จากสิ่งสกัด EtOAc ที่สามารถแยกได้ หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ CH ₂ Cl ₂ : Acetone 9.6 : 0.4	42
รูปที่ ก. 5 ผลการศึกษารวม fraction จาก fraction E8 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ CH ₂ Cl ₂ : Acetone 9 : 1	43
รูปที่ ก. 6 ผลการศึกษา TLC ได้จากการแยกสกัด E8 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ CH ₂ Cl ₂ : Acetone ในอัตราส่วน 9:1	43
รูปที่ ก. 7 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ fraction 7.2 ที่ได้จากการแยกสกัด E7 หลังจากสเปรย์ ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 1:1	44
รูปที่ ก. 8 ผลการศึกษา TLC ที่ได้จากการแยกสกัด E7.2 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 7:3 (1) fraction 1-46 (2) fraction 47- 64	44
รูปที่ ก. 9 ผลการศึกษา TLC ที่ได้จากการแยกสกัด E7.2.5 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 3:7 (1) fraction 1-18 (2) fraction 19-27 (3) fraction 28-36	45
รูปที่ ก. 10 ผลการศึกษา TLC จากสิ่งสกัด Acetone ที่สามารถแยกได้ หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 3:7	46
รูปที่ ก. 11 ผลการศึกษา TLC ที่ได้จากการแยกสกัด A6 และ A7 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 3:7 (1) fraction 1-19 (2) fraction 20-38	47

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.

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ ข. 1.1	แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS1 (acetone- d_6)	48
รูปที่ ข. 1.2	แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS1 (acetone- d_6)	49
รูปที่ ข. 2	แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS1 (acetone- d_6)	50
รูปที่ ข. 2.1	แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)	51
รูปที่ ข. 2.2	แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)	52
รูปที่ ข. 2.3	แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)	52
รูปที่ ข. 3	แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)	53
รูปที่ ข. 4	แสดง DEPT135 spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)	53
รูปที่ ข. 5.1	แสดง HMBC ของสาร TS2 (CDCl_3)	54
รูปที่ ข. 5.2	แสดง HMBC ของสาร TS2 (CDCl_3)	54
รูปที่ ข. 6.1	แสดง HMQC ของสาร TS2 (CDCl_3)	55
รูปที่ ข. 6.2	แสดง HMQC ของสาร TS2 (CDCl_3)	55
รูปที่ ข. 7.1	แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS3 ($\text{DMSO-}d_6$)	56
รูปที่ ข. 7.2	แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS3 ($\text{DMSO-}d_6$)	56



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.

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	ร้อยละ
°C	=	องศาเซลเซียส
CH ₂ Cl ₂	=	dichloromethane
cm	=	centimeter (เซนติเมตร)
DMSO	=	dimethylsulfoxide
EtOAc	=	ethyl acetate
EtOH	=	ethanol
g	=	gram (กรัม)
H ₂ O	=	น้ำ
kg	=	kilogram (กิโลกรัม)
MeOH	=	methanol
mg	=	milligram (มิลลิกรัม)
ml	=	milliliter (มิลลิลิตร)
nm	=	nanometer (นาโนเมตร)
TLC	=	thin layer chromatography
µg	=	microgram (ไมโครกรัม)
µl	=	microliter (ไมโครลิตร)
µm	=	micrometer (ไมโครเมตร)
UV	=	ultraviolet

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 ความเป็นมาและความสำคัญ

ชิงช้าสะแกราช (*Tinospora siamensis* Forman) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae ถูกค้นพบครั้งแรกโดยชาวเยอรมันชื่อ H. Benziger ที่อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา จึงได้รับการตั้งชื่อสปีชีส์ตามถิ่นที่ค้นพบนั่นคือประเทศไทย¹ โดยพืชในวงศ์นี้เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่พบการกระจายในแถบอเมริกาตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบพืชทั้งหมด 72 สกุล 520 ชนิด² ส่วนใหญ่เป็นไม้เถา (climber) และองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มหลักที่มีมักพบคือกลุ่ม alkaloids³ ในประเทศไทยมีการนำพืชในสกุล *Tinospora* มาใช้ในทางสมุนไพร เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น เถาบอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f.& Thomson) มีการรายงานว่า พบสารสำคัญ borapetoside C ในเถาบอระเพ็ด ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเบาหวานในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 โดยเพิ่มการนำกลูโคสไปใช้ประโยชน์ เพิ่มความไวรับต่อ insulin และทำให้ insulin resistance ซ้ำลง⁴ นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม alkaloids คือ columbamine ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cholinesterase⁵ และมีการใช้บอระเพ็ดในการรักษาความดันโลหิตสูง

จากการสืบค้นข้อมูลของคณะผู้วิจัยพบว่า ยังไม่มีการศึกษาที่รายงานถึงองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเถาชิงช้าสะแกราช และคณะผู้วิจัยได้มีการสำรวจพื้นที่ในบริเวณสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา โดยสามารถเก็บตัวอย่างเถาชิงช้าสะแกราช ซึ่งเป็นพืชพื้นถิ่นของประเทศไทยมาทำการศึกษาได้

คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะแยกสกัดสารบริสุทธิ์จากเถาชิงช้าสะแกราชเพื่อนำมาวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมี และนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้หลักการ bioassay-guided fractionation

1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดเถาชิงช้าสะแกราช ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี
- 2) เพื่อศึกษาหาฤทธิ์ทางชีวภาพของเถาชิงช้าสะแกราช
- 3) เพื่อศึกษาหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเถาชิงช้าสะแกราชโดยใช้วิธี bioassay-guided fractionation

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.

1.3 วิธีการดำเนินงานโดยย่อ

1) เก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชจากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีการตรวจสอบเอกลักษณ์และชื่อวิทยาศาสตร์ด้วยการเทียบลักษณะของตัวอย่างพืชกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่บรรยายไว้ในหนังสือไม้เลื้อยในป่าสะแกราช⁶

2) สกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

2.1) เตรียมสิ่งสกัดหยาบโดยการนำเถาซึ่งชำสะแกราชมาลดขนาด แล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร

2.2) แช่วสกัด โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำมาแช่วสกัดด้วยวิธี maceration โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย ส่วนที่สองนำมาแช่วสกัดด้วยวิธี partition โดยใช้ hexane, ethyl acetate, acetone และ methanol เป็นตัวทำละลายตามลำดับ

2.3) สกัดและแยกสารจนได้สารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค column chromatography (CC) และ thin layer chromatography (TLC)

2.4) วิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

3) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1) ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง โดยส่งสิ่งสกัด ethanol ของซึ่งชำสะแกราช ไปทดสอบฤทธิ์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ในการทดสอบและทำการทดสอบในเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ KB (oral cavity cancer), MCF7 (breast cancer cell) และ NCI-H187 (small cell lung cancer)

3.2) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* โดยส่งสิ่งสกัด ethanol และ acetone ของซึ่งชำสะแกราช ไปทดสอบฤทธิ์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ใช้วิธีในการทดสอบ คือ Greenfluorescent protein microplate assay (GEPMA)

3.3) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase โดยส่งสิ่งสกัด ethanol และ acetone ของซึ่งชำสะแกราช ไปทดสอบฤทธิ์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ใช้วิธีในการทดสอบ คือ Fluorometric determination (MUNANA-based enzyme inhibition assay)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

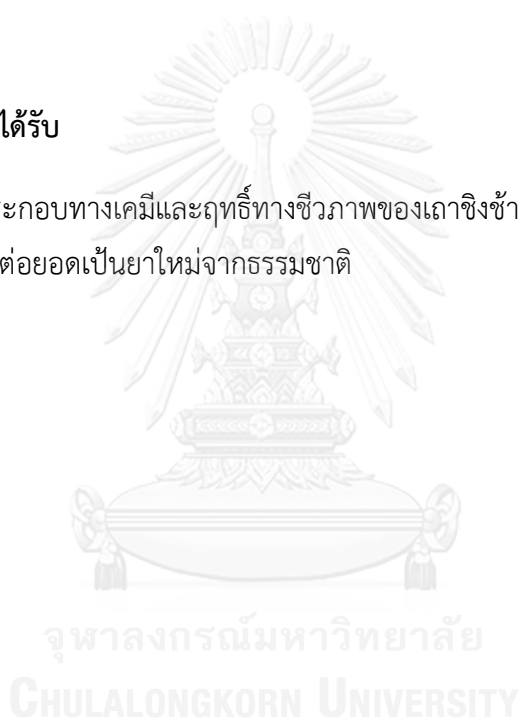
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- 3.4) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* โดยส่งสิ่งสกัด ethanol และ acetone ของชิงช้าสะแกราช ไปทดสอบฤทธิ์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ใช้วิธีในการทดสอบ คือ Resazurin Microplate assay (REMA)
- 3.5) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ตามวิธีการปฏิบัติในห้องทดลอง
- 4) วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี

วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเถาชิงช้าสะแกราช เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาพัฒนาต่อยอดเป็นยาใหม่จากธรรมชาติ



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

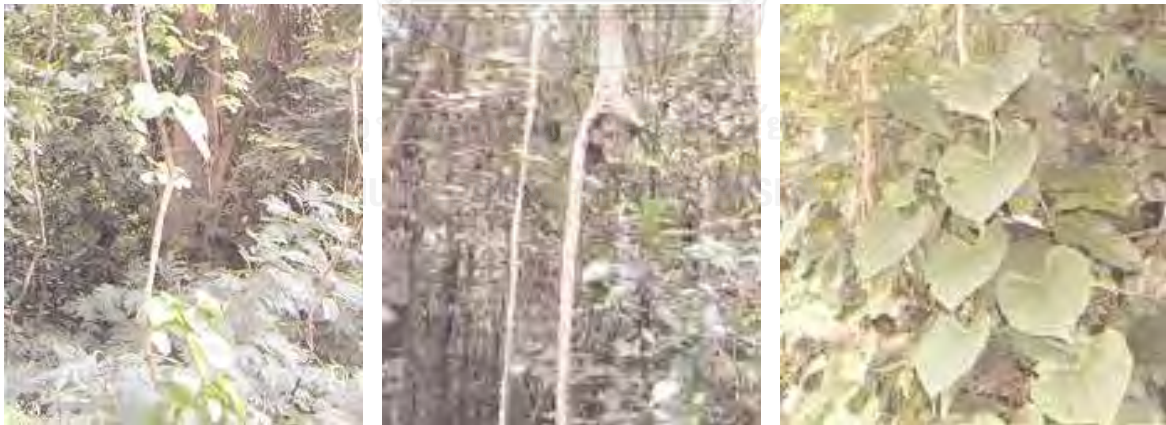
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 2

การปรีทรรศน์วรรณกรรม

2.1 ชิงช้าสะแกราช (*Tinospora siamensis* Forman)

ชิงช้าสะแกราช (*Tinospora siamensis* Forman) จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae เป็นไม้เถาเลื้อยพาดพันต้นไม้อื่น มีอายุยืนอยู่ได้หลายปี เลื้อยพันขึ้นไปได้ไกล 20-30 เมตร โคนเถามีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ได้ถึง 8 เซนติเมตร เถากลมเป็นปุ่มเล็กน้อย ทุกส่วนมีรสขม โดยเฉพาะเถาแก่ มีรากอากาศลักษณะคล้ายหางหนู เมื่อหยั่งลงสู่ดินจะทำหน้าที่ดูดน้ำ อาหาร เพื่อส่งไปเลี้ยงลำต้น แตกกิ่งและใบเฉพาะตรงยอดในส่วนที่มีแสงแดดส่องถึง ในส่วนของเถาที่อยู่ในที่ร่มจะเป็นเถาเดี่ยวๆ ยาวและไม่แตกกิ่งและใบ ใบกลมโตรูปหัวใจ กว้างและยาว 6-10 เซนติเมตร ด้านหลังใบใกล้กับฐานใบมีปุ่มเล็กๆ 2 ปุ่ม อยู่บนเส้นใบ ดอกสีเหลืองเป็นช่อเล็กๆ ออกตามซอกเถาและที่ซอกใบ ดอกบานทยอยเรียงจากโคนช่อดอกไปหาปลายช่อดอก ดอกย่อยมีขนาดเล็กมาก ไม่มีกลีบดอก ผลเป็นผลสดค่อนข้างกลม อยู่รวมกันเป็นช่อแน่น ผลอ่อนสีเขียว เมื่อสุกสีเหลือง มีขนาด 0.7-1 เซนติเมตร แต่ละผลมี 1 เมล็ด ผลแก่สีเหลืองเข้ม เปลือกอ่อนนิ่ม เป็นอาหารของนก จึงมีโอกาสรกระจายพันธุ์ได้โดยนกที่กินผลแล้วนำเมล็ดไปถ่ายมูล ออกเป็นต้นกล้ากระจายออกไปไกลจากต้นแม่พันธุ์ได้มากขึ้น ถิ่นที่อยู่พบขึ้นกระจายในป่าดิบแล้งในภาคกลาง ติดต่อกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในระดับความสูง 100-400 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล พบได้มากในเขตสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช⁶



รูปที่ 1 ต้นชิงช้าสะแกราชในธรรมชาติ⁷

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.

การที่ได้ชื่อว่าชิงช้าสะแกราช เนื่องจากมีเถาเลื้อยห้อยระยงระยงไปตามต้นไม้ใหญ่ มองดูคล้ายกับเป็นชิงช้า แต่ในความเป็นจริงแล้วเถาเลื้อยของชิงช้าสะแกราชมีขนาดเล็ก และไม่มีความเหนียวแข็งแรงพอที่จะให้คนหรือลิงเกาะยึดห้อยโหนได้

ส่วนต่างๆ ของต้นชิงช้าสะแกราชไม่ว่าจะเป็นเถา ใบ ช่อดอก ดอกย่อย และผล จะมีลักษณะใกล้เคียงกับชิงช้าชาลี (*T. baenzigeri* Foran) เพียงแต่ชิงช้าสะแกราชไม่ค่อยพบการกระจายพันธุ์ในเขตอื่นๆ ของประเทศไทย แต่จะพบได้มากในบริเวณป่าสะแกราช ซึ่งในประเทศไทยพบการรายงานถึงพืชในสกุล *Tinospora* ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ ชิงช้าชาลี (*T. baenzigeri* Foran), บอระเพ็ด [*T. crispa* (L.) Miers ex Hook. f. & Thomson], ปังกะลิง [*T. sinensis* (Lour.) Merr] และ ชิงช้าสะแกราช (*T. siamensis* Foran)⁸

ชิงช้าสะแกราชเป็นพรรณไม้ป่าที่ยังไม่มีการนำมาปลูกเพื่อการใช้ประโยชน์ เพียงแต่มีการเก็บจากป่าเพื่อใช้ประโยชน์เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้าน เนื่องจากเถามีสขมเหมือนบอระเพ็ด จึงใช้เถาแทนเถาบอระเพ็ด ใช้แก้ไข้ บำรุงธาตุ ทำให้เจริญอาหาร

ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ของพืชในสกุล *Tinospora* ได้แก่ การใช้ *T. cordifolia* ในตำรายาอายุรเวทของอินเดีย พืชชนิดนี้ประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น alkaloids, diterpenoids, glycosides และ steroids สารสกัดของ *T. cordifolia* มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านมาลาเรีย ต้านภูมิแพ้ ต้านเบาหวาน ต้านฤทธิ์ที่ทำให้เกิดพิษต่อตับ รวมถึงมีฤทธิ์ในการปรับภูมิคุ้มกันด้วย⁹

กลุ่มสารสำคัญในพืชตระกูล *Tinospora* ที่เคยมีการรายงาน ได้แก่ terpenoids, alkaloids, flavonoids, lignans, steroids และสารอื่นๆ¹⁰

2.2 Bioassay-guided fractionation

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้น บางครั้งอาจทำให้มีข้อมูลจำนวนมาก ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณและเวลาในการวิจัยที่มากเกินไป ทำให้เกิดแนวคิดกระบวนการวิจัยด้วยหลักการ bioassay-guided fractionation ซึ่งใช้ในการวิจัยเพื่อหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์¹¹ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีในการแยกสกัดสาร และใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพในการเลือกส่วนสกัดเพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่เป็นตัวออกฤทธิ์ หลักการสำคัญคือทำการแยกสกัดสารออกเป็น fraction แล้วนำแต่ละ fraction ไปทดสอบหาฤทธิ์ที่ต้องการ จากนั้นจึงนำเฉพาะ fraction ที่มีฤทธิ์มาทำการแยกสกัดต่อควบคู่กับการทดสอบฤทธิ์ ทำเช่นนี้จนได้เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ที่ต้องการ

หลักการนี้จึงมีประโยชน์ในการหาค่าองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของตัวอย่างพืชที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน เสมือนว่าใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพในการค้นหาทางเพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ ส่งผลให้ใช้เวลาในการวิจัยที่สั้นลง และใช้ค่าใช้จ่ายอย่างคุ้มค่า

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.

2.3 Alpha – glucosidase inhibitors (AGIs)

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นภาวะที่ร่างกายมีน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติเกิดจากการขาดฮอร์โมน insulin หรือจากการดื้อต่อฤทธิ์ของ insulin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ผลิตจากตับอ่อน ทำให้ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลในเลือดไปใช้ได้ตามปกติ น้ำตาลในเลือดที่สูงอยู่เป็นระยะเวลานานทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนเกี่ยวกับหลอดเลือดของอวัยวะต่างๆ เช่น ตา ไต ระบบประสาท โรคหลอดเลือดหัวใจ ในคนปกติในระยะเวลาที่ไม่ได้รับประทานอาหาร ตับจะมีการสร้างน้ำตาลออกมาตลอดเวลาเพื่อให้เป็นอาหารของสมองและอวัยวะอื่นๆ ในระยะหลังรับประทานอาหารจำพวกแป้งจะมีการย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดระดับน้ำตาลที่สูงขึ้นจะกระตุ้นให้มีการหลั่ง insulin จากตับอ่อนเพื่อเพิ่มการนำน้ำตาลไปใช้ทำให้ระดับน้ำตาลลดลงมา เป็นปกติ ในผู้ป่วยเบาหวานที่อาจเกิดจากการขาดหรือดื้อต่อฤทธิ์ของ insulin ทำให้ไม่สามารถใช้น้ำตาลได้ ขณะเดียวกันมีการย่อยสลายไขมันและโปรตีนในเนื้อเยื่อมาสร้างเป็นน้ำตาลมากขึ้น ทำให้มีน้ำตาลในเลือดสูง จนล้นออกมาทางไตและมีน้ำตาลในปัสสาวะ¹²

International Diabetes Federation มีการรายงานว่ามีผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มากกว่า 382 ล้านคน ทั่วโลกในปี ค.ศ. 2013 และคาดว่าจะเพิ่มเป็นมากกว่า 592 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2035 ซึ่งโรคเบาหวานเป็นสาเหตุหลักของการตายของคนทั่วโลก¹³

Alpha – glucosidase inhibitors (AGIs) สามารถลดระดับ postprandial blood glucose โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha – glucosidase ส่งผลให้เกิดการลดการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสโลหิต เนื่องจากเอนไซม์ alpha – glucosidase ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ด้วยปฏิกิริยา Hydrolysis โดยจะตัดพันธะ alpha-glycosidic ของน้ำตาลโมเลกุลคู่ ทำให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตได้ ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ alpha – glucosidase จึงมีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวาน

ยาที่ออกฤทธิ์เป็น alpha – glucosidase inhibitors ที่มีการใช้ในปัจจุบันได้แก่ Acarbose, Voglibose และ Miglitol¹³

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

วัสดุและวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. Erlenmeyer flask ขนาด 250, 500 และ 1000 ml
2. Stirring rod
3. Column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1, 2.5 นิ้ว
4. Dropper
5. Round bottom flask ขนาด 1000 ml
6. TLC tank
7. TLC silica gel
8. Aluminium foil
9. Cylinder ขนาด 10, 50, 100 และ 200 ml
10. Beaker ขนาด 50, 100, 250 และ 1000 ml
11. Forceps
12. Capillary tube
13. ขวดรับ fraction
14. สำลี
15. กระดาษกรอง
16. volumetric flask ขนาด 10 และ 50 ml
17. plate สำหรับการทดสอบ alpha-glucosidase inhibitory activity
18. Microtube
19. Stainless steel tank
20. เครื่องบดสมุนไพร
21. Vacuum pump
22. Micropipette ขนาด 2-20, 20-200 และ 100 – 1000 μ l
23. เครื่องกลั่น Solvent
24. Desicator
25. เครื่องชั่งตวงวัด 2 และ 4 ตำแหน่ง
26. เครื่อง rotary evaporator
27. ตู้สำหรับส่องด้วยแสง UV

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.

28. กล้องถ่ายรูป
29. Sonicator
30. NMR Spectrophotometer
31. pH meter
32. เครื่อง microplate reader
33. incubator
34. Hot plate

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. silica gel ขนาด 0.040 – 0.063 mm
2. Sephadex LH 20
3. hexane
4. dichloromethane
5. ethyl acetate
6. acetone
7. methanol
8. anisaldehyde solution
9. dimethyl sulfoxide (DMSO)
10. phosphate buffer
11. sodium carbonate
12. α -glucosidase enzyme
13. PNP-G (p-nitrophenyl alpha-D-glucoside)
14. Acarbose
15. DI water
16. chloroform-d
17. acetone-d₆



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.

3.3 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัย

เถาชิงช้าสะแกราช (*T. siamensis* Forman) จากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา



รูปที่ 2 เถาของชิงช้าสะแกราชที่ลดขนาดแล้ว

3.4 วิธีการศึกษา

3.4.1 การเก็บตัวอย่างพืช

ตัวอย่างเถาชิงช้าสะแกราช (*T. siamensis* Forman) ได้มาจากการเก็บในสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีการตรวจสอบความถูกต้องของชื่อวิทยาศาสตร์ โดยการเทียบลักษณะของตัวอย่างพืชกับลักษณะของพืชที่บรรยายไว้ในหนังสือไม้เลื้อยในป่าสะแกราช⁶ ซึ่งจัดทำขึ้นโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยลักษณะเด่นของชิงช้าสะแกราชที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ คือ เป็นไม้เลื้อย เถามีลักษณะกลมเป็นปุ่มเล็กน้อย ใบเป็นรูปหัวใจ กว้างและยาว 6 – 10 เซนติเมตร ดอกสีเหลืองเป็นช่อเล็กๆ ออกตามซอกเถาและซอกใบ ดอกย่อยมีขนาดเล็กมาก ไม่มีกลีบดอก

3.4.2 การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

3.4.2.1 การเตรียมลิ่งสกัดหยาบ

นำเถาชิงช้าสะแกราชมาลดขนาด แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 50°C ได้น้ำหนักแห้ง 3.58 kg จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดสมุนไพร แบ่งการแช่สกัดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใช้เถาชิงช้าสะแกราชน้ำหนัก 500 g นำมาแช่สกัดด้วยวิธี

**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.

maceration โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย สำหรับส่วนที่สอง ใช้เอทิลซีสเทอรัล 3.08 kg นำมาแช่สกัดด้วยวิธี partition โดยใช้ hexane, ethyl acetate, acetone และ methanol เป็นตัวทำละลายตามลำดับ

เริ่มจากการนำเอทิลซีสเทอรัลที่บดละเอียดแล้วใส่ลงใน stainless steel tank เติมน้ำ hexane ลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไขเก็บสารละลาย hexane ไขจากนั้นแช่ด้วย hexane ทำซ้ำด้วยวิธีข้างต้นอีก 1 ครั้ง จากนั้นทำตามวิธีเดิม แต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น ethyl acetate, acetone และ methanol ตามลำดับ นำสารละลาย hexane, ethyl acetate, acetone และ methanol มาทำการระเหยแห้งเพื่อนำตัวทำละลายออกไปภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นชั่งน้ำหนักสิ่งสกัดหยาบ ได้น้ำหนักสิ่งสกัดหยาบดังตารางที่ 1

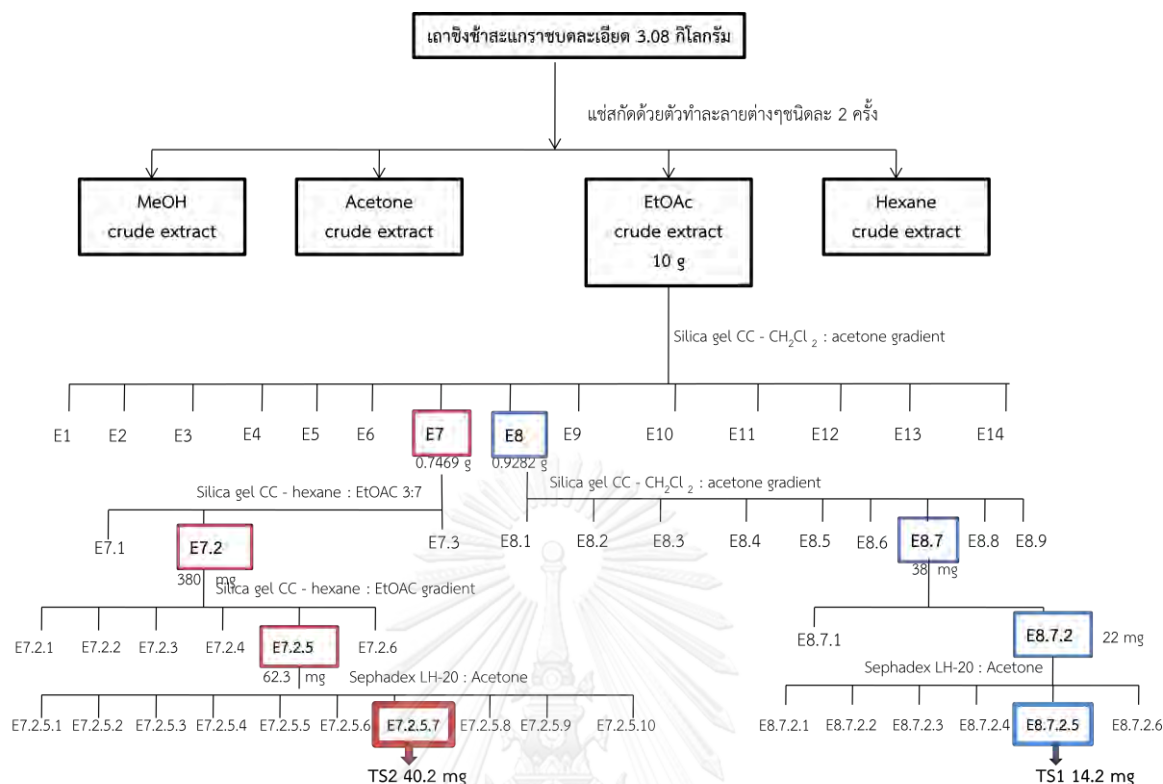
ตารางที่ 1 น้ำหนักของสิ่งสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	น้ำหนัก (g) ของสิ่งสกัดหยาบ
hexane	19.77
ethyl acetate	13.52
acetone	37.54
methanol	82.03

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.

3.4.2.2 การสกัดและแยกสาร TS1 (Naringenin) ให้บริสุทธิ์



รูปที่ 3 ขั้นตอนการแยกสกัดสาร TS1 และ TS2

แยกสาร TS1 ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค column chromatography (CC) และ thin layer chromatography (TLC) โดยแบ่งสิ่งสกัด ethyl acetate มาลงคอลัมน์ ครั้งละ 5 g จำนวน 2 ครั้ง โดยใช้ silica gel ความสูง 20 cm เมื่อใช้คอลัมน์ขนาด 2.5 นิ้ว เป็น stationary phase และใช้ dichloromethane และ acetone ในอัตราส่วน 12:1, 8:1 และ 4:1 ตามลำดับ เป็น mobile phase เก็บส่วนสกัดปริมาตร 50 ml จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ thin layer chromatography โดยใช้ mobile phase คือ dichloromethane และ acetone ในอัตราส่วน 12:1 และ 6:4 จากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้ UV ที่มีความยาวคลื่น 254 และ 365 nm ฟันแผ่น TLC ด้วย anisaldehyde solution และนำ fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันรวมไว้ด้วยกัน ได้ fraction ทั้งหมด 14 fraction (E1-E14) ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกัน

จากนั้น นำ fraction E8 ซึ่งมีน้ำหนัก 0.9282 g มาทำการสกัดแยกต่อโดยใช้เทคนิค CC โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว และความสูงของ silica gel 20

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

cm โดยมี mobile phase คือ dichloromethane และ acetone โดยใช้อัตราส่วน 10:0, 9:1, 8.5:1.5 และ 8:2 ตามลำดับ และเก็บส่วนสกัดที่ผ่านคอลัมน์ครั้งละ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปประเหยแห้งและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ mobile phase ในการทำ TLC คือ dichloromethane และ acetone ในอัตราส่วน 9:1 สามารถรวม fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันได้ 9 fraction (E8.1 – E8.9)

นำ fraction E8.7 ซึ่งมีน้ำหนัก 38 mg มาผ่าน CC โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว บรรจุ silica gel ให้มีความสูงของ silica gel ประมาณ 10 cm และใช้ mobile phase คือ hexane และ acetone โดยใช้อัตราส่วน 7:3 ตามลำดับ และเก็บส่วนสกัดที่ผ่านคอลัมน์ครั้งละ 5 ml จากนั้นนำไปประเหยแห้งและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ TLC ที่ใช้ mobile phase ในการทำ TLC คือ dichloromethane และ acetone ในอัตราส่วน 9:1 สามารถรวม fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันได้ 2 fraction (E8.7.1 และ E8.7.2)

นำ fraction E8.7.2 ซึ่งมีน้ำหนัก 22 mg มาผ่าน CC โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว ใช้ Sephadex LH-20 เป็น stationary phase และใช้ acetone เป็น mobile phase เก็บส่วนสกัดที่ผ่านคอลัมน์ลงขวดเก็บ fraction ขวดละ 5 ml จากนั้นนำไปประเหยแห้ง และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้ mobile phase ในการทำ TLC คือ dichloromethane และ methanol ในอัตราส่วน 0.99:0.01 ได้ fraction ทั้งหมด 58 fraction และสามารถรวม fraction ได้ 6 fraction (E8.7.2.1 – E8.7.2.6) ได้ fraction ที่มีความบริสุทธิ์ได้แก่ fraction E8.7.2.5 (TS1) ซึ่งนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR spectroscopy

3.4.2.3 การสกัดและแยกสาร TS2 [15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide] ให้บริสุทธิ์

แยกสาร TS2 ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค CC และ TLC โดยนำ fraction E7 ซึ่งมีน้ำหนัก 0.7469 g ที่ได้จากการแยกสกัดสิ่งสกัด ethyl acetate มาทำการแยกต่อ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว มี silica gel ความสูง 15 cm เป็น stationary phase และมี hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 3:7 เป็น mobile phase เก็บส่วนสกัดที่ผ่านคอลัมน์ครั้งละ 20 ml จากนั้นนำไปประเหยแห้งและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้ mobile phase ในการทำ TLC คือ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 3:7 ได้ fraction ทั้งหมด 43 fraction และสามารถรวม fraction ได้ 3 fraction (E7.1 – E7.3)

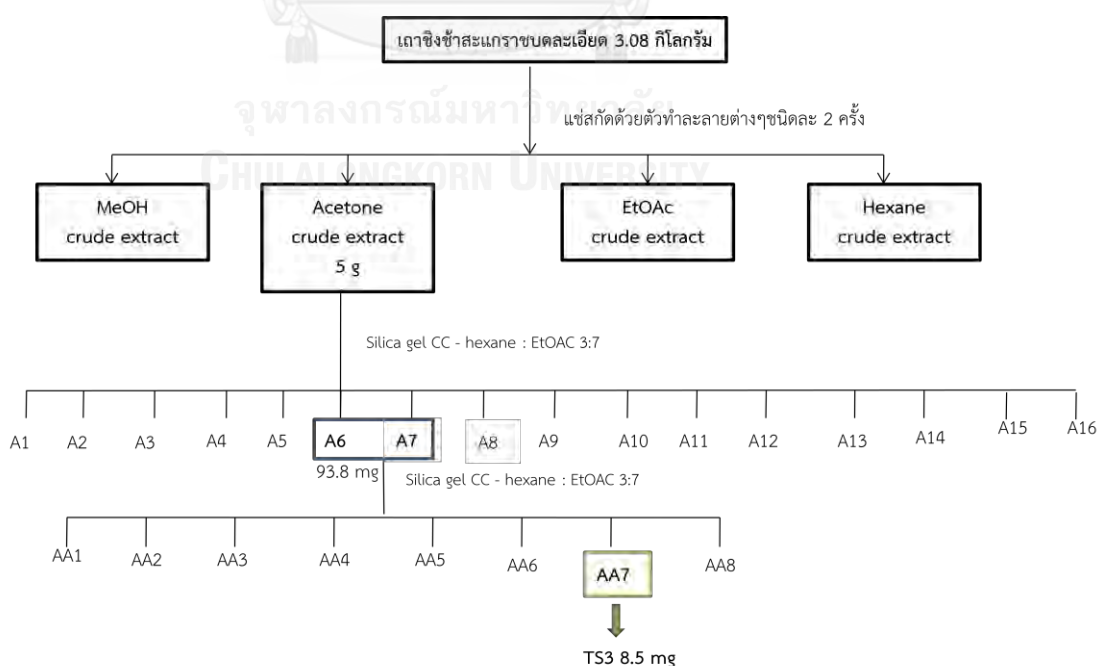
**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

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

นำ fraction E7.2 ซึ่งมีน้ำหนัก 380 mg มาแยกต่อ โดยใช้เทคนิค CC ซึ่งใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว มี silica gel ความสูง 15 cm เป็น stationary phase และมี hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 7:3, 1:1 และ 3:7 ตามลำดับ เป็น mobile phase เก็บส่วนสกัดที่ผ่านคอลัมน์ครั้งละ 20 ml จากนั้นนำไปประเหยแห้งและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้ mobile phase ในการทำ TLC คือ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 7:3 ได้ fraction ทั้งหมด 71 fraction และสามารถรวม fraction ได้ 6 fraction (E7.2.1 – E7.2.6)

นำ fraction E7.2.5 ซึ่งมีน้ำหนัก 62.3 mg มาแยกต่อ โดยใช้เทคนิค CC ผ่านซึ่งใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว มี Sephadex LH-20 เป็น stationary phase และมี acetone เป็น mobile phase เก็บส่วนสกัดที่ผ่านคอลัมน์ครั้งละ 5 ml จากนั้นนำไปประเหยแห้งและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้ mobile phase ในการทำ TLC คือ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 7:3 ได้ fraction ทั้งหมด 40 fraction และสามารถรวม fraction ได้ 10 fraction (E7.2.5.1 – E7.2.5.10) ได้ fraction ที่มีความบริสุทธิ์ได้แก่ fraction E7.2.5.7 (TS2) ซึ่งนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR spectroscopy

3.4.2.2 การสกัดและแยกสาร TS3



รูปที่ 4 ขั้นตอนในการแยกสกัดสาร TS3

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.

แยกสาร TS3 ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค CC และ TLC โดยใช้สิ่งสกัด acetone มาลงคอลัมน์ 5 g โดยคอลัมน์มีขนาด 2.5 นิ้ว ใช้ silica gel ความสูง 20 cm เป็น stationary phase และใช้ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 3:7 เป็น mobile phase เก็บส่วนสกัดปริมาตร 50 ml จากนั้นนำไประเหยแห้ง และตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้ mobile phase ในการทำ TLC คือ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 3:7 และนำ fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันรวมไว้ด้วยกัน ในการแยกสกัดได้ fraction ทั้งหมด 16 fraction (A1-A16) ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกัน

จากนั้น นำ fraction A6 และ A7 มาทำการสกัดแยกต่อโดยใช้เทคนิค CC โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว และความสูงของ silica gel 15 cm โดยมี mobile phase คือ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 3:7 และเก็บส่วนสกัดที่ผ่านคอลัมน์ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไประเหยแห้งและตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ mobile phase ในการทำ TLC คือ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 3:7 สามารถรวม fraction ที่มีลักษณะเหมือนกันได้ 8 fraction (AA1- AA8) ได้ fraction ที่มีค่อนข้างมีความบริสุทธิ์ได้แก่ fraction AA7 (TS3) ซึ่งมีน้ำหนัก 8.5 mg ซึ่งนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR spectroscopy

3.4.4 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค NMR

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ TS1, TS2 และ TS3 มาละลายใน NMR solvent คือ CDCl_3 , acetone- d_6 และ acetone- d_6 ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ผลด้วย $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D-NMR โดยใช้เครื่อง NMR (300 Hz) และเปรียบเทียบกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

3.4.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.5.1 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองเป็นการคัดกรองหาสารเพื่อพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งต่อไป โดยในงานวิจัยนี้ได้ส่งสิ่งสกัด ethanol ของชิงช้าสะแกราชไปทดสอบฤทธิ์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ในการทดสอบและทำการทดสอบในเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ KB (oral cavity cancer), MCF7 (breast cancer cell) และ NCI-H187 (small cell lung cancer)

เป็นข้อมูลเพิ่มเติมของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

cancer) โดยมี Ellipticine และ Doxorubicin เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อ oral cavity cancer และ small cell lung cancer สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ breast cancer cell จะใช้ Doxorubicin และ Tamoxifen เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) และใช้ 0.5% DMSO เป็นสารควบคุมผลลบ (negative control) และใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัด ethanol คือ 50 µg/ml

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ใช้วิธี Resazurin Microplate assay (REMA) มีวิธีการทดสอบดังนี้¹⁴

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารและสภาวะแวดล้อมที่มีความเหมาะสม นำเซลล์มาละลายในสารละลายที่มีความเหมาะสม และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เหมาะสมกับการทดสอบ
2. นำสารแขวนลอยของเซลล์ปริมาตร 45 µl และสารที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 5 µl เติมลงใน 384-well microplates จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลาที่มีความเหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิด
3. เติมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 62.5 µg/ml ปริมาตร 10 µl ลงไปในแต่ละหลุมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
4. วัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ความยาวคลื่นการกระตุ้น (excitation) และการปลดปล่อย (emission) เท่ากับ 530 และ 590 nm ตามลำดับ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตได้จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{F(\text{test})}{F(\text{control})} \times 100$$

เมื่อ F (test) และ F (control) คือ ค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากสภาวะที่เติมและไม่ได้เติมสารตามลำดับ

และคำนวณค่า IC₅₀ จากกราฟการตอบสนองต่อขนาดสารที่ให้ (Dose response curve) โดยเตรียมสารตัวอย่าง 6 ความเข้มข้นจากการเจือจางสารตัวอย่างครั้งละ 2 เท่า

3.4.5.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis*

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* เป็นการคัดกรองหาสารเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาวัณโรคต่อไป โดยในงานวิจัยนี้ได้ส่งสิ่งสกัด ethanol และ acetone ของชิงช้าสะแกราชไปทดสอบฤทธิ์ที่ไบโเทค

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.

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* ใช้วิธีในการทดสอบคือ Greenfluorescent protein microplate assay (GEPMA) โดยมี Isoniazid และ Ethambutol เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) และ 0.5% DMSO เป็น สารควบคุมผลลบ (negative control) และอ่านค่าโดย microplate reader (SynergyMX) ซึ่งใช้ *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇Ra และใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัด ethanol และ acetone คือ 50 µg/ml

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* โดยใช้วิธี Green fluorescent protein microplate assay (GEPMA) มีวิธีการทดสอบดังนี้¹⁵

1. นำ *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇Ra มาละลายและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ใน 7H9GC broth ที่ผสม tween 80 และ kanamycin 30 µg/ml จนมี optical density ที่ 550 nm เท่ากับ 0.4 - 0.5
2. นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาละลายใน DMSO จากนั้นเติมลงในหลุมทดลองของ 96-well microplates และ dilute ให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการด้วย 7H9GC broth ที่ไม่ได้ผสม tween 80 ปริมาตร 0.1 ml
3. dilute *Mycobacterium tuberculosis* ด้วย 7H9GC broth และเติมลงไป ในหลุม โดยให้มีความหนาแน่นของแบคทีเรียครั้งสุดท้าย คือ 5×10^5 CFU/ml
4. วัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ความยาวคลื่นการกระตุ้น (excitation) และการปลดปล่อย (emission) เท่ากับ 485 และ 508 นาโนเมตร ตามลำดับ ทุกวันเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตได้จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{F(\text{test})}{F(\text{control})} \times 100$$

เมื่อ F (test) และ F (control) คือ ค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากสถานะที่เติมและไม่ได้เติมสารตามลำดับ

และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC)

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.

3.4.5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase (NA) เป็นการคัดกรองหาสาร เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาไข้หวัดใหญ่ต่อไป โดยในงานวิจัยนี้ได้ส่งสิ่งสกัด ethanol และ acetone ของชิงช้าสะแกราชไปทดสอบฤทธิ์ที่ไบโอเทค

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase ใช้วิธีในการทดสอบ คือ Fluorometric determination (MUNANA-based enzyme inhibition assay) โดยมี Oseltamivir carboxylate เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) และ 1% DMSO เป็น สารควบคุมผลลบ (negative control) และใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัด ethanol และ acetone คือ 100 µg/ml

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง Neuraminidase โดยใช้วิธี Fluorometric determination (MUNANA-based enzyme inhibition assay) มีวิธีการทดสอบดังนี้¹⁶

1. ใส่ NA (8.33 µg/mL) 5 µl ผสมกับ 4- MUNANA (0.2 mM) ปริมาตร 10 µl และ sodium acetate buffer (50 mM, pH 3.5) 85 µL ลงใน 96-well microplates สีดำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที
2. เติม glycine-NaOH stop buffer (0.15 M, pH 10.4) ปริมาตร 100 µl ซึ่งปฏิกิริยาจะถูกหยุด
3. วัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์โดยใช้ความยาวคลื่นการกระตุ้น (excitation) และการปลดปล่อย (emission) เท่ากับ 355 และ 460 nm ตามลำดับ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเอนไซม์ได้จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{F(\text{test})}{F(\text{control})} \times 100$$

เมื่อ F (test) และ F (control) คือ ค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากสถานะที่เติมและไม่ได้เติมสารตามลำดับ

และคำนวณค่า IC₅₀

3.4.5.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans*

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* เป็นการคัดกรองหาสารเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาการติดเชื้อราต่อไป โดยในงานวิจัยนี้ได้ส่งสิ่งสกัด ethanol และ acetone ของชิงช้าสะแกราชไปทดสอบฤทธิ์ที่ไบโอเทค

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.

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ใช้วิธีในการทดสอบ คือ Resazurin Microplate assay (REMA) โดยมี Amphotericin B เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) และ 0.5% DMSO เป็น สารควบคุมผลลบ (negative control) และใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัด ethanol และ acetone คือ 50 µg/ml

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* โดยใช้ Resazurin Microplate assay (REMA) มีวิธีการทดสอบดังนี้¹⁷

5. เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารและสภาวะแวดล้อมที่มีความเหมาะสม นำเซลล์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยว 3-5 โคโลนี มาละลายในสารละลายที่มีความเหมาะสม และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เหมาะสมกับการทดสอบ
6. นำสารแขวนลอยของเซลล์ปริมาตร 45 µl และสารที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 5 µl เติมลงใน 384-well microplates จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C
7. เติมสารละลาย resazurin ความเข้มข้น 62.5 µg/ml ปริมาตร 10 µl ลงไปในแต่ละหลุมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
8. วัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ความยาวคลื่นการกระตุ้น (excitation) และการปลดปล่อย (emission) เท่ากับ 530 และ 590 nm ตามลำดับ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเอนไซม์ได้จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{F(\text{test})}{F(\text{control})} \times 100$$

เมื่อ F (test) และ F (control) คือ ค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากสถานะที่เติมและไม่ได้เติมสารตามลำดับ

และคำนวณค่า IC₅₀ จากกราฟการตอบสนองต่อขนาดสารที่ให้ (Dose response curve) โดยเตรียมสารตัวอย่าง 6 ความเข้มข้นจากการเจือจางสารตัวอย่างครั้งละ 2 เท่า

3.4.5.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase เป็นการคัดกรองหาสารเพื่อพัฒนาเป็นยารักษาการเบาหวานต่อไป โดยใช้ Acarbose เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) และใช้ 50% DMSO เป็นสารควบคุมผลลบ (negative control)

โดยใส่สารผสมในปฏิกิริยา คือ สาร TS1 และ TS2 ความเข้มข้น 20, 10, 5 และ 2.5 mg/ml ปริมาตร 10 µl เอนไซม์ α -glucosidase (0.1 U/ml) และ phosphate buffer (0.1 M, pH 6.80 ลงใน 96-well microtiter plates จากนั้นนำไป pre-บดคัตัวอย่างและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

incubation ที่อุณหภูมิ 37.6°C เป็นเวลา 10 นาที และใส่ PNP-G (p-nitrophenyl alpha-D-glucoside; 2mM) 50 μ l เพื่อใช้เป็น substrate ของเอนไซม์ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37.6°C เป็นเวลา 20 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย sodium carbonate (1M) ปริมาตร 100 μ l วัดสีเหลืองที่เกิดขึ้นจาก p-nitrophenol โดยนำ 96-well microtiter plates ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นคำนวณ %inhibition จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{Absorbance (control) - Absorbance (sample)}{Absorbance (control)} \times 100$$

และคำนวณค่า IC₅₀



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

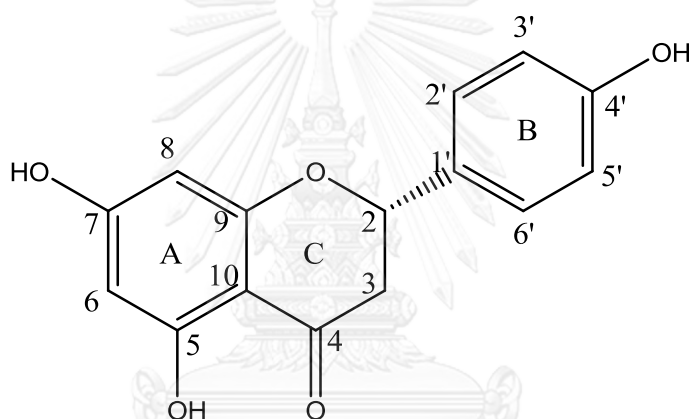
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy

เมื่อนำเอาของซึ่งเข้าสะแกราขมาแช่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และนำสารสกัดที่ได้ไปผ่านกระบวนการแยกสกัดด้วยวิธี column chromatography คณะผู้วิจัยสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 2 ชนิด คือ สารกลุ่ม flavonoids 1 ชนิด (สาร TS1) และสารกลุ่ม diterpenoids 1 ชนิด (สาร TS2)

4.1.1.1 สาร TS1



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Naringenin¹⁸

จากการศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีของ TS1 พบว่าลักษณะทางภายนอกเป็นสีน้ำตาลอ่อนมีปริมาณทั้งหมดที่สกัดแยกได้ 14.2 mg (คิดเป็น yield = 0.0006% จากน้ำหนักพืชแห้ง) และเมื่อส่องด้วย UV ที่ 364 nm จะพบจุด quenching นอกจากนี้เมื่อนำไปพ่นด้วย anisaldehyde reagent และให้ความร้อนจะพบจุดสีม่วงเกิดขึ้น ซึ่งสันนิษฐานว่าสาร TS1 เป็นสารกลุ่ม flavonoid derivative

จากข้อมูล ¹H-NMR spectrum ของ TS1 โดยใช้ตัวทำละลาย acetone-d₆ พบ peak ของ 3 hydroxyl groups และ 6 aromatic protons ซึ่งบริเวณ 12 ppm ตรงตำแหน่งที่ 5 เป็นส่วน hydroxyl groups เนื่องจากอยู่บริเวณ downfield และบริเวณตำแหน่งที่ 4 เป็นส่วน carbonyl group ซึ่งเกิดพันธะ intramolecular hydrogen กับ hydroxyl groups ที่ตำแหน่งที่ 5 รวมไปถึงโปรตอนตำแหน่งที่ 7 และ 9 จะมีค่า chemical shift ที่สูงเพราะอยู่ใกล้กับออกซิเจน นอกจากนี้ตำแหน่งของโปรตอนตำแหน่งที่ 6 และ 8 เกิด meta-coupling กัน ในบริเวณ ring B จะมีความสมมาตรกันของโปรตอนตำแหน่ง 2' และ 6'

บทความย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (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.

จากข้อมูล ^{13}C -NMR spectrum ของ TS1 ให้ทั้งหมด 15 peak จึงสรุปได้ว่าจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างทั้งหมดมี 15 ตัว ซึ่งมีลักษณะเช่นเกี่ยวกับโครงสร้างพื้นฐานของกลุ่ม flavonol และค่า chemical shift ที่มีค่ามากที่สุดคือ 197.3 ppm ซึ่งคาดว่าเป็น carbonyl group ของ flavonol (C-4) ซึ่งเราสามารถบอกได้ว่าโครงสร้างดังกล่าวจัดเป็น flavanone เพราะบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เป็น CH_2 และตำแหน่งที่ 3 เป็น CH ซึ่งต่อกับออกซิเจนทำให้ค่า chemical shift สูงกว่าคาร์บอนปกติ

ตารางที่ 2 ^1H -NMR spectrum และ ^{13}C -NMR spectrum ของ TS1

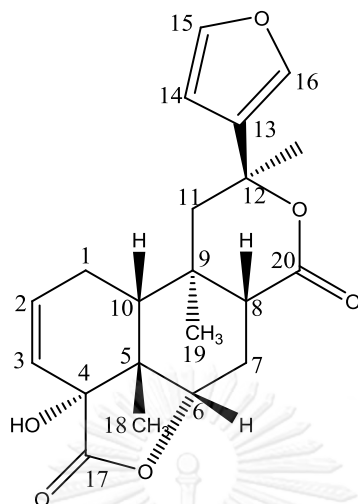
Position	TS1 (acetone-d ₆)	
	^1H (mult., J Hz)	^{13}C
2	5.45 (dd, J=12.9,2.7 Hz)	79.9
3	2.72 (dd, J=17.1,2.7 Hz)	43.5
	3.18 (dd, J=17.1,12.9 Hz)	43.5
4	-	197.3
5	12.18 (s)	165.3
6	5.94 (brs)	96.7
7	-	167.3
8	5.94 (brs)	95.8
9	-	164.4
10	-	103.1
1'	-	130.8
2'	7.39 (d, J=8.4 Hz)	129
3'	6.89 (d, J=8.4Hz)	116.1
4'	-	158.7
5'	6.89 (d, J=8.4 Hz)	116.1
6'	7.39 (d, J=8.4 Hz)	129

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นจึงสรุปได้ว่าโครงสร้างของสาร TS1 เป็นสาร naringenin

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.

4.1.1.2 สาร TS2



รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ 15, 16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide¹⁸

จากการศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีของ TS2 พบว่าลักษณะทางภายนอกเป็นสีเหลือง มีปริมาณทั้งหมดที่สกัดแยกได้ 40.2 mg (คิดเป็น yield = 0.0018% จากน้ำหนักพืชแห้ง) และเมื่อส่องด้วย UV ที่ 364 nm จะพบจุด quenching นอกจากนี้เมื่อนำไปพ่นด้วย anisaldehyde reagent และให้ความร้อนจะพบจุดสีชมพูเกิดขึ้น ซึ่งสันนิษฐานว่าสาร TS2 เป็นสารกลุ่ม diterpenoid derivative

จากการสืบค้นงานวิจัยเกี่ยวกับพืชสกุล *Tinospora* พบว่ามีสารกลุ่ม diterpenoids เป็นสารสำคัญอยู่หลายตัว และมีรายงานพบว่าเป็น diterpenoids กลุ่ม clerodane¹⁹

จากข้อมูล ¹H-NMR spectrum และ ¹³C-NMR spectrum โดยใช้ตัวทำละลาย CDCl₃ ของ TS2 ลักษณะร่วมที่เป็นลักษณะเฉพาะที่บ่งบอกว่าโครงสร้างดังกล่าวเป็น furan ring และ lactone ring หรือจะเรียกว่า furanolactone ซึ่งดูได้จากโปรตอนตำแหน่ง 14, 15 และ 16 จะเกิดการ coupling กัน และคาร์บอนที่ตำแหน่ง 12 บ่งบอกว่าคาร์บอนอยู่ใกล้กับ heteroatom ในที่นี้คือออกซิเจนและคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 และ 20 เป็นตำแหน่งของ carbonyl group บริเวณของโปรตอนตำแหน่ง 2 และ 3 เกิดการ coupling กันแสดงให้เห็นว่าบริเวณนั้นเป็นบริเวณพันธะคู่ และคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 6 มีค่า chemical shift ที่สูงแสดงให้เห็นว่าบริเวณตำแหน่งที่ 4 เป็นส่วนที่ต่อกับ heteroatom ในที่นี้คือ OH group และตำแหน่งที่ 6 ต่อกับ heteroatom ในที่นี้คือออกซิเจน นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ ¹H กับ ¹³C

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.

ด้วยวิธี HMBC พบว่ามีความสัมพันธ์กันดังตารางที่ 3 ซึ่งเป็นโครงสร้างของ 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide¹⁸

ตารางที่ 3 ¹H-NMR spectrum และ ¹³C -NMR spectrum ของ TS2

Position	TS2 (CDCl ₃)		
	¹ H (mult., J Hz)	¹³ C	HMBC (¹ H→ ¹³ C)
1	2.06 (1H,m)	17.3	C-5
	2.65 (1H,m)	17.3	
2	6.45 (1H,dd, J=8.0,5.1 Hz)	128.7	C-4
3	6.34 (1H,dd, J=8.0,1.7 Hz)	136.8	C-6
4	-	80.5	-
5	-	37.1	-
6	5.14 (1H,d, J=5.1 Hz)	74.2	C-3 ,C-5 ,C-17
7	1.4 (1H,m)	25.6	C-8
	1.74 (1H,dd, J=14.4,8.1 Hz)	25.6	-
8	2.39 (1H,dd, J=10.8,2.0 Hz)	44.4	C-1 ,C-9 ,C-10 ,C-20
9	-	35.2	
10	1.72 (1H,brs)	47.5	C-5 ,C-11 ,C-18 ,C-19
11	1.93 (1H,dd, J=14.9,12.0 Hz)	41.8	C-8 ,C-9 ,C-10 ,C-12 ,C-13
	2.24 (1H,dd, J=14.9,4.5 Hz)	41.8	-
12	5.4 (1H,dd, J=12.0,4.5 Hz)	70.6	C-13 ,C-14 ,C-16
13	-	124.7	-
14	6.42 (1H,brs)	108.4	C-15 ,C-16
15	7.42 (1H,brs)	143.9	C-13 ,C-14 ,C-16
16	7.46 (1H,s)	139.6	C-13 ,C-14 ,C-15
17	-	175.5	-
18	1.04 (3H,s)	28.3	C-4 ,C-5 ,C-7 ,C-10
19	1.23 (3H,s)	24.3	C-8 ,C-9 ,C-10 ,C-11
20	-	173.4	-

จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นจึงสรุปได้ว่าโครงสร้างของสาร TS2 เป็นสาร 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide¹⁸

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.

4.1.1.3 สาร TS3

จากการศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีของ TS3 พบว่าลักษณะทางภายนอกเป็นสีเหลือง มีปริมาณทั้งหมดที่สกัดแยกได้ 8.5 mg (คิดเป็น yield = 0.0004% จากน้ำหนักพืชแห้ง) และเมื่อส่องด้วย UV ที่ 364 nm จะพบจุด quenching นอกจากนี้เมื่อนำไปพ่นด้วย anisaldehyde reagent และให้ความร้อนจะพบจุดสีม่วงเกิดขึ้น ซึ่งสันนิษฐานว่าสาร TS3 เป็นสารกลุ่ม flavonoid derivative

จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectrum และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของ TS3 พบว่ามีลักษณะของ peak ที่คาดว่าน่าจะเป็นสารกลุ่ม flavonoids สองตัวรวมกัน ซึ่งมีความเป็นขั้วใกล้เคียงกันมากทำให้ยังไม่สามารถแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์โครงสร้างของสาร TS3 ได้

4.1.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.1.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในสารสกัดหยาบเถาชิงช้าสะแกราช

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ KB-Oral cavity cancer cell, MCF7-breast cancer cell และ NCI-H187-Small cell lung cancer cell พบว่าสิ่งสกัด ethanol มีค่า % inhibition คือ 10.67%, -6.70% และ 3.79% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด โดยวิธีที่ใช้ทำการทดลองคือ Resazurin Microplate assay (REMA) ซึ่งในการทดลอง KB-Oral cavity cancer มี Ellipticine และ Doxorubicin เป็น positive control และ DMSO+cell เป็น negative control สำหรับ MCF7-breast cancer cell มี Tamoxifen และ Doxorubicin เป็น positive control และ DMSO+ cell เป็น negative control สุดท้ายคือ NCI-H187-Small cell lung cancer มี Ellipticine และ Doxorubicin เป็น positive control และ DMSO+ cell เป็น negative control

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 4 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด โดยใช้ สิ่งสกัด Ethanol ความเข้มข้น 50 µg/ml

ฤทธิ์ที่ส่งตรวจ	ชนิดเซลล์	ผล
Cytotoxic activity	Small cell lung cancer	Inactive (3.79% inhibition)
	Oral cavity cancer	Inactive (10.67% inhibition)
	Breast cancer	Inactive (-6.70% inhibition)

วิธีการแปลผล

%inhibition

Activity

< 90%

Inactive

≥ 90%

Active

4.1.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* ในสารสกัดหยาบ เถาชิงช้าสะแกราช

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* (Anti-TB) H₃₇Ra strain พบว่าสิ่งสกัด acetone และสิ่งสกัด ethanol มีค่า % inhibition คือ 72.21% และ 38.39% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าสิ่งสกัด acetone และ ethanol ของชิงช้าสะแกราชไม่มีฤทธิ์ต้าน *Mycobacterium tuberculosis* โดยวิธีที่ใช้ทำการทดลองคือ Green fluorescent protein microplate assay (GEPMA) อ่านค่าโดย microplate reader (SynergyMX) ซึ่งมี Isoniazid และ Ethambutol เป็น positive control และ DMSO+Enzymebuffer+substrate เป็น negative control

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 5 แสดงผล Anti-*Mycobacterium tuberculosis* (Anti-TB) H₃₇Ra strain ของสิ่งสกัด acetone และ สิ่งสกัด ethanol ความเข้มข้น 50 µg/ml

Sample code	Final concentration (µg/ml)	% inhibition	Activity
สิ่งสกัด acetone	50.00	72.21	Inactive
สิ่งสกัด ethanol	50.00	38.39	Inactive

TS004 = crude extract in acetone

TS005 = crude extract in ethanol

วิธีการแปลผล

%inhibition	Activity
< 90%	Inactive
≥ 90%	Active

4.1.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดสในสารสกัดหยาบเถาชิงช้าสะแกราช

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase (NA) พบว่าสิ่งสกัด acetone และ สิ่งสกัด ethanol มีค่า %inhibition คือ 8.88% และ 2.02% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase โดยวิธีที่ใช้ทำการทดลองคือ Fluorometric determination (MUNANA-based enzyme inhibition assay) ซึ่งมี Oseltamivir carboxylate เป็น positive control

ตารางที่ 6 แสดงผล Neuraminidase (NA) inhibition assay ของสิ่งสกัด acetone และ สิ่งสกัด ethanol ความเข้มข้น 100 µg/ml

Sample code	Final concentration(µg/ml)	%inhibition	Activity
สิ่งสกัด acetone	100.00	8.88	Inactive
สิ่งสกัด ethanol	100.00	2.02	Inactive

วิธีการแปลผล

%inhibition	Activity
< 50%	Inactive
≥ 50%	Active

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.

4.1.2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ในสารสกัดหยาบ เถาชิงช้าสะแกราช

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* พบว่าสิ่งสกัด acetone และสิ่งสกัด ethanol มีค่า %inhibition คือ 11.97% และ 6.81% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* โดยวิธีที่ใช้ทำการทดลองคือ Resazurin Microplate assay (REMA) ซึ่งมี Amphotericin B เป็น positive control และมี Cell+DMSO เป็น negative control

ตารางที่ 7 แสดงผล Antifungal against *Candida albicans* ของสิ่งสกัด acetone และ สิ่งสกัด ethanol ความเข้มข้น 50 µg/ml

Sample code	Final concentration (µg/ml)	%inhibition	Activity
สิ่งสกัด acetone	50.00	11.97	Inactive
สิ่งสกัด ethanol	50.00	6.81	Inactive

วิธีการแปลผล

%inhibition	Activity
< 50%	Inactive
≥ 50%	Active

4.1.2.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสในสารบริสุทธิ์ TS1 และ TS2

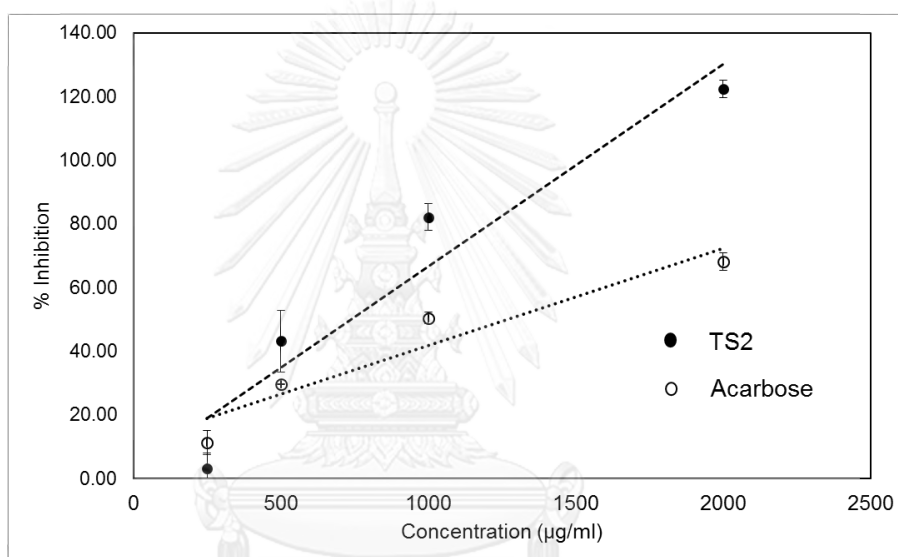
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสโดยใช้ Acarbose เป็นสารควบคุมผลบวก (positive control) และใช้ 50% DMSO เป็นสารควบคุมผลลบ (negative control) พบว่า สารบริสุทธิ์ TS2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี โดยเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์แสดงดังตารางที่ 8 และรูปที่ 7

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 8 % inhibition ของ TS2 เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.1 unit/ml

Concentration (mg/ml)	% inhibition
2	122.32
1	82.14
0.5	43.15
0.25	3.27

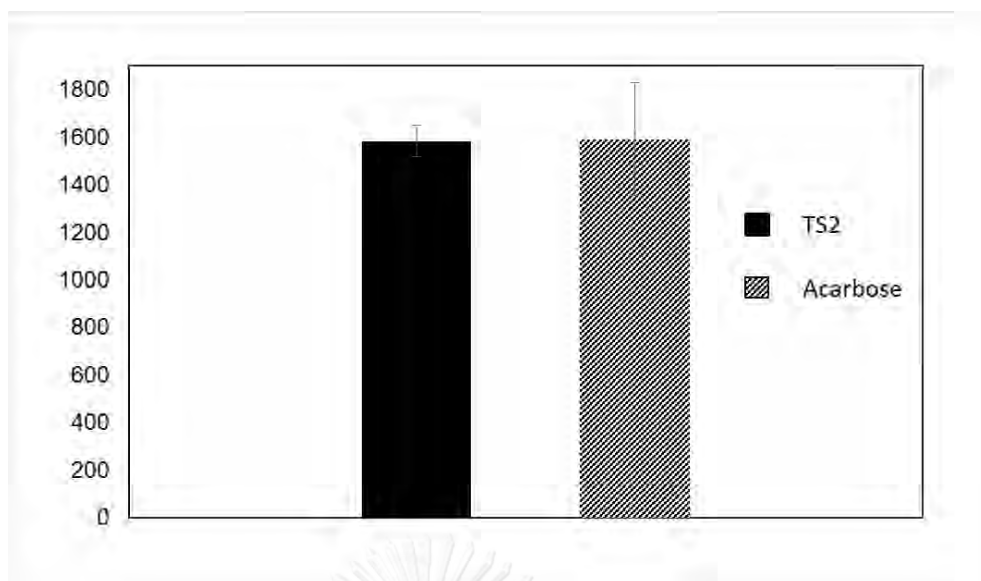


รูปที่ 7 %inhibition ของ TS2 เปรียบเทียบกับ Acarbose (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

เมื่อนำ %inhibition และความเข้มข้นมาสร้างกราฟการตอบสนองต่อขนาดสารที่ให้ (Dose response curve) สามารถคำนวณค่า IC_{50} ได้เท่ากับ $566.76 \pm 23.94 \mu\text{g/ml}$ หรือ $1583.13 \pm 66.87 \mu\text{M}$ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารควบคุมผลบวก (Acarbose) ได้ผลดังรูปที่ 8

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 8 เปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของ TS2 และ Acarbose

เมื่อนำสารบริสุทธิ์ TS1 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสพบว่ามีความ IC₅₀ น้อยกว่า 1203.05 μM แต่ไม่สามารถหาค่า IC₅₀ ได้อย่างแน่ชัด เนื่องจากปริมาณสารที่สกัดแยกได้มีปริมาณที่น้อยเกินกว่าที่จะสามารถนำมาทดสอบได้

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.

4.2 อภิปรายผล

4.2.1 อภิปรายผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วย NMR spectroscopy

4.2.1.1 สาร TS1

จากการหาโครงสร้างของสาร TS1 พบว่าเป็นสารที่เคยมีการรายงานโครงสร้างแล้ว นั่นคือ naringenin ซึ่งการคาดการณ์ของโครงสร้างสารครั้งนี้ใช้เพียงการส่องด้วย UV ที่ 364 nm พบด้วย anisaldehyde reagent และใช้ NMR spectroscopy ซึ่งได้อธิบายการแปลผลสเปกตรัมไว้ในส่วนของผลการวิจัยข้างต้นแล้ว จึงมีเพียงการวิเคราะห์เพียงสามอย่างเท่านั้น ทางผู้วิจัยคิดว่าควรใช้เทคนิคทางเภสัชเวทอื่นๆ มาช่วยวิเคราะห์เพื่อเพิ่มความแม่นยำ เช่น Mass spectroscopy หรือ Infrared spectroscopy โดยสาร naringenin มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลคือ $C_{15}H_{12}O_5$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 272 และมีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 5

จากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับสารกลุ่ม flavonoids ในพืชตระกูล *Tinospora* พบการรายงานถึงการค้นพบสารในกลุ่ม flavonoids จำนวนมาก เช่น kaempferol, astragalins, quercitrosides ซึ่งพบใน *T. malabarica*²⁷ แต่ยังไม่เคยมีรายงานพบสาร naringenin ในพืชตระกูล *Tinospora* มาก่อน โดยงานวิจัยที่พบ naringenin ส่วนมากจะพบในพืชสกุล *Citrus* เป็นส่วนใหญ่²⁸ ซึ่งมีงานวิจัยที่นำสาร naringenin มาทดลองหาฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ตัวอย่างงานวิจัยที่พบ เช่น เมื่อนำมาทดลองในหนูแรทที่เหนียวนำไปเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดและลดไขมันในเลือดได้²⁹ และยังมีคุณสมบัติคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่เมื่อทำการทดลองในหนูแรท พบว่าไม่สามารถนำมาใช้ทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ แต่จะทำให้น้ำหนักของกระเพาะปัสสาวะเพิ่มขึ้น ทำให้ uterine epithelial มีความเหนียวและแข็งมากขึ้นและทำให้เซลล์บริเวณช่องคลอดมีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น²⁸ นอกจากนี้ naringenin ยังช่วยป้องกันโรคการอุดตันของโคเลสเตอรอลที่หัวใจซึ่งเกิดจากการกระตุ้นของ oxidative stress ในหนูแรทได้³⁰ และยังช่วยป้องกันการเกิดพิษต่อไตจากการกระตุ้นของยาปฏิชีวนะ gentamicin³¹ รวมไปถึงยังมีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบบริเวณลำไส้ของหนูแรทได้ด้วย³²

เนื่องจากผู้วิจัยสามารถแยกสาร naringenin จากต้นชิงช้าสะแกราชได้ 14.2 mg ซึ่งมีปริมาณน้อยและเวลาทำการวิจัยที่ค่อนข้างจำกัด จึงทำให้ผู้วิจัยได้นำสาร TS1 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่านั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าควรสกัดสารให้มีปริมาณที่มากขึ้นเพื่อไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้นให้มากยิ่งขึ้น เพื่อที่จะนำสารดังกล่าวไปต่อยอดให้เกิดประโยชน์ต่อไป

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.

4.2.1.2 สาร TS2

จากการหาโครงสร้างของสาร TS2 คาดว่าเป็นสาร 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide¹⁸ ซึ่งการวิเคราะห์โครงสร้างสารครั้งนี้ใช้เพียงการส่องด้วย UV ที่ 364 nm ฟันด้วย anisaldehyde reagent และใช้ NMR spectroscopy 3 อย่างเท่านั้น คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรใช้เทคนิคทางเภสัชเวทอื่นๆ มาช่วยวิเคราะห์เพื่อเพิ่มความแม่นยำ เช่น Mass spectroscopy หรือ Infrared spectroscopy โดย 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลคือ C₂₀H₂₂O₆ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 358 และมีโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 6

จากการหาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสาร TS2 พบว่าสาร TS2 เป็นสารกลุ่ม diterpenoids ซึ่งพืชสกุล *Tinospora* พบมากมายหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นกลุ่ม tinosporide, furanolactone diterpene, furanolactone clerodane diterpene และสารอื่นอีกมากมาย ซึ่งพบในพืชสกุลนี้เกือบทุกชนิด สำหรับสาร TS2 เคยมีรายงานการค้นพบครั้งแรกใน *T. cordifolia* ซึ่งยังไม่มีรายงานการตั้งชื่อให้กับสารนี้มาก่อนเลย มีเพียงชื่อทางเคมีคือ 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide¹⁸ เท่านั้น โดยสารนี้จัดอยู่ในกลุ่ม furanolactone clerodane diterpene เนื่องจากสาร TS2 ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน แต่มีสารในกลุ่ม furanolactone clerodane diterpene ตัวอื่น ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร TS2 และได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่มนี้จาก *T. crispa* พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้³³

เนื่องจากคณะผู้วิจัยสามารถสกัดสาร TS2 ที่มีน้ำหนักเพียง 40.2 mg ซึ่งมีปริมาณน้อยและเวลาในการทำการวิจัยที่จำกัด จึงทำให้คณะผู้วิจัยได้นำสาร TS2 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่านั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความคิดเห็นว่า ควรสกัดสารให้มีปริมาณที่มากขึ้นเพื่อไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้น และนำสารดังกล่าวไปต่อยอดให้เกิดประโยชน์ทางการรักษาต่อไป

4.2.1.3 สาร TS3

ดังที่กล่าวไปข้างต้นว่า พืชสกุล *Tinospora* มักจะมีสารกลุ่ม flavonoids และ terpenoids อยู่จำนวนมาก ซึ่งจากข้อมูล ¹H-NMR spectrum และ ¹³C-NMR spectrum ของ TS3 พบว่ามีลักษณะของ peak ที่คล้ายกับสารกลุ่ม flavonoids สองตัวรวมกัน ซึ่งมีความเป็นขั้วใกล้เคียงกันมาก ทำให้ยังไม่สามารถแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

โครงสร้างของสาร TS3 ได้ คณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าหากนำสารไปแยกต่อด้วย column chromatography โดยปรับอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ทีละน้อย เพื่อให้แยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้ และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR spectroscopy, Mass spectroscopy และ Infrared spectroscopy

4.2.2 อภิปรายผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบ ทั้งสี่การทดสอบแสดงผลบ้นั้นคือ สิ่งสกัดหยาบของเถาชิงช้าสะแกราชไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* แต่การทดสอบดังกล่าว ใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัดหยาบเท่ากับ 50 µg/ml หากทำการทดสอบโดยการเพิ่มความเข้มข้นแล้ว สิ่งสกัดหยาบอาจแสดงผลบวกต่อการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าว นอกจากนี้ การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ มีการเลือกใช้เซลล์ตัวอย่างในการทดสอบเพียง 3 เซลล์ ซึ่งสิ่งสกัดหยาบอาจมีการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์อื่น นอกเหนือจากสามเซลล์นี้ ดังนั้น การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบควรมีการทดสอบที่มากขึ้น เพื่อค้นหาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ต่อไป

4.2.2.1 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัด ethanol และ acetone ของเถาชิงช้าสะแกราช พบว่าสิ่งสกัด ethanol และ acetone ไม่มีฤทธิ์ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ KB-Oral cavity cancer cell, MCF7-breast cancer cell และ NCI-H187-Small cell lung cancer cell ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tungpradit R³⁴ ที่ได้มีการศึกษาฤทธิ์ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของบอระเพ็ด (*T. crispa*) และ *T. cordifolia* โดยทำการศึกษาในเซลล์ HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) HepG2 (human liver carcinoma cell) และ MCF-7 พบว่าสิ่งสกัด methanol และสิ่งสกัดน้ำของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด โดยมีค่า IC₅₀ มากกว่า 500 µg/ml แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานของ Ibahim MJ³⁵ ซึ่งได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต (Anti-proliferative effect) ของเซลล์มะเร็งจากสิ่งสกัด น้ำ methanol และ chloroform ของ *Tinospora crispa* พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ MCF-7, MDA-MB-231 cell (breast cancer) และ HeLa (cervical cancer) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้บอระเพ็ด มีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน อาจมาจากการที่มีแหล่งเพาะปลูกต่างกัน โดยบอระเพ็ดที่มีการเพาะปลูกในประเทศไทย²⁷ จะไม่มีฤทธิ์ในการเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่

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.

บอระเพ็ดที่มีการเพาะปลูกในประเทศมาเลเซีย²⁸ กลับมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

4.2.2.2 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis*

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง *M. tuberculosis* ของสิ่งสกัด ethanol และ acetone ของเถาชิงช้าสะแกราช พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *M. tuberculosis* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mohamad S และคณะ³⁶ ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง *M. tuberculosis* ของบอระเพ็ด พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* เมื่อใช้ความเข้มข้นของสิ่งสกัด methanol สูงถึง 1600 µg/ml ดังนั้นการใช้ประโยชน์ของพืชในสกุล *Tinospora* มาเป็นเวลาช้านานตามตำรายาพื้นบ้าน อาจจะไม่สามารถรักษาวัณโรคได้ จึงควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อหารูปแบบของการทดสอบผ่านกลไกอื่นๆ ในการนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาวัณโรค

4.2.2.3 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส

จากการส่งทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดสในสารสกัดหยาบเถาชิงช้าสะแกราช ส่วน acetone และ ethanol พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า *T. cordifolia* สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) ชนิด A/H1N1 ได้³⁷ โดยใช้กลไกควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน เป็นการกระตุ้น ยับยั้ง และเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน³⁸ คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่า หากต้นชิงช้าสะแกราชมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จริง อาจมีกลไกอื่นที่ไม่ใช่การยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส ดังนั้นหากสนใจต้องการที่จะศึกษาต่อให้ศึกษาโดยใช้รูปแบบของการทดลองผ่านกลไกอื่น

4.2.2.4 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans*

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* ในสารสกัดหยาบเถาชิงช้า สะแกราช ส่วน acetone และ ethanol พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* เนื่องจากชิงช้าสะแกราช ยังไม่เคยมีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* แต่พบงานวิจัยที่ทำการศึกษา *T. cordifolia* ในการยับยั้ง *Aspergillusniger* และ *C. albicans* พบว่าเมื่อสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลาย hydroalcoholic มีฤทธิ์ยับยั้ง *Aspergillusniger* และ *C. albicans* แต่หากเป็นตัวทำละลาย hexane จะไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง³⁹ ซึ่งคณะผู้วิจัยคาดว่าเหตุผลที่ชิงช้าสะแกราชไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราอาจจะเป็นเพราะว่าสารสกัดหยาบที่นำไปทดสอบไม่มีสารสำคัญที่จะสามารถยับยั้งเชื้อราได้ คณะผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่าควรเลือกสารสกัดหยาบที่มาจากตัวทำละลายอื่น ไปทำการทดลองเพิ่มเติม หรือเชื้อ *C. albicans* อาจจะไม่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบจากชิงช้าสะแกราชดังนั้นอาจจะใช้เชื้อราชนิดอื่นมาทำการวิจัยแทน

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.

4.2.2.5 อภิปรายผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

ในการทดสอบฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของ naringenin และ 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide พบว่า naringenin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 1203.05 μM ซึ่ง Priscilla DH และคณะ⁴⁰ ได้มีการศึกษาฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลหลังรับประทานอาหาร ผ่านการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่า naringenin มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 384.4 μM เมื่อใช้เอนไซม์ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.5 μM เมื่อใช้เอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ และเมื่อทำการทดสอบในหนูที่มีการเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน พบว่าการใช้ naringenin 25 mg/kg สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูได้ หลังจากให้น้ำตาล sucrose และ maltose โดยลดการดูดซึมน้ำตาลในกระแสเลือด (α -glucosidase inhibitory action) นอกจากนี้ยังพบว่า naringenin สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ผ่านทางกลไกอื่น เช่น ยับยั้ง Na^+ -glucose cotransporter⁴¹ และยับยั้ง phosphoinositide 3-kinase⁴²

สำหรับ 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม diterpenoids พบว่ายังไม่มีเคมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน แต่เคยมีการรายงานฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารในกลุ่ม diterpenoids ที่สกัดได้จาก *Tinospora crista*³³ ซึ่งมีกลไกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยเพิ่มการใช้น้ำตาลกลูโคสในเนื้อเยื่อ และลดกระบวนการสร้างกลูโคสในตับ แต่เนื่องจากการศึกษาผ่านกลไกดังกล่าว จะต้องมีการทดลองในสัตว์ทดลอง ซึ่งคณะผู้วิจัยมีเวลาที่ใช้ในการวิจัยที่จำกัด ดังนั้นจึงอาจมีการศึกษาในกลไกดังกล่าวเพื่อนำไปพัฒนาต่อเป็นยาใหม่จากธรรมชาติได้

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสาร 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide ผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่ามีฤทธิ์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $1583.13 \pm 66.87 \mu M$ ดังนั้นสารนี้จึงสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งควรมีการศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองต่อไป

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

จากการนำเอาของชิงช้าสะแกราชามาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และนำสารสกัดที่ได้ไปผ่านกระบวนการแยกด้วยวิธี column chromatography คณะผู้วิจัยสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 2 ชนิด คือ สารกลุ่ม flavonoids 1 ชนิด (สาร TS1) กับสารกลุ่ม diterpenoids 1 ชนิด (สาร TS2) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีพบว่าสาร TS1 เป็นสารที่มีชื่อว่า naringenin และสาร TS2 เป็นสารที่มีชื่อว่า 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide

ผลการนำสารสกัดหยาบจากเถาชิงช้าสะแกราชาไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่

ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ KB-Oral cavity cancer cell, MCF7-breast cancer cell และ NCI-H187-Small cell lung cancer cell โดยวิธีที่ใช้ทำการทดลองคือ Resazurin Microplate assay (REMA) พบว่าสารสกัด ethanol ของชิงช้าสะแกราชาไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด

ฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium tuberculosis* (Anti-TB) H₃₇Ra strain ด้วยวิธี Green fluorescent protein microplate assay (GEPMA) พบว่าสารสกัด acetone และ ethanol ของชิงช้าสะแกราชาไม่มีฤทธิ์ต้าน *Mycobacterium tuberculosis*

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase (NA) โดยวิธี Fluorometric determination พบว่าสารสกัด acetone และ ethanol ของชิงช้าสะแกราชาไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Neuraminidase

ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay พบว่าสารสกัด acetone และ ethanol ของชิงช้าสะแกราชาไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans*

แต่เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้ ได้แก่ TS1 และ TS2 มาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบว่าสารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยสาร TS1 มีค่า IC₅₀ ของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส น้อยกว่า 1203.05 μ M ในขณะที่สาร TS2 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1583.13 \pm 66.87 μ M ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่า IC₅₀ ของ Acarbose พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน โดย Acarbose มีค่าเท่ากับ IC₅₀ 1591.1 \pm 236.88 μ M

ถึงแม้ว่าสารทั้งสองนี้ จะเคยมีการรายงานการค้นพบมาก่อนแล้ว และ naringenin ก็ยังมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อนด้วย แต่สาร 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide ยังไม่เคยมีการรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อนเลย ทำให้ผลการวิจัยนี้ ถือเป็นงานวิจัยทางชีวภาพของสาร 15,16-Epoxy-4-hydroxy-2,13(16),14-clerodatriene-17,12:18,6-diolide เป็นครั้งแรก

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.

ผลการทดสอบที่พบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสนี้ ทำให้เกิดแนวทางการศึกษาต่อไปในอนาคตคือ สาร TS2 อาจจะนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน ซึ่งเป็นยาใหม่จากธรรมชาติต่อไปได้

นอกจากนี้ การแยกสกัดสารของคณะผู้วิจัยจนได้สารบริสุทธิ์ ได้ทำเพียงการแยกสกัดสารจากส่วนสกัดหยาบด้วย ethyl acetate เท่านั้น ยังคงมีส่วนสกัดหยาบอื่นๆ ที่ยังอาจมีองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ และฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจอื่นๆ อยู่อีก ทำให้ยังสามารถทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับต้นชิงช้าสะแกราชได้อีกมาก

การวิจัยครั้งนี้มีอุปสรรคในเรื่องประสบการณ์ของคณะผู้วิจัย ด้วยสาเหตุที่ไม่เคยมีประสบการณ์ในการแยกสกัดสารมาก่อน และขาดการวางแผนที่ดี ทำให้การวิจัยในช่วงแรกเป็นไปได้ยาก จากการใช้ปฏิบัติไม่ถูกต้องตามหลักการแยกสกัดสาร ดังนั้นก่อนการทำการวิจัยทุกครั้ง ควรจะมีการทบทวนความรู้ในเรื่องที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนั้น และเตรียมพร้อมด้วยการวางแผนที่ดี คาดการณ์ถึงผลที่อาจจะเกิดขึ้น และเตรียมรับมือกับอุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นได้ทุกเมื่อในการทำวิจัย อีกทั้งยังต้องมีการบันทึกผลที่เป็นระบบ เพื่อให้สามารถเข้าถึงข้อมูลได้ตลอดเวลา และป้องกันการผิดพลาดที่เกิดจากการบันทึกผลผิดพลาดหรือลืมบันทึก

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. ปิยะ เฉลิมกลิ่น, จิรพันธุ์ ศรีทองกุล และอนันต์ พิริยะภัทรกิจ. พรรณไม้ที่พบครั้งแรกในประเทศไทย. กทม. โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพ. 2551. หน้า 87
2. Watson, L., and Dallwitz, M.J [database on the Internet]. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval.c2013 – [cited 22 March 2014]. Available from: <http://delta-intkey.com/angio/index.htm>
3. De Wet H, Van Wyk BE. An ethnobotanical survey of southern African Menispermaceae. South African Journal of Botany. 2008;74(1):2-9.
4. Ruan C-T, Lam S-H, Chi T-C, Lee S-S, Su M-J. Borapetoside C from *Tinospora crispa* improves insulin sensitivity in diabetic mice. Phytomedicine. 2012;19(8-9):719-24.
5. Yusoff M, Hamid H, Houghton P. Anticholinesterase inhibitory activity of quaternary alkaloids from *Tinospora crispa*. Molecules. 2014;19(1):1201-11.
6. ปิยะ เฉลิมกลิ่น, จิรพันธุ์ ศรีทองกุล และอนันต์ พิริยะภัทรกิจ. ไม้เลื้อยในป่าสะแกราช. กรุงเทพฯ: หจก. อรุณการพิมพ์. 2549
7. ไม้เลื้อยในป่าสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช [database on the Internet]. สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช [cited 12 May 2015]. Available from: <http://www.tistr.or.th/sakaerat/climbers.HTM>
8. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้; 2557.
9. Sharma U, Bala M, Kumar N, Singh B, Munshi RK, Bhalerao S. Immunomodulatory active compounds from *Tinospora cordifolia*. J Ethnopharmacol. 2012;141(3):918-26.
10. Ashish K P, Dharam C J, Ram P S. Chemistry and biological activities of the genera *Tinospora*. International journal of pharmacognosy. 1995;33(4):277-87
11. Michael G W. A unifying review of bioassay-guided fractionation, effect-directed analysis and related techniques. Sensors. 2012. 12. 9181-9209
12. สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย, สมาคมต่อมไร้ท่อแห่งประเทศไทย, สำนักงานหลักประกันแห่งชาติ. แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน. กรุงเทพฯ: บริษัทศิริการเมืองพิมพ์จำกัด. 2554
13. Andrade C, Cabello H, Cárdenas V. Alpha-glucosidase inhibiting activity of five Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. Pharmacologyonline. 2015. Vol1. 67-71.

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.

14. De Fries R, Mitsuhashi M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarbluetm assay to 3h-thymidine incorporation assay. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1995;9(2):89-95.
15. Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. Green Fluorescent Protein Reporter Microplate Assay for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(2):344-7.
16. Li AF, Wang WH, Xu WF, Gong JZ. A microplate-based screening assay for neuraminidase inhibitors. *Drug Discov Ther*. 2009;3(6):260-5.
17. Samee W, Vajragupta O. Antifungal, cytotoxic activities and docking studies of 2,5-dimercapto-1,3,4-thiadiazole derivatives. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;5(4):477-85.
18. Connolly, Donald J, Hill RF. *Dictionary of terpenoids*; 1991.
19. Hanuman, Jampani B., R. K. Bhatt, and B. K. Sabata. A diterpenoidfuranolactone from *Tinospora cordifolia*. *Phytochemistry* 25.7 (1986): 1677-1680
20. Pathak, Ashish K., Dharam C. Jain, and Ram P. Sharma. Chemistry and biological activities of the Genera *Tinospora*. *Pharmaceutical Biology* 33.4 (1995): 277-287.
21. Keiler, Annekathrin Martina, et al. Assessment of the effects of naringenin-type flavanones in uterus and vagina. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 145 (2015): 49-57.
22. Priscilla, David Hansi, Murugesan Jayakumar, and Kavitha Thirumurugan. Flavanone naringenin: An effective antihyperglycemic and antihyperlipidemic nutraceutical agent on high fat diet fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *Journal of Functional Foods* 14 (2015): 363-373.
23. Chtourou, Yassine, et al. Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats. *Pharmacological Reports* (2015).
24. Fouad, Amr A., et al. Protective effect of naringenin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*38.2 (2014): 420-429.
25. Yang, ZiHuan, et al. Relaxant effect of flavonoid naringenin on contractile activity of rat colonic smooth muscle. *Journal of ethnopharmacology* 155.2 (2014): 1177-1183.
26. Lam, Sio-Hong, et al. Hypoglycemic diterpenoids from *Tinospora crispa*. *Journal of natural products* 75.2 (2012): 153-159

**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.**

27. Pathak, Ashish K., Dharam C. Jain, and Ram P. Sharma. "Chemistry and biological activities of the Genera *Tinospora*." *Pharmaceutical Biology* 33.4 (1995): 277-287.
28. Keiler, Annkathrin Martina, et al. "Assessment of the effects of naringenin-type flavanones in uterus and vagina." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 145 (2015): 49-57.
29. Priscilla, David Hansi, Murugesan Jayakumar, and Kavitha Thirumurugan. "Flavanone naringenin: An effective antihyperglycemic and antihyperlipidemic nutraceutical agent on high fat diet fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats." *Journal of Functional Foods* 14 (2015): 363-373.
30. Chtourou, Yassine, et al. "Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats." *Pharmacological Reports* (2015).
31. Fouad, Amr A., et al. Protective effect of naringenin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Environmental toxicology and pharmacology* 38.2 (2014): 420-429.
32. Yang, ZiHuan, et al. Relaxant effect of flavonoid naringenin on contractile activity of rat colonic smooth muscle. *Journal of ethnopharmacology* 155.2 (2014): 1177-1183.
33. Lam, Sio-Hong, et al. Hypoglycemic diterpenoids from *Tinospora crispera*. *Journal of natural products* 75.2 (2012): 153-159
34. Tungpradit R, Sinchaikul S, Phutrakul S, Wongkham W, Chen ST. Anti-cancer compound screening and isolation: *Coscinium fenestratum*, *Tinospora crispera* and *Tinospora cordifolia*. *Chiang Mai Journal Science*. 2010;37(3) : 476-488.
35. Zulkhairi A, Jr., Abdah MA, NH MK, Nursakinah I, Moklas MA, Hasnah B, et al. Biological Properties of *Tinospora crispera* (Akar Patawali) and Its Antiproliferative Activities on Selected Human Cancer Cell Lines. *Malays J Nutr*. 2008;14(2):173-87.
36. Mohamad S, Zin NM, Wahab HA, Ibrahim P, Sulaiman SF, Zahariluddin ASM, et al. Antituberculosis potential of some ethnobotanically selected Malaysian plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;133(3):1021-6
37. Singh, S., M. Gupta, and S. Gautam. "Adaptogenic potential of herbal immunomodulators as new therapeutic approach to combat swine influenza A/H1N1 crisis." *J Clin Diag Res* (2010): 3003-5.
38. Thakur, Pallavi, et al. "BIOPROSPECTION FOR IDENTIFICATION OF PROMISING ANTIMICROBIALS OF HERBAL ORIGIN AGAINST HIGHLY VIRULENT STRAINS OF INFLUENZA VIRUS."

**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.**

39. Mathur, Abhishek, et al. "Antifungal activity of some plant extracts against clinical pathogens." *AdvApplSci Res* 2.2 (2011): 260-4.
40. Priscilla DH, Roy D, Suresh A, Kumar V, Thirumurugan K. Naringenin inhibits α -glucosidase activity: A promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2014;210(0):77-85.
41. Li JM, Che CT, Lau CB, Leung PS, Cheng CH. Inhibition of intestinal and renal Na⁺-glucose cotransporter by naringenin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(5-6):985-95.
42. Harmon AW, Patel YM. Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(2):229-34.



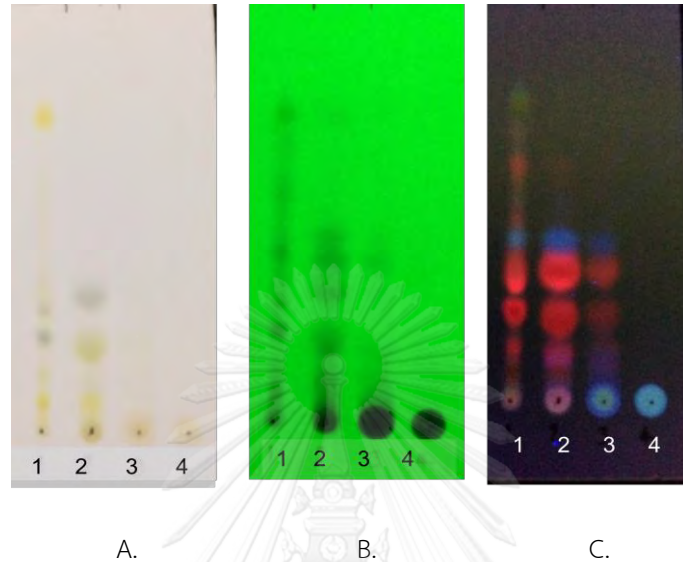
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

ภาคผนวก ก

แผ่น thin layer chromatography ที่ใช้ในการวิจัย

ผลการศึกษา TLC ของการแยกสกัดสารจากเถาชิงช้าสะแกราช



รูปที่ ก. 1 ผลการศึกษา TLC ของสิ่งสกัด (1) Hexane (2) EtOAc (3) Acetone (4) MeOH ภายใต้

A. สภาวะห้อง B. UV 254 nm C. UV 365 nm เมื่อใช้ solvent system คือ Hexane : EtOAc = 1:1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



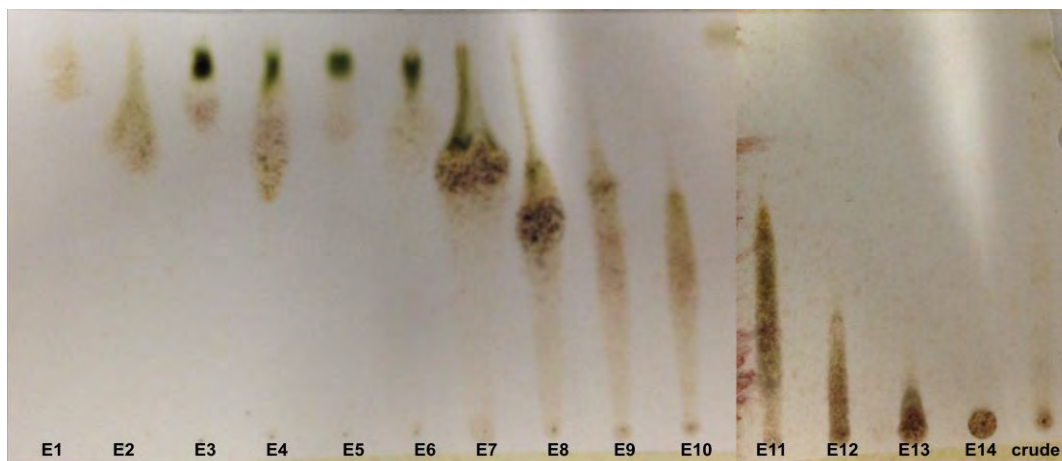
รูปที่ ก. 2 ผลการศึกษา TLC ของสิ่งสกัด EtOAc เมื่อสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution

และใช้ solvent system คือ CH_2Cl_2 : Acetone 8 : 1

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

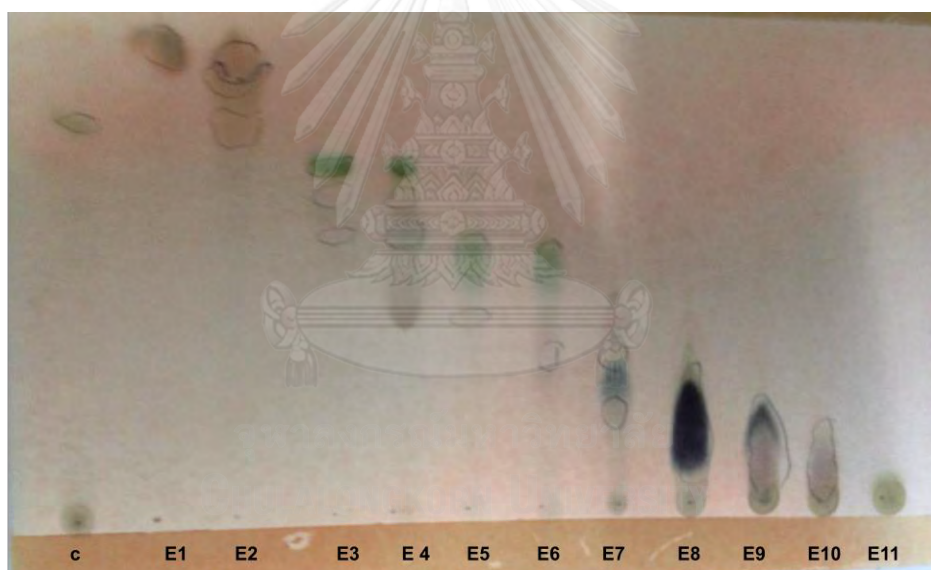
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

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



รูปที่ ก. 3 ผลการศึกษาการรวม fraction จากสิ่งสกัด EtOAc ที่สามารถแยกได้ หลังจากสเปรย์ด้วย

Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ CH_2Cl_2 : Acetone 6 : 4

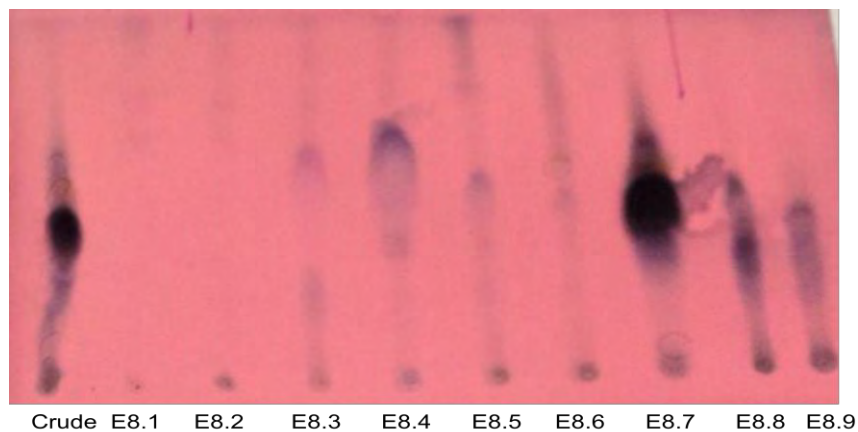


รูปที่ ก. 4 ผลการศึกษาการรวม fraction จากสิ่งสกัด EtOAc ที่สามารถแยกได้ หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde

solution เมื่อใช้ solvent system คือ CH_2Cl_2 : Acetone 9.6 : 0.4

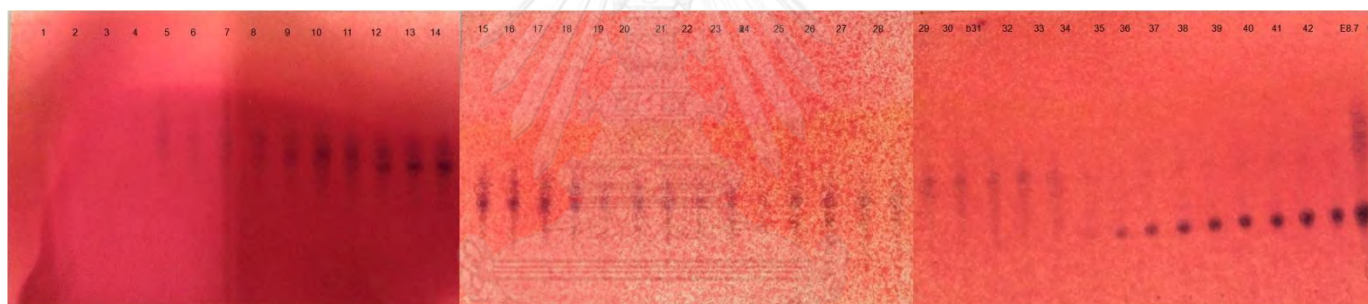
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปที่ ก. 5 ผลการศึกษาการรวม fraction จาก fraction E8 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution

เมื่อใช้ solvent system คือ CH_2Cl_2 : Acetone 9 : 1



รูปที่ ก. 6 ผลการศึกษา TLC ได้จากการแยกสกัด E8 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution

เมื่อใช้ solvent system คือ CH_2Cl_2 : Acetone ในอัตราส่วน 9:1

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

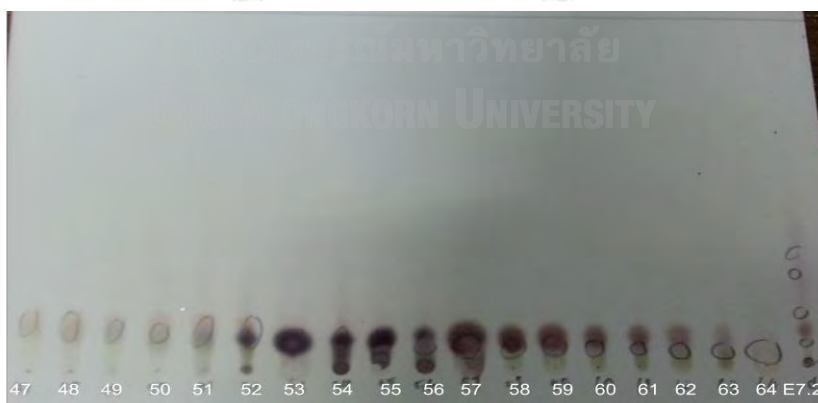
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ ก. 7 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ fraction 7.2 ที่ได้จากการแยกสกัด E7 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 1:1



(1)



(2)

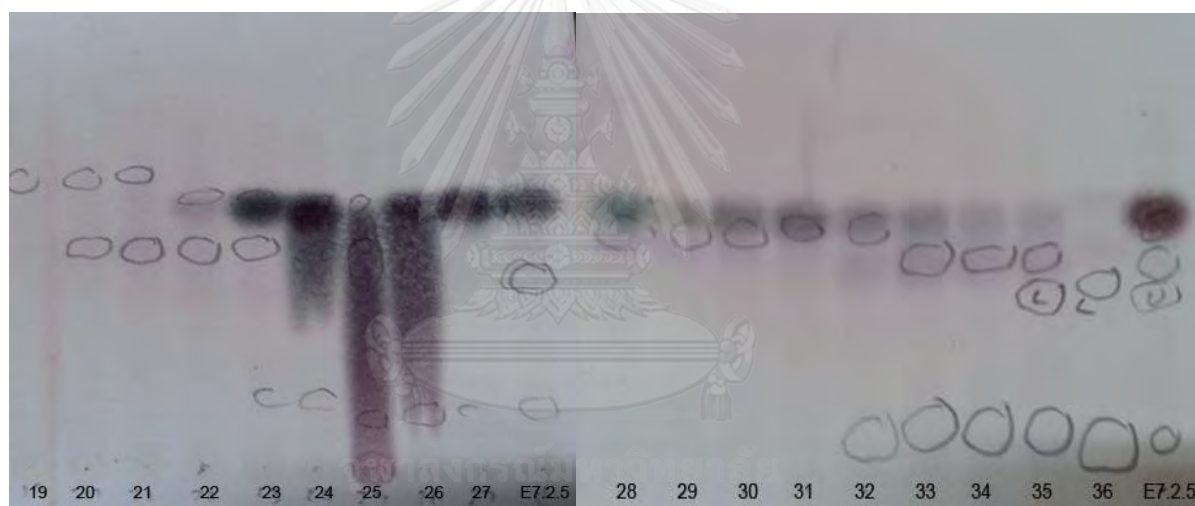
รูปที่ ก. 8 ผลการศึกษา TLC ที่ได้จากการแยกสกัด E7.2 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 7:3 (1) fraction 1-46 (2) fraction 47- 64

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.



(1)



(2)

(3)

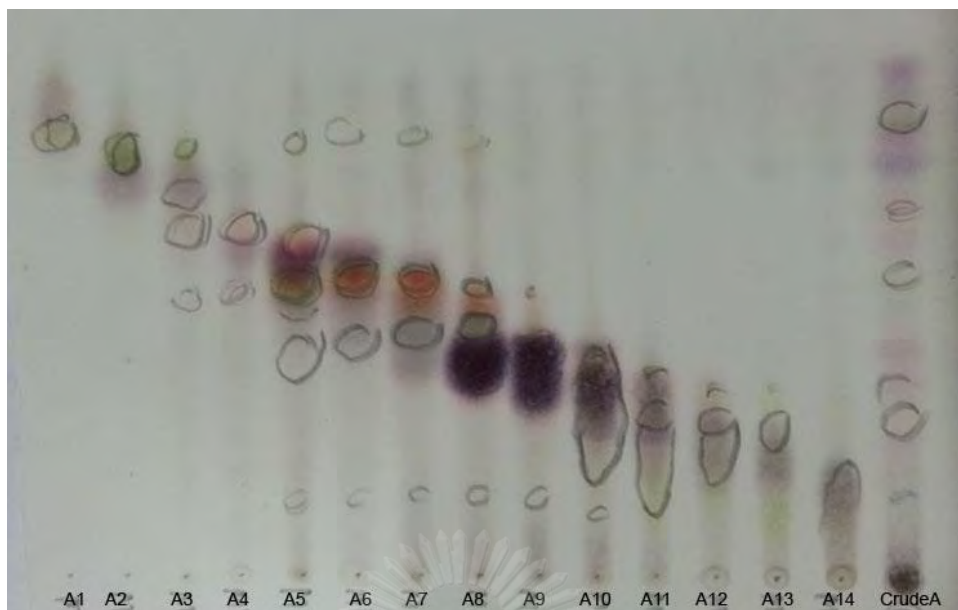
รูปที่ ก. 9 ผลการศึกษา TLC ที่ได้จากการแยกสกัด E7.2.5 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution

เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 3:7 (1) fraction 1-18 (2) fraction 19-27

(3) fraction 28-36

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

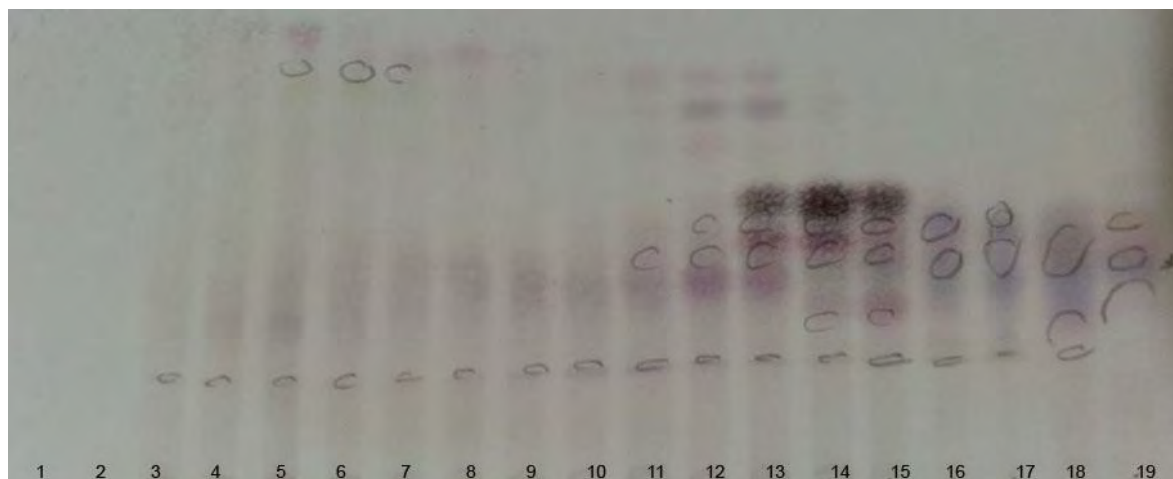
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



รูปที่ ก. 10 ผลการศึกษา TLC จากสิ่งสกัด Acetone ที่สามารถแยกได้ หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 3:7



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.



(1)



(2)

รูปที่ ก. 11 ผลการศึกษา TLC ที่ได้จากการแยกสกัด A6 และ A7 หลังจากสเปรย์ด้วย Anisaldehyde solution

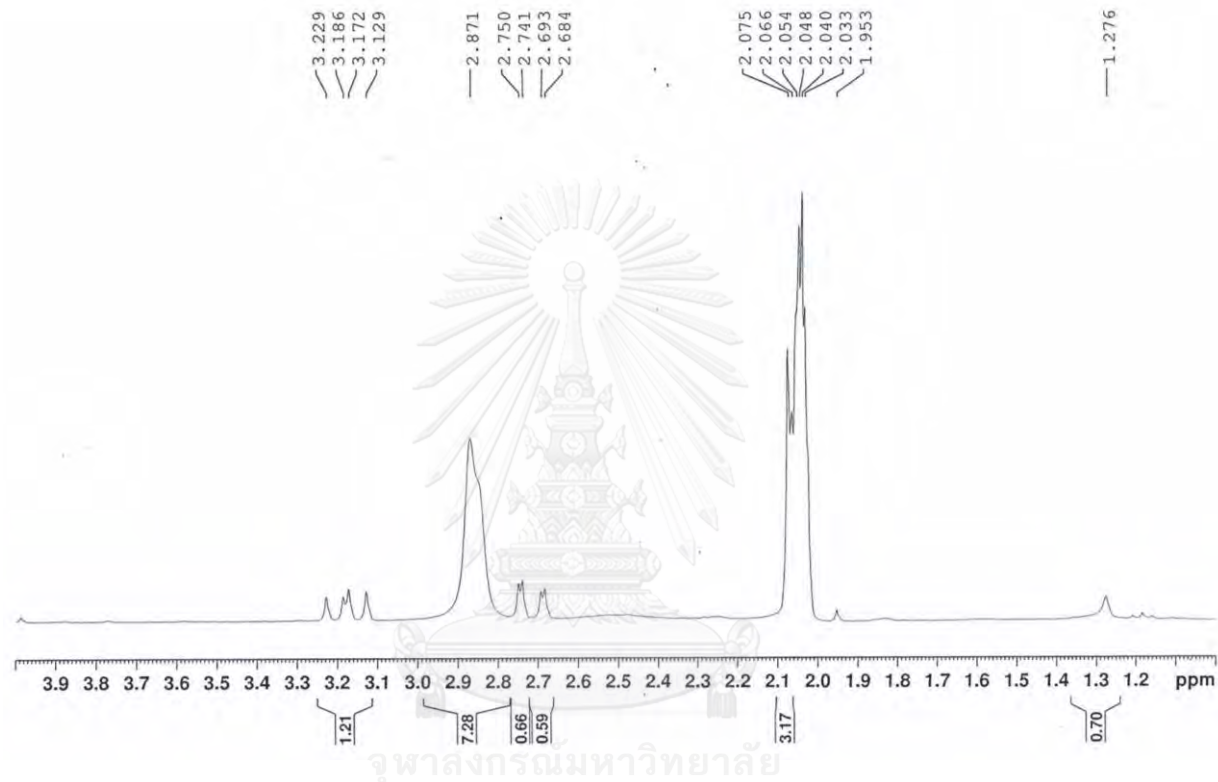
เมื่อใช้ solvent system คือ hexane : EtOAc ในอัตราส่วน 3:7 (1) fraction 1-19 (2) fraction 20-38

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.

ภาคผนวก ข

ผล NMR spectrum ของสารบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้ในงานวิจัย



รูปที่ ข. 1.1 แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS1 (acetone- d_6)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

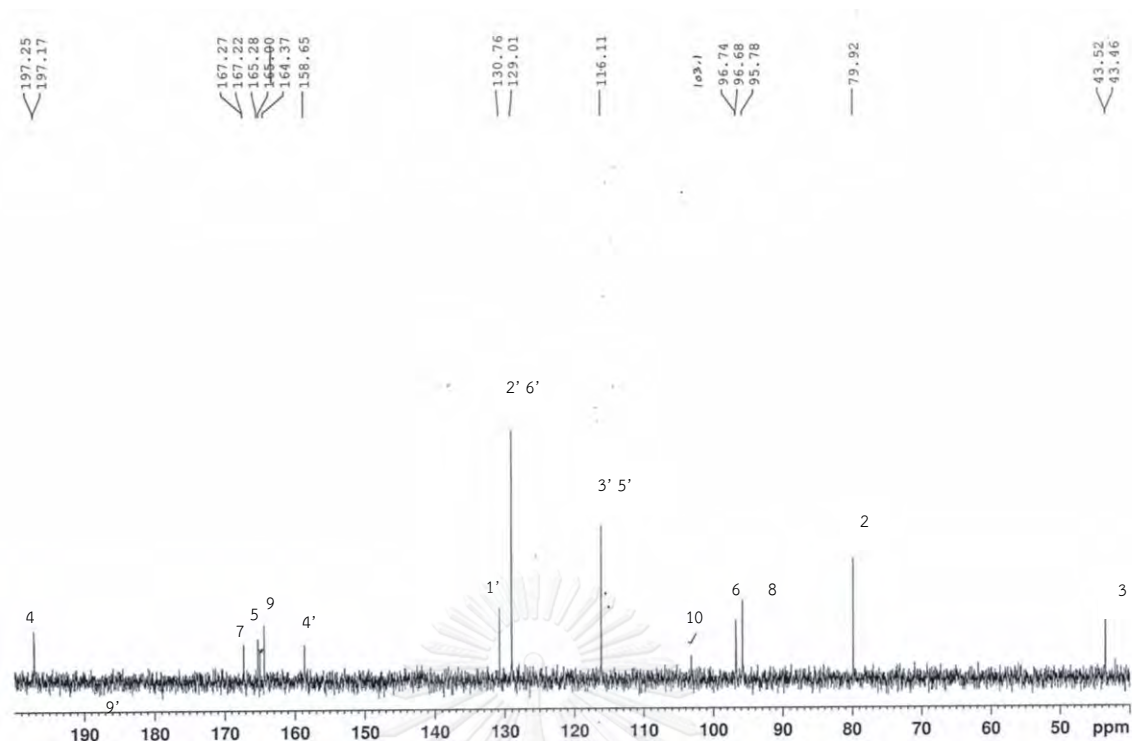


รูปที่ ข. 1.2 แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS1 (acetone- d_6)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

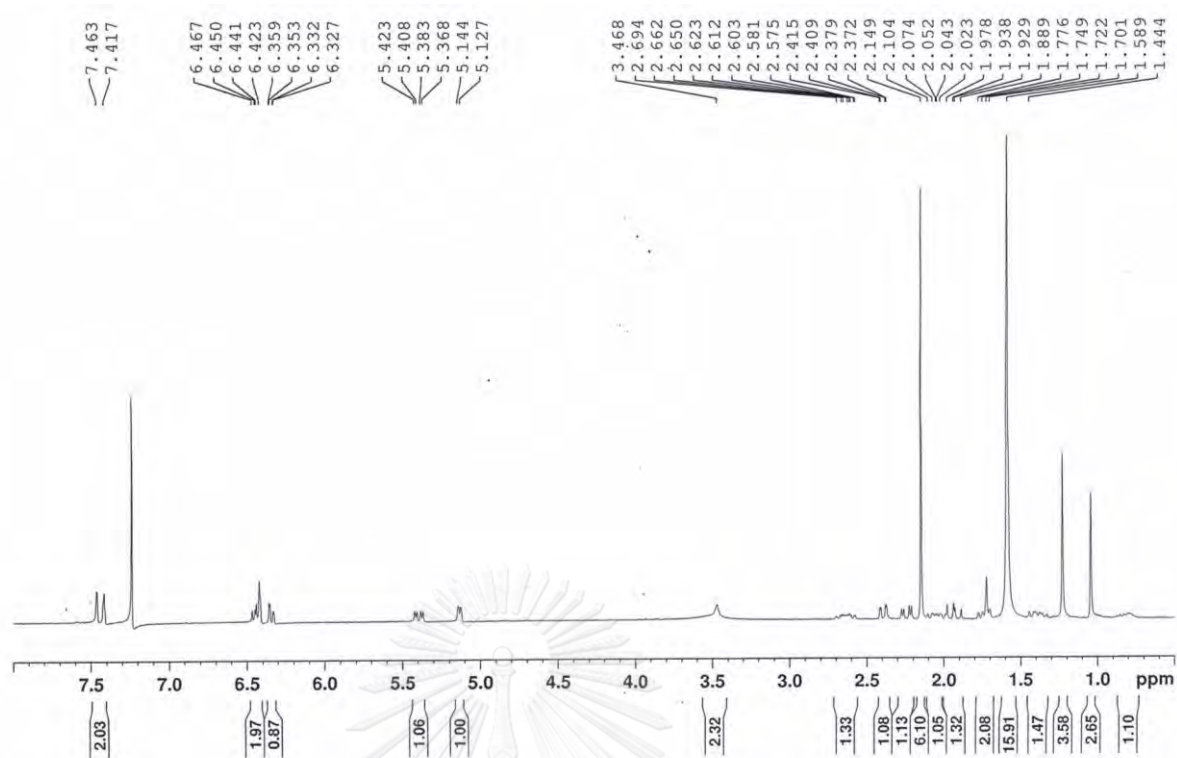


รูปที่ ข. 2 แสดง ^{13}C -NMR (300 Hz) spectrum ของสาร TS1 (acetone- d_6)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

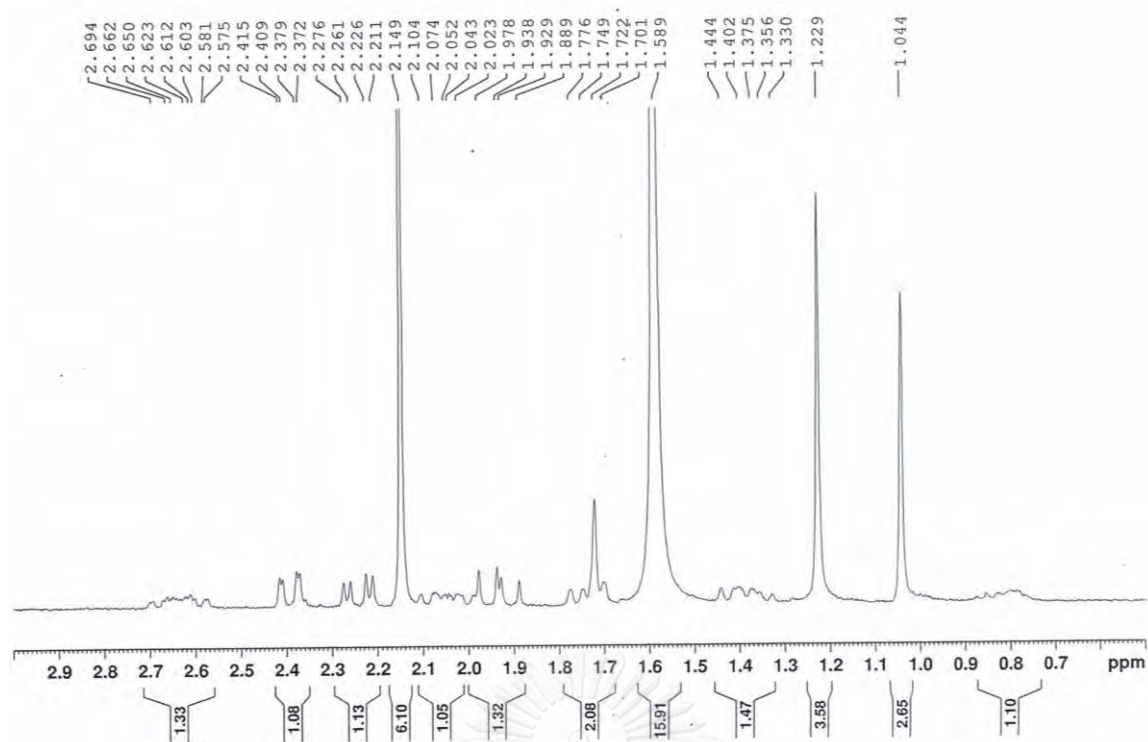
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

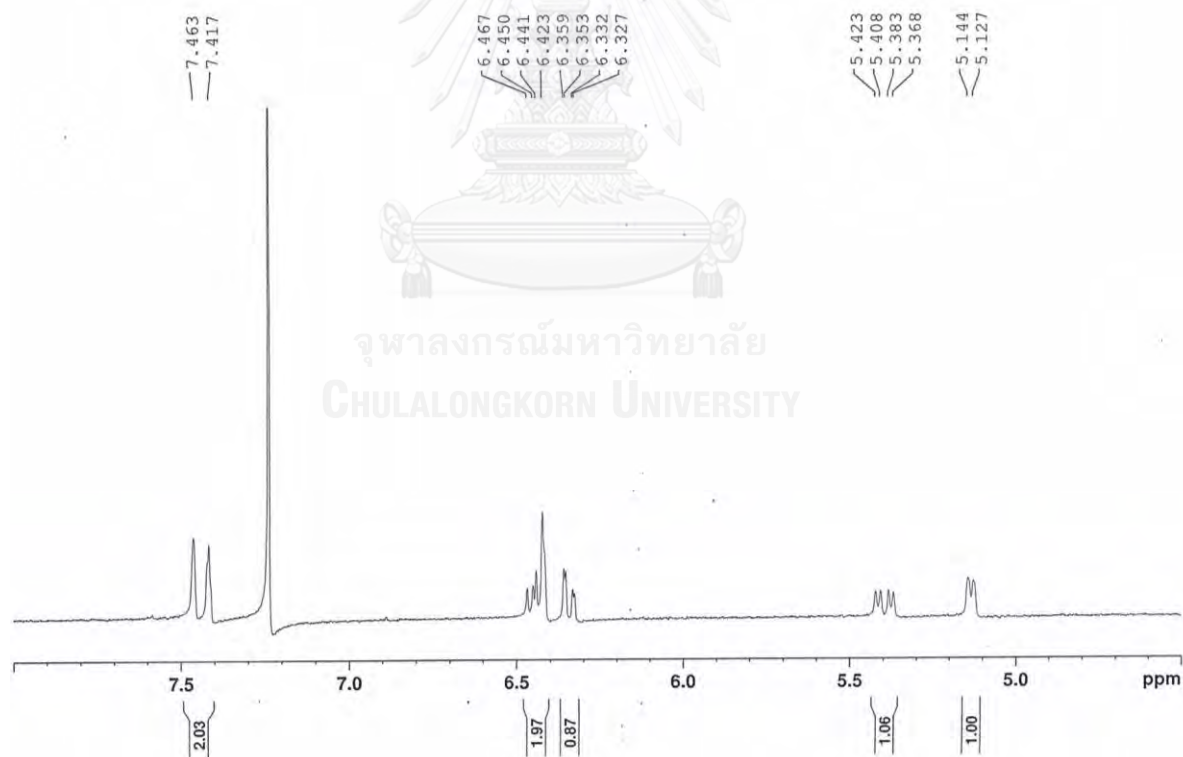


รูปที่ ข. 2.1 แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

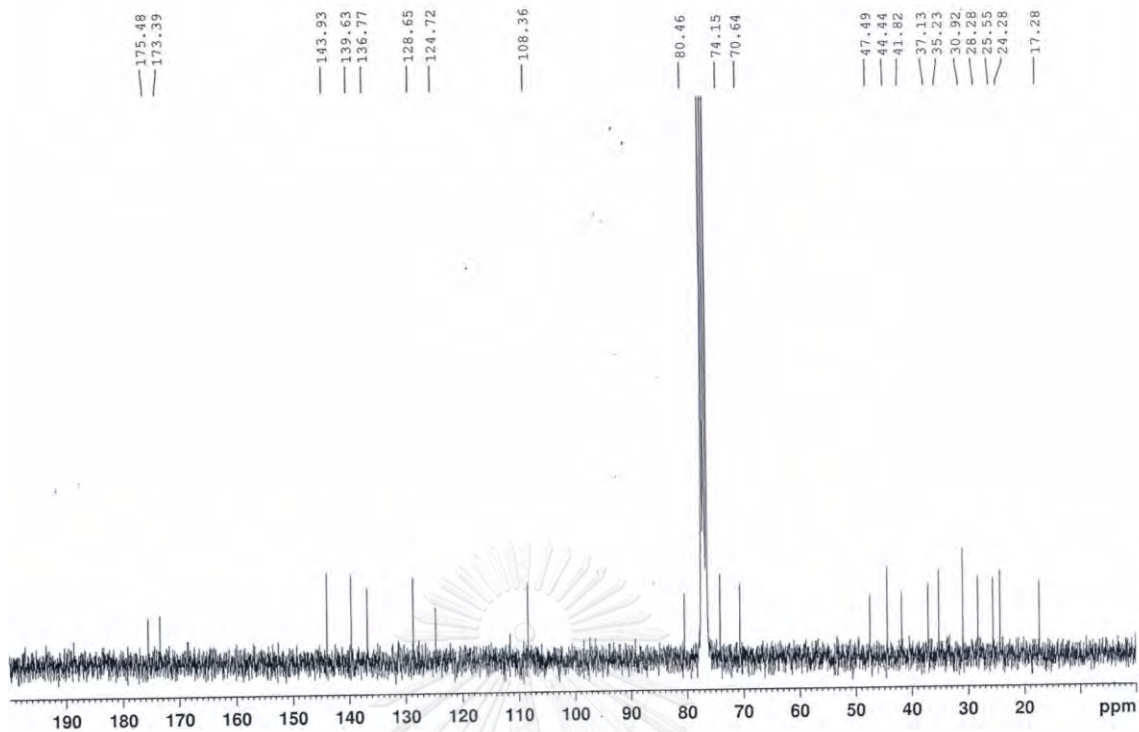


รูปที่ ข. 2.2 แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)

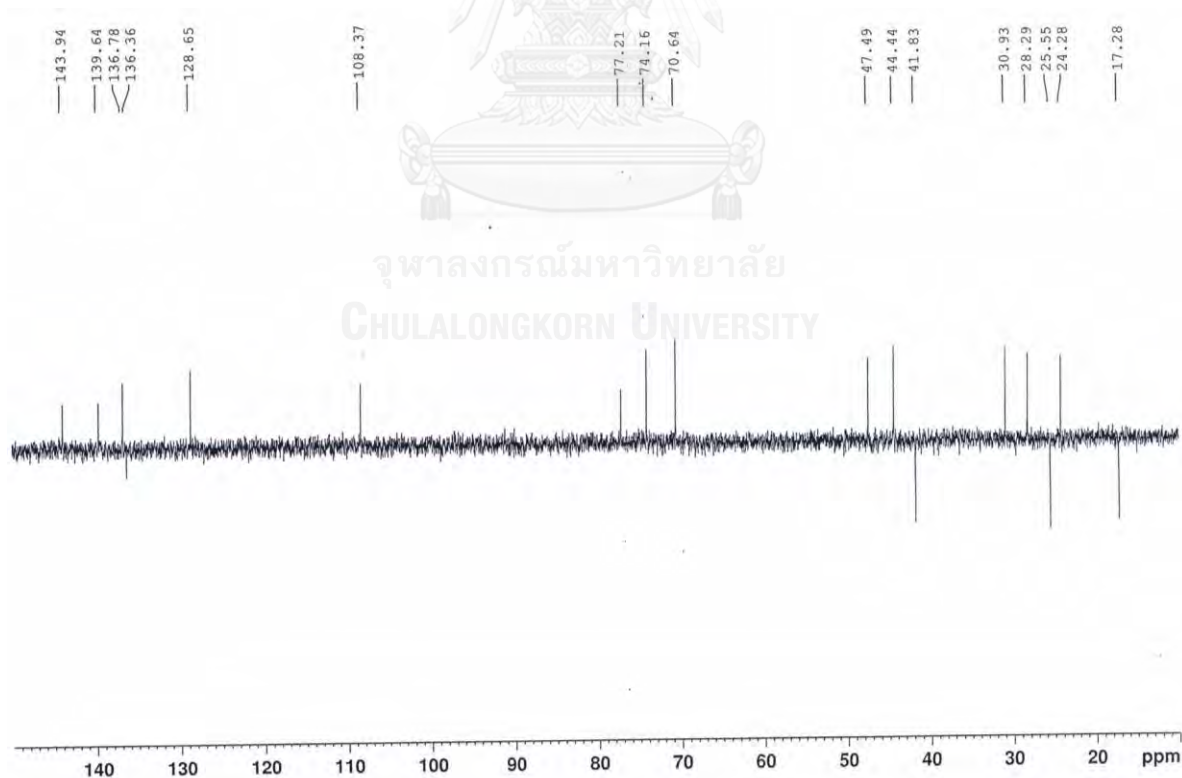


รูปที่ ข. 2.3 แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

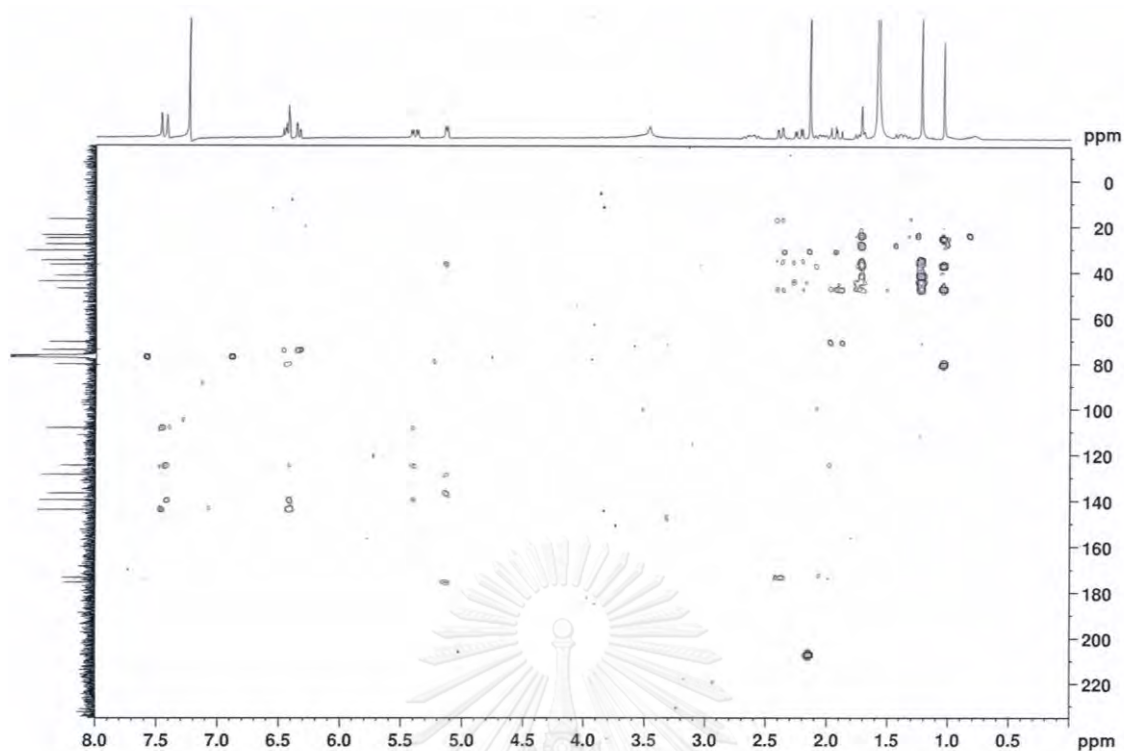


รูปที่ ข. 3 แสดง ^{13}C -NMR (300 Hz) spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)

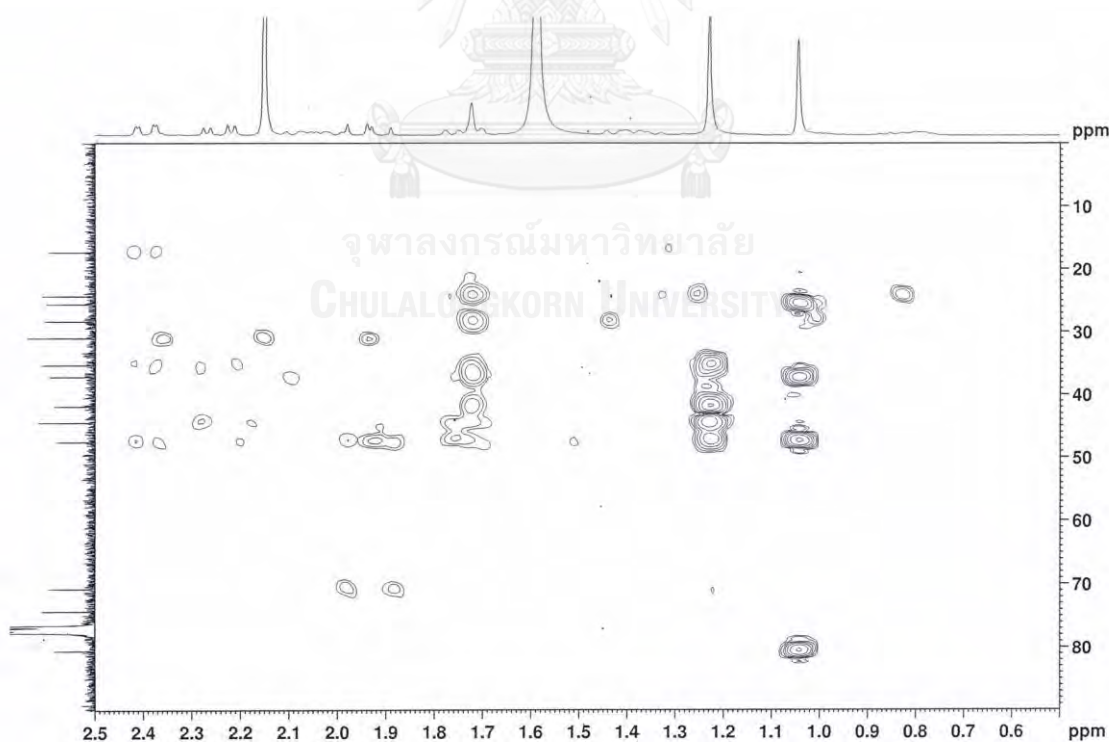


รูปที่ ข. 4 แสดง DEPT135 spectrum ของสาร TS2 (CDCl_3)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

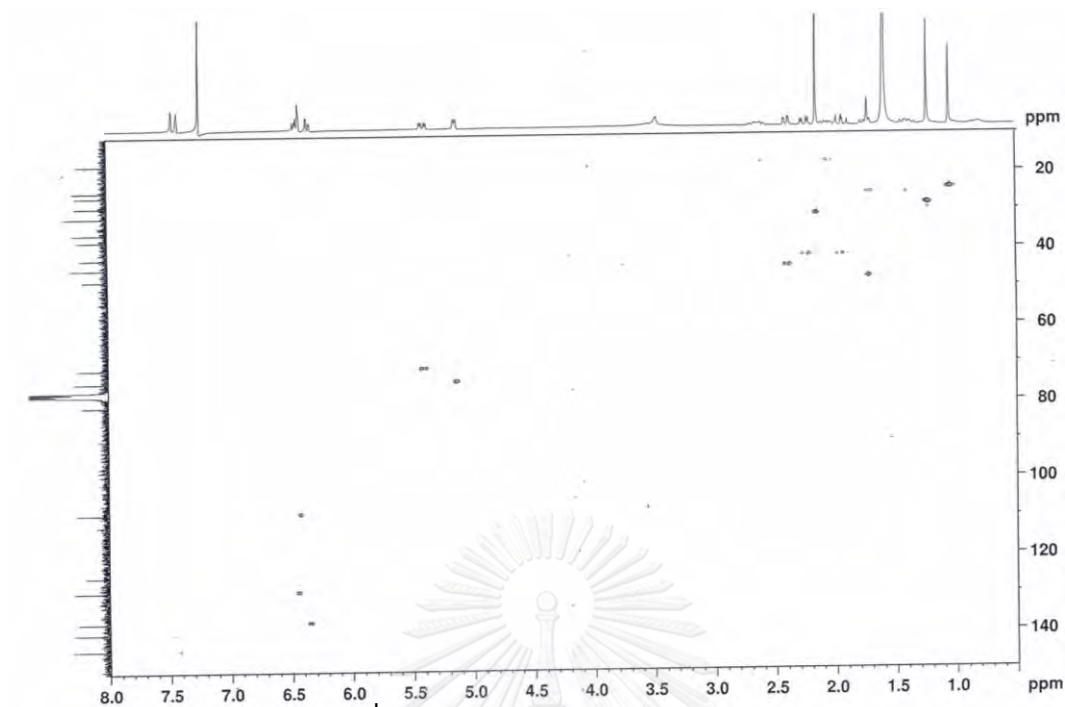


รูปที่ ข. 5.1 แสดง HMBC ของสาร TS2 (CDCl₃)

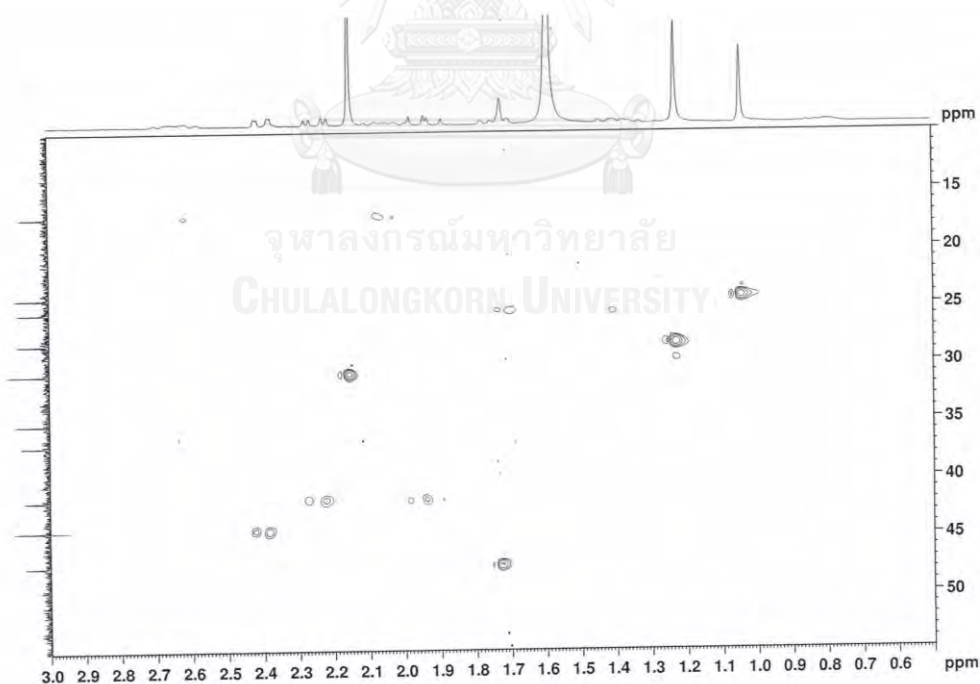


รูปที่ ข. 5.2 แสดง HMBC ของสาร TS2 (CDCl₃)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



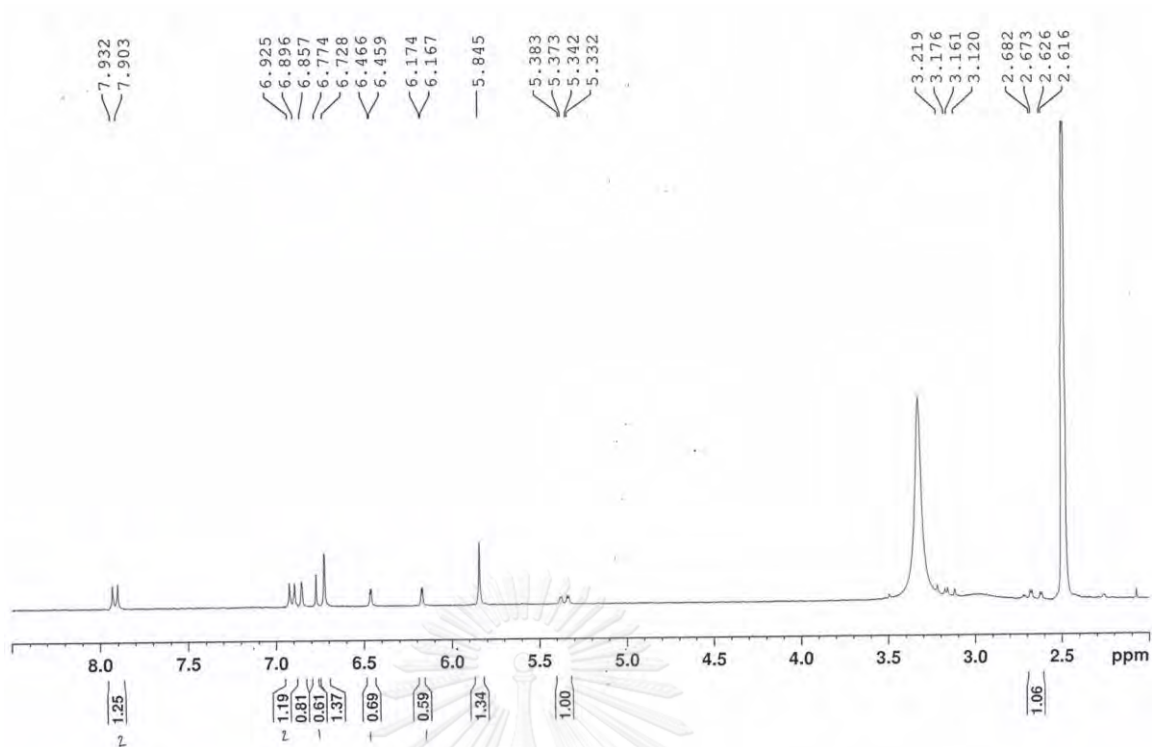
รูปที่ ข. 6.1 แสดง HMQC ของสาร TS2 (CDCl_3)



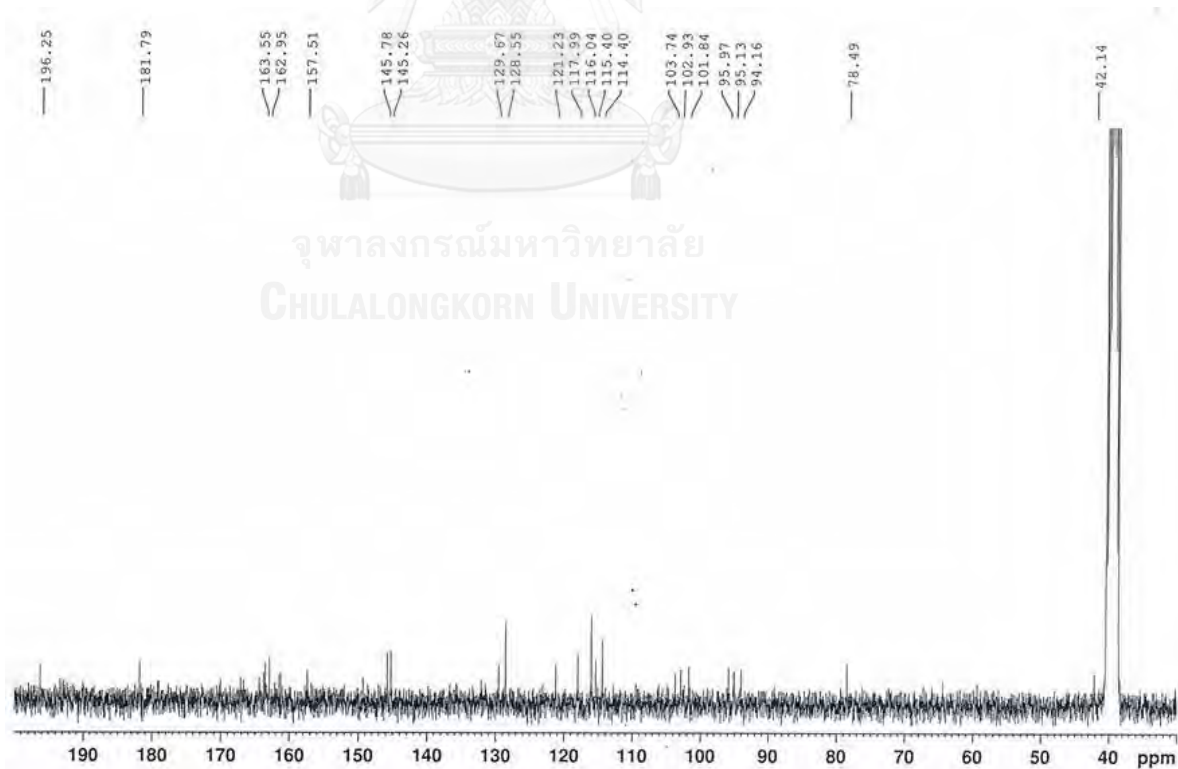
รูปที่ ข. 6.2 แสดง HMQC ของสาร TS2 (CDCl_3)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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



รูปที่ ข. 7.1 แสดง $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS3 (DMSO- d_6)



รูปที่ ข. 7.2 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ (300 Hz) spectrum ของสาร TS3 (DMSO- d_6)

บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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