

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิด

นายนนทเลิศ เลิศนิติกุล 5336541933

นางสาวปุกณญาดา จิตธรรม 5336548333

นางสาวลฎาภา ชันธ์คามโกชก์ 5336562033

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตร์บัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

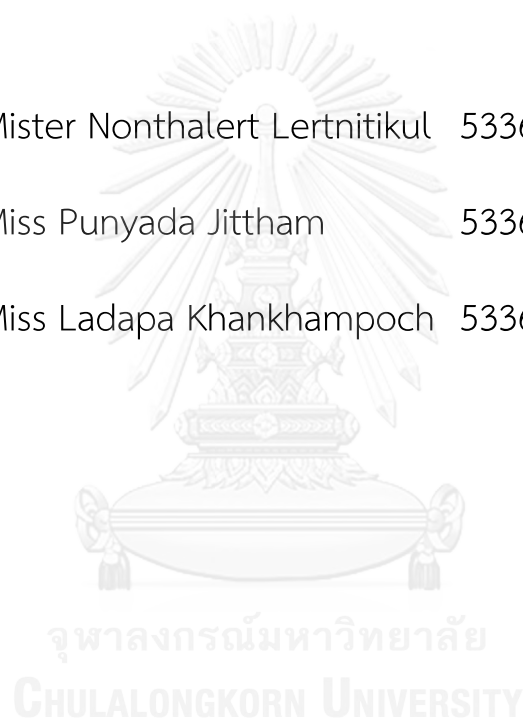
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Chemical constituents and bioactivities of selected
Paphiopedilum species

Mister Nonthalert Lertnitikul 5336541933

Miss Punyada Jittham 5336548333

Miss Ladapa Khankhampoch 5336562033



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	องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้ รองเท้านารีบางชนิด
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นายนนทเลิศ เลิศนิตกุล นางสาวปณญาดา จิตธรรม นางสาวลฎาภา ชันธ์คามโกชกั
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนาายา/เภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท	รศ. ร.ต.อ.หญิง ภญ. ดร.สุชาดา สุขหรั่ง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ. ภก. ดร.รุทธ์ สุทธิศรี

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

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

.....ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนาายา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรสุรพงษ์ เก็งทอง)

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.รุทธ์ สุทธิศรี)

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.

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์

ชื่อโครงการ	: องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิด		
หัวหน้าโครงการ	: นายนนทเลิศ เลิศนิติกุล	5336541933	
ผู้ร่วมโครงการ	: นางสาวปณญาดา จิตธรรม	5336548333	
	: นางสาวลภฎาภา ชันธ์คามโกษัก	5336562033	
อาจารย์ที่ปรึกษา	: รศ. ร.ต.อ.หญิง ภญ. ดร.สุชาดา สุขหรั่ง, รศ. ภก. ดร.รุทธ์ สุทธิศรี		
สาขา/ภาควิชา	: การค้นพบและพัฒนายา/เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์		

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) เป็นกล้วยไม้ที่ยังไม่เคยมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษารองเท้านารีบางชนิด โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค yeast cell-based assay ในการคัดกรองฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โพลิโอไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 4 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum*), รองเท้านารีเหลืองตรัง (*P. godefroyae*), รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*P. exul*) และรองเท้านารีฝ้ายหอม (*P. bellatulum*) พบว่าสารสกัดจากรากของรองเท้านารีเหลืองตรังมีฤทธิ์ดีที่สุด จึงทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวชี้้นำ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 10 ชนิด คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 1 ชนิด ได้แก่ pinocembrin และสารกลุ่มสติลบิน 9 ชนิด ได้แก่ 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran, 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol, 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene, 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene, 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran, 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene, 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran, 2,3'-dihydroxy-5,5'-dimethoxystilbene และ 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene โดยสารสติลบิน 2 ชนิด คือ สาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran และ 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene เป็นสารธรรมชาติชนิดใหม่ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อ small cell lung cancer (NCI-H187) ของสารทั้ง 10 ชนิด พบว่าสารที่มีฤทธิ์แรงที่สุดคือ 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl) benzofuran มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.53 µg/ml เมื่อเทียบกับสารควบคุมผลบวก ellipticine และ doxorubicin ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.46 และ 0.07 µg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีสติลบินอีก 5 ชนิด ที่มีฤทธิ์แรง และอีก 2 ชนิดมีฤทธิ์ปานกลาง แสดงถึงศักยภาพของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไปในอนาคต

คณะเภสัชศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต

.....

บทคัดย่อและฉบับข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาานิพนธ์ที่ปรึกษาในคลังปัญญาจุฬาฯ (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.

Abstract**Senior project title** : Chemical constituents and bioactivities of selected *Paphiopedilum* species**Students' name** : Mr. Nonthalert Lertnitikul 5336541933

: Miss Punyada Jittham 5336548333

: Miss Ladapa Khankhampoch 5336562033

Advisor/Co-advisor : Assoc. Prof. Suchada Sukrong Ph.D./Assoc. Prof. Rutt Suttisri Ph.D.**Field/Department** : Drug discovery and development/

Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Previously, the chemical constituents and bioactivities of *Paphiopedilum* orchids had never been studied. Our group is therefore interested in the research on the constituents and biological activities of selected *Paphiopedilum* species. This research project has employed yeast cell-based assay in the screening for cytotoxicity and topoisomerase I inhibitory activity of four *Paphiopedilum* orchids including *P. niveum*, *P. godefroyae*, *P. exul* and *P. bellatulum*. The extract from the roots of *P. godefroyae*, which exhibited the strongest activity, was selected for the bioactivity-guided isolation of pure compounds through column chromatographic technique. Ten compounds were isolated including a flavonoid, i.e. pinocembrin, and nine stilbenes, i.e. 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxy benzofuran, 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol, 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene, 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene, 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl) benzo furan, 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene, 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran, 2,3'-dihydroxy-5,5'-dimethoxystilbene and 3,4'-dihydroxy-5-methoxy stilbene. Two of these stilbenes, i.e. 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzo furan and 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene, are new natural compounds. All compounds were assayed for their cytotoxicity toward small cell lung cancer (NCI-H187) cell line. 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl) benzofuran displayed the strongest activity with an IC₅₀ value of 1.53 µg/ml, compared with ellipticine and doxorubicin as the positive controls (IC₅₀ values of 4.46 and 0.07 µg/ml, respectively). Our results indicate the potential of *Paphiopedilum* orchids to be developed as anticancer agents in the future.

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Student's signature

บทคัดย่อและไฟล์ข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะเภสัชศาสตร์ (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

โครงการปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อันมีวัตถุประสงค์ให้บัณฑิตเภสัชศาสตร์ได้ฝึกฝนตนเองให้มีความสามารถในการคิดและแก้ปัญหาอย่างเป็นระบบ มีความรู้ความสามารถในการวางแผนการดำเนินงาน สามารถร่วมพัฒนาและสรรค์สร้างงานทางด้านเภสัชศาสตร์จากองค์ความรู้ที่ได้รับจากการเรียนการสอนได้

รายงานโครงการปริญญาโทนี้จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอผลการวิจัยในหัวข้อเรื่ององค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีบางชนิด โดยเนื้อหาของรายงานโครงการปริญญาโทนี้ประกอบด้วยรายละเอียดเกี่ยวกับขั้นตอนและกระบวนการทำวิจัย ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ รวมถึงเนื้อหาเกี่ยวกับสารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเทคนิคที่ใช้ในการทำวิจัย พร้อมทั้งรายละเอียดเรื่องผลการวิจัย การวิเคราะห์ การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย เพื่อให้รายงานโครงการปริญญาโทนี้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ที่สนใจ

รายงานโครงการปริญญาโทนี้ ได้จัดทำขึ้นด้วยความตั้งใจของคณะผู้จัดทำ ทางคณะผู้จัดทำจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากนักน้อยและหากมีข้อบกพร่องประการใด ทางคณะผู้จัดทำใคร่ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย



คณะผู้จัดทำ

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทฉบับนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. ร.ต.อ.หญิง ภญ. ดร. สุชาดา สุขทรง อาจารย์ที่ปรึกษา และ รศ. ภก. ดร.รุทธ์ สุทธิศรี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณ คุณชุตีโชติ มั่งมี นักวิทยาศาสตร์ภาคิวิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ NMR spectrometry และ ภญ.นภัสวรรณ ภูริจารุโรจน์ นิสิตปริญญาโท ภาคิวิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ สำหรับการให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดสอบเบื้องต้นด้วยเชื้อยีสต์ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาโครงการปริญญาโท

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาคิวิชาเภสัชเวชและเภสัชพันธุศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยจนกระทั่งโครงการปริญญาโทฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี



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
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
คำนำ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	1
1.3 วิธีการดำเนินงานโดยย่อ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2. ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	3
2.1 กล้วยไม้.....	3
2.2 Bioassay-guided fractionation.....	8
2.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 โดยใช้ yeast cell-based assay.....	8
3. วิธีการดำเนินการวิจัย.....	10
3.1 พิษสมุนไพรร สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....	10
3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบเบื้องต้น.....	12
3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบ จากกล้วยไม้รองเท้านารี 4 ชนิด.....	13
3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 โดยใช้ yeast cell-based assay.....	13
3.5 การสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีของรากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง.....	14
3.6 ทดสอบเอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี.....	20
3.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ จากรากรองเท้านารีเหลืองตรัง.....	20

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4. ผลการวิจัย.....	21
4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบ จากกล้วยไม้รองเท้านารี.....	21
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโปโอซอเมอเรสชนิดที่ 1 ของสารสกัดหยาบ จากรากของกล้วยไม้รองเท้านารี 4 ชนิด	22
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโปโอซอเมอเรสชนิดที่ 1 ในสารสกัดส่วนราก ของรองเท้านารีเหลืองตรัง.....	23
4.4 โครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 10 ชนิด ที่สกัดแยกได้จากรากของรองเท้านารีเหลืองตรัง.....	24
4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารบริสุทธิ์.....	39
4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์.....	39
5. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	41
รายการอ้างอิง	43
ภาคผนวก.....	45


 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.

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	น้ำหนักสดและแห้งของกล้วยไม้รองเท้านารี 4 ชนิด..... 13
ตารางที่ 2	แสดง fractions ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเมทานอล..... 14
ตารางที่ 3	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-3..... 15
ตารางที่ 4	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-33..... 15
ตารางที่ 5	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-331 16
ตารางที่ 6	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-3313 16
ตารางที่ 7	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-35..... 16
ตารางที่ 8	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-355 17
ตารางที่ 9	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-37..... 17
ตารางที่ 10	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-372..... 17
ตารางที่ 11	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-3722 18
ตารางที่ 12	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-39..... 18
ตารางที่ 13	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-394..... 19
ตารางที่ 14	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-3941 19
ตารางที่ 15	แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-310..... 19
ตารางที่ 16	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบกล้วยไม้รองเท้านารี 21
ตารางที่ 17	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ของ CPT (positive control)..... 22
ตารางที่ 18	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ของ DMSO (vehicle control)..... 22
ตารางที่ 19	สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ในสารสกัดหยาบส่วนราก ของ PE, PN, PG และ PB โดยใช้เซลล์ยีสต์ 23
ตารางที่ 20	สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ของสารสกัดส่วนราก ของ PG ทั้งหมด 5 fractions โดยใช้เซลล์ยีสต์ 23
ตารางที่ 21	แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-1 ใน CDCl_3 25
ตารางที่ 22	แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-2 และ 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol ใน CDCl_3 27
ตารางที่ 23	แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-3 และ pinocembrin ใน CDCl_3 28
ตารางที่ 24	แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-4 ใน CDCl_3 30
ตารางที่ 25	แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-5 (ใน CDCl_3) และ 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxy stilbene (ใน CD_3OD) 31

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 (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 26 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-6 (ใน CDCl_3) และ 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran (ใน aectone- d_6).....	33
ตารางที่ 27 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-7 (ใน CDCl_3) และ 2,3'-dihydroxy-5'-methoxy stilbene (ใน CD_3OD).....	34
ตารางที่ 28 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-8 (ใน CDCl_3) และ 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran ใน (acetone- d_6).....	35
ตารางที่ 29 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-9 (ใน CDCl_3) และ 2,3'-dihydroxy-5'-methoxy stilbene (ใน CD_3OD).....	37
ตารางที่ 30 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-10 (ใน CDCl_3) และ 2,3'-dihydroxy-5'-methoxy stilbene (ใน CD_3OD).....	38
ตารางที่ 31 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารจากรากรองเท้านารีเหลืองตรัง.....	39
ตารางที่ 32 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์	40


 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.

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (<i>Paphiopedilum exul</i>).....	4
รูปที่ 2 รองเท้านารีขาวสตูล (<i>Paphiopedilum niveum</i>).....	5
รูปที่ 3 รองเท้านารีเหลืองตรัง (<i>Paphiopedilum godefroyae</i>).....	6
รูปที่ 4 รองเท้านารีฝาหอย (<i>Paphiopedilum bellatulum</i>).....	7
รูป A1 แผนภาพแสดงการแยกสารด้วยวิธี column chromatography	46
รูป A2 แสดง ¹ H-NMR spectrum ของสาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1)	47
รูป A3 แสดง ¹³ C-NMR spectrum ของสาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1).....	48
รูป A4 แสดง HMBC spectrum ของสาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1).....	49
รูป A5 แสดง ¹ H-NMR spectrum ของสาร 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol (P-2).....	50
รูป A6 แสดง ¹³ C-NMR spectrum ของสาร 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol (P-2).....	51
รูป A7 แสดง ¹ H-NMR spectrum ของสาร pinocembrin (P-3).....	52
รูป A8 แสดง ¹³ C-NMR spectrum ของสาร pinocembrin (P-3).....	53
รูป A9 แสดง ¹ H-NMR spectrum ของสาร 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene (P-4).....	54
รูป A10 แสดง ¹³ C-NMR spectrum ของสาร 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene (P-4).....	55
รูป A11 แสดง ¹ H-NMR spectrum ของสาร 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (P-5).....	56
รูป A12 แสดง ¹³ C-NMR spectrum ของสาร 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (P-5).....	57
รูป A13 แสดง ¹ H-NMR spectrum ของสาร 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran (P-6).....	58
รูป A14 แสดง ¹³ C-NMR spectrum ของสาร 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran (P-6).....	59
รูป A15 แสดง ¹ H-NMR spectrum ของสาร 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene (P-7).....	60
รูป A16 แสดง ¹³ C-NMR spectrum ของสาร 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene (P-7).....	61

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.

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูป A17 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)- 6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-8).....	62
รูป A18 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)- 6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-8).....	63
รูป A19 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร 2,3'-dihydroxy-5,5'- dimethoxystilbene (P-9).....	64
รูป A20 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 2,3'-dihydroxy-5,5'- dimethoxystilbene (P-9).....	65
รูป A21 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene (P-10)	66
รูป A22 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene (P-10).....	67


 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
 เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

กล้วยไม้เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งในปัจจุบันพบได้มากกว่า 20,000 ชนิด แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ และถือได้ว่าเป็นวงศ์ของพืชดอกที่มีความหลากหลายมากเป็นอันดับ 2 รองจากวงศ์ Compositae¹ มีการค้นพบสารกลุ่มต่างๆในกล้วยไม้มากมาย เช่น alkaloids, bibenzyls, flavonoids, phenanthrenes, และ terpenoids สารกลุ่มเหล่านี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ขับปัสสาวะ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านชัก และคลายกล้ามเนื้อ เป็นต้น ด้วยเหตุนี้กล้วยไม้จึงถูกนำมาใช้ทางการแพทย์พื้นบ้านในหลายๆประเทศ¹ เช่น ในอินเดียมีการนำสารสกัดด้วยน้ำจากรากของ *Vanda tessellate* มาใช้รักษาโรคทางระบบสืบพันธุ์² ในขณะที่กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในทางการแพทย์แผนจีน เพื่อลดไข้และบำรุงร่างกาย อีกทั้งยังมีการนำสาร moscatilin ซึ่งสกัดได้จากลำต้นของ *Dendrobium loddigesii* มาพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งอีกด้วย³

ด้วยความที่กล้วยไม้มีความสวยงามโดดเด่นและมีความหลากหลายของรูปร่างลักษณะอันน่ามหัศจรรย์ ทำให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในบรรดาพืชพรรณที่มนุษย์รู้จักและให้ความสนใจมากที่สุด แต่ทั้งนี้ยังมีพืชในวงศ์ Orchidaceae อีกหลายสกุลที่ไม่เคยมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน เช่น กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) คณะผู้ดำเนินการจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีบางชนิดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวนำ (bioassay-guided fractionation)

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีบางชนิดด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวชี้นำ
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้

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. จัดหากล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 4 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul*), รองเท้านารีขาวสตูล (*P. niveum*), รองเท้านารีเหลืองตรัง (*P. godefroyae*) และรองเท้านารีฝ้ายหอม (*P. bellatulum*) จากตลาดต้นไม้จตุจักร
2. แยกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีทั้ง 4 ชนิด เป็นส่วนเหนือดินและส่วนราก นำมาล้างให้สะอาด บดหยาบๆ ให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบให้แห้ง จากนั้นจึงแช่สกัดด้วยเมทานอล ก่อนจะกรองและนำสิ่งที่กรองได้ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract)
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบ โดยส่งไปทดสอบที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ) พร้อมทั้งทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 (topoisomerase I; TOP I) โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ได้รับการตัดต่อยีนแล้วไปพร้อมกัน (yeast cell-based assay)
4. เลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี column chromatography
5. ศึกษาโครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้
6. ส่งสารบริสุทธิ์ที่ทราบโครงสร้างแล้วไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้จากกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี
2. ผลการทดลองที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นความรู้พื้นฐาน เพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไปในอนาคตได้

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

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 กล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งประกอบไปด้วยสกุลต่างๆ มากมาย เช่น *Vanda*, *Dendrobium*, *Bulbophyllum*, *Eria*, *Coelogyne*, *Haemaria* และ *Paphiopedilum* สามารถพบกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ได้มากกว่า 20,000 ชนิดทั่วโลก⁴ โดยพบในประเทศไทยประมาณ 1,230 ชนิด จาก 170 สกุล⁵

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ในวงศ์ย่อย Cypripedioideae สกุล *Paphiopedilum* ซึ่งมีอยู่ประมาณ 80-85 ชนิด ขึ้นตามพื้นดินหรืออิงอาศัยตามก้อนหิน โดยเฉพาะหินปูนหรือคบไม้ ลำต้นขนาดเล็ก ไม่มีลำต้นเทียมหรือลำลูกกล้วย (pseudobulb) ใบเรียงพับซ้อนกัน มีกาบใบ ช่อดอกมีดอกเดี่ยวหรือหลายดอก ก้านช่อดอกส่วนมากมีขนปกคลุม ใบประดับส่วนมากติดทน กลีบเลี้ยงด้านหลัง (dorsal sepal) มักจะมีขนาดใหญ่ กลีบเลี้ยงกลีบข้างเชื่อมติดกัน (synsepalum) กลีบดอกแยกกัน กลีบคูในทางออกหรือห้อยลง บางครั้งบิดเวียน กลีบปาก (lip) เป็นถุง เสาเกสร (column) ไม่มีฝากรอบ มีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (staminode) เป็นแผ่นปิดอยู่ อับเรณูที่สมบูรณ์ 2 อัน อยู่ด้านข้าง รังไข่มีช่องเดียว อยู่ใต้วงกลีบ เชื่อมติดก้านดอก ส่วนมากมีขนปกคลุม ยอดเกสรเพศเมียหยัก 3 พู ผลเป็นแบบแคปซูลและมีเมล็ดขนาดเล็กจำนวนมาก⁶

ในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีได้ประมาณ 14 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีคางกบ (*Paphiopedilum callosum*), รองเท้านารีคางกบคอแดง (*P. appletonianum*), รองเท้านารีขาวสตูล (*P. niveum*), รองเท้านารีขาวพังงา (*P. thaianum*), รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor*), รองเท้านารีเหลืองตรัง (*P. godefroyae*), รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*P. exul*), รองเท้านารีเหลืองเลย (*P. hirsutissimum*), รองเท้านารีฝายหอย (*P. bellatulum*), รองเท้านารีเมืองกาญจน์ (*P. parishii*), รองเท้านารีอินทนนท์ (*P. villosum*), รองเท้านารีปีกแมลงปอ (*P. sukhakulii*), รองเท้านารีตอยตุ้ง (*P. charlesworthii*) และรองเท้านารีตอยตุ้งกาญจน์หรือรองเท้านารีเวศย์วรุฒม์ (*P. vejarutiana*) ซึ่งทุกชนิดถูกประกาศให้เป็นพืชอนุรักษ์ในบัญชีที่ 1 ของ CITES⁶

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.

กล้วยไม้ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 4 ชนิด ดังนี้

1. รองเท้านารีเหลืองกระบี่⁶



รูปที่ 1 รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul*)

ชื่อภาษาไทย: รองเท้านารีเหลืองกระบี่

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe

ชื่อพ้อง: *Cordula exul*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นกล้วยไม้ขึ้นบนหินปูน ใน 1 ต้นมี 4-5 ใบ รูปแถบ ยาวได้ถึง 35 ซม. ปลายใบจักมนตื้นๆ 2 พู ขนาดไม่เท่ากัน ช่อดอกมีดอกเดี่ยว ก้านช่อดอกยาว 13-18 ซม. มีขนสั้นนุ่ม ใบประดับสีเขียวหรืออมเหลือง รูปรีแคบ ๆ ยาว 4-4.4 ซม. กลีบเลี้ยงกลีบหลังสีขาว มีจุดน้ำตาลอมแดงที่โคนมีสีเหลือง แผ่นกลีบรูปไข่ ยาว 3-4.8 ซม. ปลายกลีบมน มีขนสั้นนุ่มด้านนอก กลีบเลี้ยงที่เชื่อมติดกันสีเหลืองอมเขียว เส้นกลีบสีเข้ม รูปรีหรือรูปขอบขนาน ยาว 3.4-4.7 ซม. กลีบดอกสีเหลืองอ่อน เส้นกลีบสีเข้ม มีจุดสีน้ำตาลแดงช่วงโคนกลีบกระจาย มีขนสั้นนุ่มสีม่วงที่โคน แผ่นกลีบรูปใบหอกกลับ ยาว 4.3-5 ซม. ปลายกลีบมน ขอบเป็นคลื่น มีขนครุย ฐานกลีบปากยาว 3-3.5 ซม. แผ่นเกสรเพศผู้ที่เป็นหมันรูปไข่กลับ ยาว 6-8 มม. กลางแผ่นมีต่อมใส รังไข่ยาว 2.2-4 ซม. (รวมก้านดอก)

รองเท้านารีเหลืองกระบี่เป็นพืชถิ่นเดียวของไทย พบเฉพาะทางภาคใต้แถบจังหวัดชุมพร พังงา และกระบี่ ขึ้นกระจายห่างๆ ใต้ร่มเงาบนเขาหินปูนในป่าดิบชื้นที่ระดับความสูงไม่เกิน 50 เมตร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

2. รองเท้านารีขาวสตูล⁶



รูปที่ 2 รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum*)

ชื่อภาษาไทย: รองเท้านารีขาวสตูล

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Paphiopedilum niveum* (Reichb.f.) Stein

ชื่อพ้อง: *Cypripedium niveum*

ชื่ออื่น: รองเท้านารีดอกขาว

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยหรือขึ้นตามพื้นดิน ใน 1 ต้นมี 4-5 ใบ รูปขอบขนาน รูปใบหอก หรือรูปแถบ ยาว 8-19 ซม. ปลายใบกลม หยักเว้า แผ่นใบด้านบนมีลายสีเขียวเข้ม ด้านล่างมีจุดสีม่วงหนาแน่น โคนมีขนครุย ช่อดอกมี 1-2 ดอก ก้านช่อดอกยาวได้ประมาณ 20 ซม. มีขนสั้นนุ่ม ใบประดับรูปไข่ สีขาวหรือสีเขียวอ่อน มีจุดสีม่วง ยาว 1-1.4 ซม. ดอกสีขาว มีจุดสีม่วงเป็นทาง ด้านนอกมีขนสั้นนุ่ม กลีบเลี้ยงสีขาว กลีบหลังรูปไข่กว้าง ยาว 2.7-4.2 ซม. กลีบที่เชื่อมติดกันรูปไข่ ยาว 2-3 ซม. กลีบดอกสีขาว รูปรี ยาว 3.3-4.3 ซม. ปลายกลีบมักจักซี่ฟันตื้น ๆ ฐานกลีบปากยาว 2.2-3.6 ซม. แผ่นเกสรเพศผู้ที่เป็นหมันมีสีเหลืองแซม ด้านกว้างยาวกว่าด้านยาว ยาว 6-9 มม. ปลายแผ่นจัก 1-3 จัก รังไข่ยาวประมาณ 4.5 ซม. (รวมก้านดอก) มีขนสั้นนุ่ม

รองเท้านารีขาวสตูลมีเขตการกระจายพันธุ์แคบๆ พบเฉพาะที่คาบสมุทรมลายูและภาคใต้ของไทยแถบจังหวัดตรังและสตูล ขึ้นตามเขาหินปูนในป่าดิบชื้น ที่ระดับความสูงไม่เกิน 200 เมตร

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. รองเท้านารีเหลืองตรัง⁶



รูปที่ 3 รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paphiopedilum godefroyae*)

ชื่อภาษาไทย: รองเท้านารีเหลืองตรัง

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Paphiopedilum godefroyae* (God.-Leb.) Stein

ชื่อพ้อง: *Cypripedium godefroyae*

ชื่ออื่น: รองเท้านารีกระบี่, รองเท้านารีเหลืองพังงา, เอื้องฝาหอย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นกล้วยไม้ขึ้นบนดินหรือตามหินปูน ใน 1 ต้นมี 4-6 ใบ รูปขอบขนานหรือรูปใบหอก ยาวได้ถึง 14 ซม. ปลายใบมน แผ่นใบมีจุดสีม่วงทั่วไปด้านล่าง ขอบใบช่วงล่างมีขนครุย ช่อดอกส่วนมากมี 1-2ดอก ก้านช่อดอกยาว 4-8 ซม. มีขนสั้นนุ่ม ใบประดับสีม่วง รูปไข่ ยาวประมาณ 1.5 ซม. พับซ้อนกัน มีขนสั้นนุ่ม ดอกสีขาวหรือสีครีมอมเหลืองอ่อน ๆ มีจุดสีม่วงทั่วไป มีขนสั้นนุ่มด้านนอก กลีบเลี้ยงกลีบหลังรูปไข่กว้าง ยาว 2.5-4.6 ซม. ปลายกลีบมนหรือกลม กลีบเลี้ยงที่เชื่อมติดกันรูปไข่ ยาว 2-4.5 ซม. ปลายกลีบมน กลีบดอกรูปรีหรือรูปขอบขนาน ยาว 3.5-6 ซม. ปลายกลีบกลมหรือมน ขอบกลีบมักเป็นคลื่น ฐานกลีบปากยาว 2.5-4.2 ซม. แผ่นเกสรเพศผู้ที่เป็นหมันรูปรี ยาวประมาณ 7 มม. ปลายจักตื้น ๆ 1-3 จัก มีขนสั้นนุ่ม ขอบมีขนครุย รังไข่ยาวประมาณ 4 ซม. (รวมก้านดอก) มีขนสั้นนุ่ม

รองเท้านารีเหลืองตรังเป็นพืชถิ่นเดียวของไทย พบเฉพาะทางภาคใต้แถบจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ตรัง ขึ้นตามที่ร่มเงาของเขาหินปูนในป่าดิบชื้น ที่ระดับความสูงไม่เกิน 100 เมตร

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. รองเท้านารีฝาหอย⁶



รูปที่ 4 รองเท้านารีฝาหอย (*Paphiopedilum bellatulum*)

ชื่อภาษาไทย: รองเท้านารีฝาหอย

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Paphiopedilum bellatulum* (Rchb.f.) Stein

ชื่อพ้อง: *Cypripedium bellatulum*

ชื่ออื่น: เอื้องอิง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: เป็นกล้วยไม้ขึ้นตามหินปูน ใน 1 ต้นมี 4-5 ใบ รูปรีหรือรูปขอบขนาน ยาวได้ 11-18 ซม. ปลายใบหยักเว้าแหลมหรือมน เบี้ยว แผ่นใบด้านบนมีลายสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม มีจุดสีม่วงหนาแน่นด้านล่าง ช่อดอกมี 1-2 ดอก ก้านยาว 2-4.5 ซม. สีเขียวอมม่วง มีลายสีน้ำตาลแดง มีขนสั้นนุ่ม ใบประดับรูปไข่ สีเขียวอ่อน มีจุดสีม่วง พับซ้อนกัน ปลายแหลมหรือมน ยาว 2.3-2.7 ซม. กลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีขาวหรือสีครีมอมเหลือง มีจุดสีม่วงอมแดงขนาดใหญ่กระจายทั่วไป มีขนสั้นนุ่มด้านนอก ขอบมีขนครุย กลีบเลี้ยงกลีบหลังรูปไข่กว้างหรือรูปรี ยาว 2.7-4 ซม. เว้าเข้า ปลายกลีบมนหรือเว้าบวม กลีบเลี้ยงที่เชื่อมติดกันรูปคล้ายรูปหัวใจ ยาว 2-3 ซม. ขอบเว้า ปลายกลมหรือมน กลีบดอกรูปรีกว้าง ยาว 4.5-6.3 ซม. เว้าเข้าเล็กน้อย ปลายกลีบกลม ฐานกลีบปาก ยาว 2.5-4.2 ซม. แผ่นเกสรเพศผู้ที่เป็นหมันคล้ายรูปหัวใจเกือบเป็นสี่เหลี่ยม ยาว 0.8-1.1 ซม. ปลายจักเป็นซี่ฟัน รั้งไข่ ยาวประมาณ 3 ซม. มีขนสั้นนุ่มและจุดสีม่วงอมแดง

รองเท้านารีฝาหอยมีเขตการกระจายพันธุ์แคบๆ พบที่พม่าและจีนตอนใต้ ในไทยพบกระจายห่างๆ ทางภาคเหนือ ขึ้นตามซอกเขาหินปูน ที่ระดับความสูง 900-1800 เมตร

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.

กล้วยไม้ประกอบไปด้วยสารสำคัญต่างๆ หลายชนิด ได้แก่ สารในกลุ่ม alkaloids, bibenzyls, flavonoids, phenanthrenes, และ terpenoids เป็นต้น ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ยกตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสาร 3,3'-dihydroxy-2',6'-bis(p-hydroxybenzyl)-5-methoxybibenzyl ที่สกัดได้จากกล้วยไม้ *Bletilla striata* และสาร 4,7-dihydroxy-2-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene ที่สกัดได้จากกล้วยไม้ *Dendrobium nobile* หรือฤทธิ์ต้านการอักเสบของสาร 2,6-dimethoxy-1,4,5,8-phenanthradiquinone ที่สกัดได้จากกล้วยไม้ *Gastrodia elata* นอกจากนี้ยังสามารถพบฤทธิ์ขับปัสสาวะ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านชัก และคลายกล้ามเนื้อได้อีกด้วย¹

2.2 Bioassay-guided fractionation

Bioassay-guided fractionation คือกระบวนการสกัดแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ออกเป็นส่วนสกัด (fraction) แล้วนำส่วนสกัดแต่ละส่วนมาวิเคราะห์หาฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะนำเฉพาะส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเท่านั้นมาสกัดแยกต่อไป ทำเช่นนี้ซ้ำไปเรื่อยๆ จนกระทั่งได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ⁷ ในปัจจุบันมีการนำกระบวนการแยกสารแบบ Bioassay-guided fractionation มาใช้ในหลายงานวิจัย เช่น การสกัดแยกสารจากต้นโกสน (*Codiaeum variegatum*) ที่สามารถต้านเชื้อบิด *Entamoeba histolytica* ได้⁸

2.3 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 โดยใช้ yeast cell-based assay

เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส (topoisomerase) เป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการจัดเรียงโครงสร้างของสายดีเอ็นเอ ทำให้ supercoiled DNA คลายตัว โดยการตัดสายดีเอ็นเอหนึ่งหรือทั้งสองสายของดีเอ็นเอ หลังจากจัดเรียงโครงสร้างของสายดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ว รอยตัดจะถูกเชื่อมต่อเข้าดังเดิม⁹ สามารถแบ่งเอนไซม์นี้ออกได้เป็น 2 ชนิด คือ เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 (topoisomerase I; TOP I) ทำหน้าที่จัดเรียงโครงสร้างของสายดีเอ็นเอ โดยการตัดสายดีเอ็นเอ เพียงหนึ่งสาย เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 2 (DNA topoisomerase II; TOP II) ซึ่งทำหน้าที่จัดเรียงโครงสร้างของสายดีเอ็นเอ โดยการตัดสายดีเอ็นเอทั้งสองสาย

กลไกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก กลไกแรกคือ ความพิษต่อเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 (TOP I poison) โดยมีสารที่เรียกว่า poison เป็นสารที่ทำให้เกิดโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า cleavage complex ซึ่งยับยั้งขั้นตอน relegation ของดีเอ็นเอ และกลไกที่สองคือการยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 (TOP I inhibitors) โดยมีสารที่เรียกว่า catalytic inhibitor เป็นสารที่ยับยั้งการจับกันของเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 กับดีเอ็นเอ¹⁰

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.

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 เป็นกลไกหนึ่งในการรักษาโรคมะเร็ง เนื่องจากจะทำให้ดีเอ็นเอไม่สามารถจำลองตัว (replication) ต่อไปได้ ตัวอย่างยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้แก่ ยาในกลุ่มแคมป์โทเธซิน (camptothecin)¹¹ ซึ่งปัจจุบันมีการนำเซลล์ยีสต์มาใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 มากขึ้น เนื่องจากยีสต์เป็นเซลล์ยูคาริโอตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน จีโนมมีความใกล้เคียงกับมนุษย์ แข็งแรงและสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งง่ายต่อการสังเกต ติดตาม ประเมินผล และผลการศึกษาที่ได้จะใกล้เคียงกับผลการศึกษาในมนุษย์เป็นอย่างมาก¹⁰



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชสมุนไพร สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

พืชสมุนไพร

กล้วยไม้รองเท้านารี 4 ชนิด คือ รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul*), รองเท้านารีขาวสตูล (*P. niveum*), รองเท้านารีเหลืองตรัง (*P. godefroyae*) และรองเท้านารีฝายหอย (*P. bellatulum*) ซึ่งจากร้านค้าในตลาดต้นไม้จตุจักร เมื่อเดือน ตุลาคม พ.ศ.2556 พิสูจน์เอกลักษณ์พืช โดยเทียบรูปจากสำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช พร้อมทั้งจัดทำตัวอย่างพืช (voucher specimen) ซึ่งได้นำไปเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

- Hexane
- Dichloromethane
- Ethyl acetate
- Acetone
- Methanol
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Camptothecin
- Bacto agar
- Yeast nitrogen base
- Amino acid
- D-galactose
- 1N NaOH
- Purified water
- Deuterated chloroform
- Deuterated acetone

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.

อุปกรณ์

- ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 250 และ 500 ml
- หลอดทดลอง
- กระจกตวง ขนาด 10, 50, 100 และ 500 ml
- Erlenmeyer flask ขนาด 250, 500 และ 1000 ml
- Flask ก้นกลม ขนาด 500 ml
- Separatory funnel
- Glass column สำหรับทำ column chromatography
- TLC tank
- แผ่น Thin layer chromatography (TLC) สำเร็จรูป
- ขวดแก้วสำหรับรับ fraction
- Capillary tube
- Eppendorf tube
- หลอดหยด
- แท่งแก้วคน
- กรวยแก้ว
- จุกยาง
- คีมคีบ
- Aluminum foil
- สำลี
- จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาด 50 และ 100 mm
- Micropipette tip
- Silica gel (40-60 mesh)
- Silica gel 60 F₂₅₄ TLC plates
- Sephadex LH-20



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.

เครื่องมือ

- เครื่องกลั่นตัวทำละลาย
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่อง rotary evaporator
- ภาชนะดูดความชื้น (desiccator)
- เครื่อง sonicator
- เครื่องฉายแสง UV (254 และ 365 nm)
- NMR spectrometer
- UV spectrometer
- Hot plate
- เครื่องบดสมุนไพร
- ตู้อบ
- Micropipette
- เครื่องปั่น vortex
- หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)
- ตู้บ่ม (incubator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- กล้องถ่ายรูป
- IR spectrometer
- Mass spectrometer

3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบเบื้องต้น

- นำกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 4 ชนิด มาแยกส่วนเหนือดินและส่วนรากออกจากกัน ล้างให้สะอาด ก่อนจะบดหยาบๆ ให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 45-55 °C ได้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 1
- นำตัวอย่างพืชแต่ละชนิดไปแช่สกัดในเมทานอล ด้วยวิธีการแช่อยู่ (maceration) โดยเติมเมทานอลให้ท่วมตัวอย่างพืชแต่ละชนิด (ปริมาณตั้งแต่ 5-30 มล.) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- กรองสิ่งสกัดที่ได้ด้วยสำลี แล้วนำไประเหยแห้งด้วย Rotary evaporator โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง ได้เป็นสารสกัดหยาบเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

ตารางที่ 1 น้ำหนักสดและแห้งของกล้วยไม้รองเท้านารี 4 ชนิดที่นำมาทดสอบ

ตัวอย่างพืช	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)
รองเท้านารีเหลืองกระบี่		
- ส่วนเหนือดิน (PE-A)	193	28
- ราก (PE-R)	168	19
รองเท้านารีขาวสตูล		
- ส่วนเหนือดิน (PN-A)	41	6
- ราก (PN-R)	63	8
รองเท้านารีเหลืองตรัง		
- ส่วนเหนือดิน (PG-A)	800	140
- ราก (PG-R)	1000	200
รองเท้านารีฝายหอย		
- ส่วนเหนือดิน (PB-A)	1400	240
- ราก (PB-R)	1200	300

3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากกล้วยไม้รองเท้านารี 4 ชนิด

ส่งสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 4 ชนิด ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ small cell lung cancer (NCI-H187), oral cavity cancer (KB) และ breast cancer cell line (MCF7) ณ ห้องปฏิบัติการการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อ.รังสิต จ.ปทุมธานี ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 50 µg/ml โดยมี ellipticine, doxorubicin และ tamoxifen เป็น positive control สารสกัดที่มี %inhibition สูงกว่า 50% จึงจะถือว่าเป็นฤทธิ์ (active)

3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 (TOP I) โดยใช้ yeast cell-based assay

เตรียมสารสกัดหยาบของกล้วยไม้รองเท้านารี 4 ชนิด คือ รองเท้านารีขาวสตูล (PN) รองเท้านารีเหลืองตรัง (PG) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (PE) และรองเท้านารีฝายหอย (PB) ที่ 3 ความเข้มข้นคือ 125, 250 และ 500 µg/ml ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 2 สูตร สูตรแรกคือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ TOP I (มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ) สูตรที่สองคือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ TOP I (มีกาแล็กโทสเป็นองค์ประกอบ) โดยมีแคมป์โทเธซิน (camptothecin; CPT) ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 µg/ml เป็น positive control และ dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น **บทความย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

1% เป็น vehicle control โดยในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้รับการถ่ายโอนหน่วยพันธุกรรมเอนไซม์ TOP I จากพืช *Arabidopsis thaliana* โดยมี expression vector ที่ใช้ในการแสดงออกคือ pYES-DEST52 ซึ่งมี *URA3* เป็น selectable marker และมี pGAL1 เป็น strong inducible promoter โดยสามารถถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ TOP I ได้ด้วยน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นหากยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ TOP I (มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ) ไม่ตอบสนองต่อ CPT แต่ยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ TOP I (มีกาแล็กโทสเป็นองค์ประกอบ) ตอบสนองต่อ CPT โดยไม่เติบโต จะถือว่าการทดลองให้ผลบวก หากยีสต์เติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตร จะถือว่าให้ผลลบ และหากยีสต์ไม่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตร แสดงว่าสารสกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไปจนอาจทำให้เซลล์ยีสต์ตายด้วยกลไกอื่น

3.5 การสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีของรากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง (ภาคผนวก)

นำรากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรังแห้งที่บดแล้วหนัก 200 g มาแช่สกัดด้วยเมทานอล 1 L จำนวน 3 ครั้ง ได้สารสกัดหยาบ 34.5 g จากนั้นแบ่งสารสกัดหยาบ 25 g มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยแบ่งสารสกัดหยาบเป็น 2 ส่วน

ส่วนแรก 10 g แยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel น้ำหนัก 300 g (42x4.5 cm) ส่วนที่สอง 15 g แยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 450 g (65x4.5 cm) เก็บ fraction ละ 30 ml ตรวจสอบแต่ละ fraction ด้วย TLC จะสามารถรวม fraction ที่มีองค์ประกอบเดียวกันได้ 4 fraction หลัก (PG-1 ถึง PG-4) แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-5) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง fractions ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเมทานอล

fraction	รวมจาก fraction ย่อย		น้ำหนัก (g)
PG-1	4-5	4-7	0.26
PG-2	8-9	8-10	0.90
PG-3	10-18	11-23	5.88
PG-4	19-43	24-58	1.36
PG-5	ชะ MeOH		16.81

นำ fraction PG-3 หนัก 5.88 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 295 g (38x4.5 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane : ethyl acetate (5:3) เก็บ fraction ละ 20 ml ได้ 117 fractions ตรวจสอบด้วย TLC จะรวมกันได้ 11 fractions (PG-31 ถึง PG-311) แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-312) ดังแสดงในตารางที่ 3

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.

ตารางที่ 3 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-3

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-31	4-13	0.11
PG-32	14-17	0.06
PG-33	18-28	0.75
PG-34	29-30	0.03
PG-35	31-44	0.23
PG-36	45-46	0.30
PG-37	47-52	0.48
PG-38	53-57	0.15
PG-39	58-79	0.82
PG-310	90-87	0.13
PG-311	88-117	0.32
PG-312	ชะ MeOH	0.56

นำ fraction PG-33 น้ำหนัก 0.75g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ Sephadex LH-20 (81x2.4 cm) ตัวทำละลายที่ใช้คือ acetone เก็บ fraction ละ 10 ml ได้ 37 fractions ตรวจสอบด้วย TLC ก่อนจะรวมกันได้ 3 fractions (PG-331 ถึง PG-333) ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นระเหยแห้ง fraction PG-333 ได้สาร P3 น้ำหนัก 18.2 mg

ตารางที่ 4 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-33

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-331	20-29	0.27
PG-332	30-32	0.13
PG-333	33-37	0.02

นำ fraction PG-331 น้ำหนัก 0.27 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 13.5 g (10x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane : dichloromethane (1:4) เก็บ fraction ละ 2 ml ได้ 32 fractions ตรวจสอบด้วย TLC ก่อนจะรวมกันได้ 4 fractions (PG-3311 ถึง PG-3314) แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-3315) ดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อระเหยแห้ง fraction PG-3311 ได้สาร P1 น้ำหนัก 6.6 mg

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.

ตารางที่ 5 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-331

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-3311	6-11	0.01
PG-3312	12-19	0.03
PG-3313	20-27	0.03
PG-3314	28-32	0.01
PG-3315	ชะ MeOH	0.05

นำ fraction PG-3313 น้ำหนัก 0.03 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 10 g (7.5x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane : dichloromethane (1:5) เก็บ fraction ละ 2 ml ได้ 55 fractions ตรวจสอบด้วย TLC ก่อนจะรวมกันได้ 2 fractions (PG-33131 ถึง PG-33132) แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-33133) ดังแสดงในตารางที่ 6 จากนั้นระเหยแห้ง fraction PG-33132 จะได้สาร P2 น้ำหนัก 6.0 mg

ตารางที่ 6 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-3313

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-33131	1-50	0.01
PG-33132	50-55	0.01
PG-33133	ชะ MeOH	0.01

นำ fraction PG-35 น้ำหนัก 0.23 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 23 g (18x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ dichloromethane : acetone (24:1) เก็บ fraction ละ 2 ml ได้ 32 fractions ตรวจสอบด้วย TLC รวมกันได้เป็น 6 fractions (PG-351 ถึง PG-356) แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-357) ดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อระเหยแห้ง fraction PG-351 และ fraction PG-353 ได้สาร P1 น้ำหนัก 0.9 mg และสาร P4 น้ำหนัก 6.0 mg ตามลำดับ

ตารางที่ 7 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-35

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-351	7-10	-
PG-352	11-14	0.10
PG-353	15-17	0.01
PG-354	24	0.10
PG-355	25-29	0.07
PG-356	30-32	0.10
PG-357	ชะ MeOH	0.20

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

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

นำ fraction PG-355 หนัก 0.07 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 10 g (7x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane : acetone (4:1) เก็บ fraction ละ 2 ml ได้ 19 fractions หลังตรวจสอบด้วย TLC รวมกันได้เป็น 3 fractions (PG-3551 ถึง PG-3553) ดังแสดงในตารางที่ 8 เมื่อระเหยแห้ง fraction PG-3553 ได้สาร P5 หนัก 2.0 mg

ตารางที่ 8 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-355

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-3551	3-8	0.02
PG-3552	9-11	0.03
PG-3553	12-19	-

นำ fraction PG-37 หนัก 0.48 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ Sephadex LH-20 (82x2.4 cm) ตัวทำละลายที่ใช้คือ acetone เก็บ fraction ละ 10 ml ได้ 40 fractions หลังตรวจสอบด้วย TLC รวมกันได้ 2 fractions (PG-371 ถึง PG-372) แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-37

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-371	18-28	0.17
PG-372	29-40	0.29

นำ fraction PG-372 หนัก 0.29 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 14.5 g (11.5x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane : ethyl acetate (3:2) เก็บ fraction ละ 2 ml ได้ 17 fractions รวมกันหลังตรวจสอบด้วย TLC ได้ 2 fractions (PG-3721 ถึง PG-3722) แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-3723) ดังแสดงในตารางที่ 10 จากนั้นระเหยแห้ง fraction PG-3721 ได้สาร P5 หนัก 1.9 mg

ตารางที่ 10 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-372

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-3721	4-15	-
PG-3722	16-17	0.05
PG-3723	ชะ MeOH	0.15

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 PG-3722 หนัก 0.05 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 10 g (7.2x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ dichloromethane : methanol (40:1) เก็บ fraction ละ 2 ml ได้ 42 fractions ตรวจสอบด้วย TLC แล้วรวมกันได้ 5 fractions (PG-37221 ถึง PG-37225) ดังแสดงในตารางที่ 11 จากนั้นระเหยแห้ง fraction PG-37221, PG-37223 และ PG-37225 ได้สาร P6 หนัก 6.6 mg, P5 หนัก 2.1 mg และ P7 หนัก 6.9 mg ตามลำดับ

ตารางที่ 11 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-3722

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-37221	4-7	0.01
PG-37222	8-30	0.01
PG-37223	31-35	-
PG-37224	36-38	0.01
PG-37225	39-42	0.01

นำ fraction PG-39 หนัก 0.82 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ Sephadex LH-20 (82x2.4 cm) ตัวทำละลายที่ใช้คือ acetone เก็บ fraction ละ 10 ml ได้ 33 fractions ตรวจสอบด้วย TLC ก่อนจะรวมกันได้ 5 fractions (PG-391 ถึง PG-395) ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-39

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-391	1-17	1.92
PG-392	18-19	0.06
PG-393	20-24	0.23
PG-394	25-27	0.59
PG-395	28-33	0.01

นำ fraction PG-394 หนัก 0.59 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 30 g (18x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane : ethyl acetate (1:1) เก็บ fraction ละ 10 ml ได้ 32 fractions หลังตรวจสอบด้วย TLC รวมกันได้ 3 fractions (PG-3941 ถึง PG-3943) แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-3944) ดังแสดงในตารางที่ 13

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 13 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-394

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-3941	4-14	0.42
PG-3942	15-24	0.08
PG-3943	25-32	0.03
PG-3944	ชะ MeOH	0.03

นำ fraction PG-3941 น้หนัก 0.42 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 21 g (21x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ dichloromethane : methanol (20:1) เก็บ fraction ละ 10 ml ได้ 23 fractions ตรวจสอบด้วย TLC รวมกันได้ 3 fractions (PG-39411 ถึง PG-39413) จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-39414) ดังแสดงในตารางที่ 14 เมื่อระเหยแห้ง fraction PG-39411 และ PG-39413 ได้สาร P8 น้หนัก 25.0 mg และ P9 น้หนัก 7.8 mg ตามลำดับ ตารางที่ 14 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-3941

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-39411	6-7	0.03
PG-39412	8-14	0.13
PG-39413	15-23	0.01
PG-39414	ชะ MeOH	0.01

นำ fraction PG-310 น้หนัก 0.13 g แยกต่อด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 10 g (7.3x2.4 cm) ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ dichloromethane : methanol (20:1) เก็บ fraction ละ 2 ml ได้ 25 fractions ตรวจสอบด้วย TLC ก่อนจะรวมกันได้ 6 fractions (PG-3101 ถึง PG-3106) แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล (PG-3107) ดังแสดงในตารางที่ 15 เมื่อระเหยแห้ง fraction PG-3106 ได้สาร P10 น้หนัก 6.1 mg

ตารางที่ 15 แสดง fractions ที่แยกได้จาก PG-310

fraction	รวมจาก fraction ย่อย	น้ำหนัก (g)
PG-3101	3-8	0.02
PG-3102	9-12	0.02
PG-3103	13-15	0.06
PG-3104	16-18	0.02
PG-3105	19-21	0.03
PG-3106	22-25	0.01
PG-3107	ชะ MeOH	0.01

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.

3.6 ทดสอบเอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี

- 3.6.1 เครื่อง mass spectrometer รุ่น 1260 infinity LC-MS/MS ที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
- 3.6.2 เครื่อง ^1H NMR spectrometer 300 MHz ที่คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.6.3 เครื่อง Fourier-transformed Infrared Spectrometer (FT-IR) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 3.6.4 เครื่องมือ Ultraviolet spectrophotometer รุ่น Evolution 600 PC ผลิตภัณฑ์ Thermo Fisher Scientific

3.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์จากรากรองเห้านารีเหลืองตรัง

ส่งสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้จากกรากรองเห้านารีเหลืองตรัง 10 ชนิด ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ small cell lung cancer (NCI-H187), oral cavity cancer (KB), breast cancer cell line (MCF7) และเซลล์ปกติ คือ Vero cell (African green monkey kidney) และหาค่า IC_{50} * ของการยับยั้งการเจริญของเซลล์ NCI-H187 ณ ห้องปฏิบัติการการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อ.รังสิต จ.ปทุมธานี ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ และมี ellipticine, doxorubicin และ tamoxifen เป็น positive control สารสกัดที่มี %inhibition สูงกว่า 50% จึงจะถือว่ามีฤทธิ์ (active)

*เกณฑ์การประเมินค่า แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม

1. ค่า $\text{IC}_{50} \leq 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ถือว่ามีฤทธิ์แรง (Active)
2. ค่า $\text{IC}_{50} > 20-100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ถือว่ามีฤทธิ์ปานกลาง (Moderately active)
3. ค่า $\text{IC}_{50} > 100-1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ ถือว่ามีฤทธิ์น้อย (Weakly active)
4. ค่า $\text{IC}_{50} > 1,000 \mu\text{g}/\text{ml}$ ถือว่าไม่มีฤทธิ์ (Inactive)

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 ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากกล้วยไม้รองเท้านารี

สารสกัดหยาบด้วยเมทานอลทั้ง 8 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187, KB และ MCF7 ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบกล้วยไม้รองเท้านารี

สาร/สารสกัด	NCI-H187		KB		MCF7	
	activity	IC ₅₀ (µg/ml)	activity	IC ₅₀ (µg/ml)	activity	IC ₅₀ (µg/ml)
รองเท้านารีเหลืองกระปี่						
- PE-A	Inactive	-	Inactive	-	Inactive	-
- PE-R	Inactive	-	Inactive	-	Inactive	-
รองเท้านารีขาวสตูล						
- PN-A	Inactive	-	Inactive	-	Inactive	-
- PN-R	Inactive	-	Inactive	-	Inactive	-
รองเท้านารีเหลืองตรัง						
- PG-A	Inactive	-	Inactive	-	Inactive	-
- PG-R	Active	17.47	Inactive	-	Inactive	-
รองเท้านารีฝายหอย						
- PB-A	Inactive	-	Inactive	-	Inactive	-
- PB-R	Active	45.06	Inactive	-	Inactive	-
Ellipticine	Active	2.21	Active	2.10	-	-
Doxorubicin	Active	0.110	Active	1.11	Active	14.29
Tamoxifen	-	-	-	-	Active	7.6


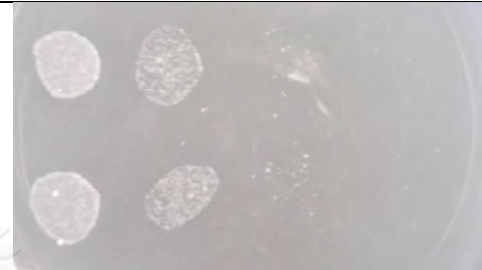
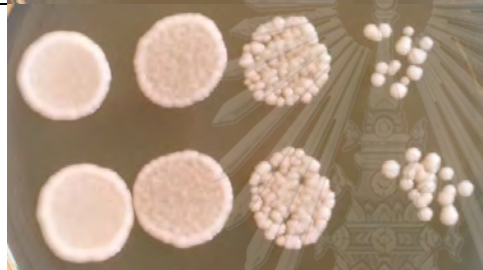
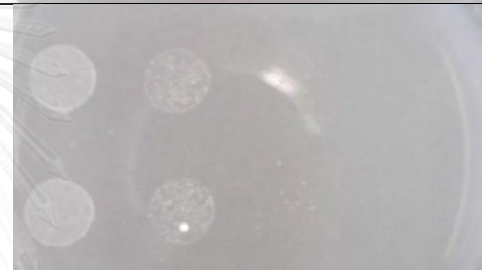


สารสกัดหยาบทั้ง 8 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง KB และ MCF7 แต่มีสารสกัด 2 ชนิดคือ สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนรากของรองเท้านารีเหลืองตรังและรองเท้านารีฝายหอยแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด small cell lung cancer (NCI-H187) โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 17.47 และ 45.06 µg/ml ตามลำดับ ทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนของรากของรองเท้านารีเหลืองตรังเพื่อทำการสกัดแยกสารบริสุทธิ์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้าน small cell lung cancer ต่อไป

**บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด**

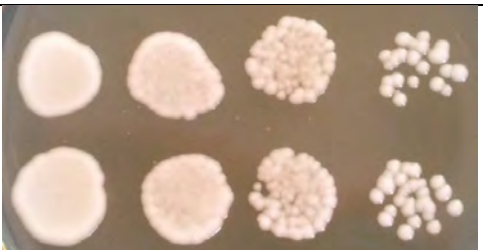

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ของสารสกัดหยาบจากรากของกล้วยไม้รองเท้านารี 4 ชนิด คือ PE, PN, PG และ PB โดยใช้เซลล์ยีสต์

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ของ CPT (positive control)

Conc. (µg/ml)	Glucose	Galactose
2.5		
5		
10		

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ของ DMSO (vehicle control)

Conc.	Glucose	Galactose
100%		

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 19 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ในสารสกัดหยาบส่วนรากของ PE, PN, PG และ PB โดยใช้เซลล์ยีสต์

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	PE		PN		PG		PB	
	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose
125								
250								
500								

สารสกัดหยาบส่วนรากของกล้วยไม้รองเท้านารีที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP1 มี 3 ชนิด คือ สารสกัดหยาบของ PE, PG และ PB

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ในสารสกัดส่วนรากของ PG 5 fractions คือ PG1, PG2, PG3, PG4 และ PG5 โดยใช้เซลล์ยีสต์

ตารางที่ 20 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP I ของสารสกัดส่วนรากของ PG ทั้งหมด 5 fractions โดยใช้เซลล์ยีสต์

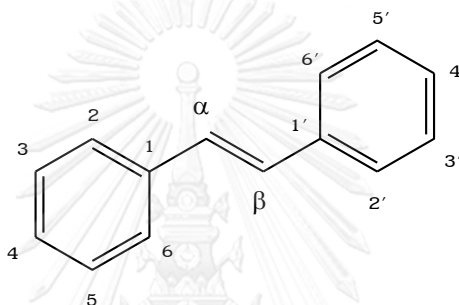
Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	PG1		PG2		PG3		PG4		PG5	
	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose	Glucose	Galactose
125										
250										
500										

สารสกัดส่วนรากของ PG ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ TOP1 มี 2 fractions คือ PG2 และ PG3

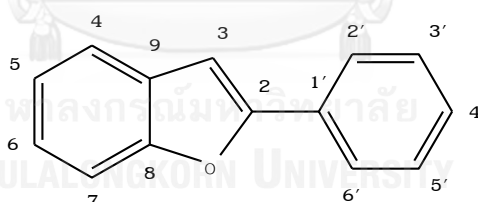
4.4 โครงสร้างทางเคมีของสารที่สกัดแยกได้จากรากของรองเท้านารีเหลืองตรัง (ภาคผนวก)

เมื่อนำรากของรองเท้านารีเหลืองตรังมาแช่สกัดด้วยเมทานอลและนำสารสกัดเมทานอลที่ได้ไปผ่านกระบวนการแยกด้วยวิธี column chromatography คณะผู้วิจัยสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 10 ชนิด เป็นสารใหม่ 2 ชนิด และสารที่เคยพบในพืชชนิดอื่นมาก่อนแล้ว 8 ชนิด สารทั้งหมดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ สารกลุ่ม flavonoid 1 ชนิด (สาร P-3) กับสารกลุ่ม stilbene 9 ชนิด โดยสารกลุ่ม stilbene มีโครงสร้างแกนแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ สาร P-2, P-4, P-5, P-7, P-9 และ P-10 มีโครงสร้างเป็น *trans*-1,2-diphenylethylene [*trans*-stilbene หรือ (*E*)-stilbene] โดยมีโครงสร้างแกนและระบบการนับตำแหน่งในโครงสร้าง ดังนี้

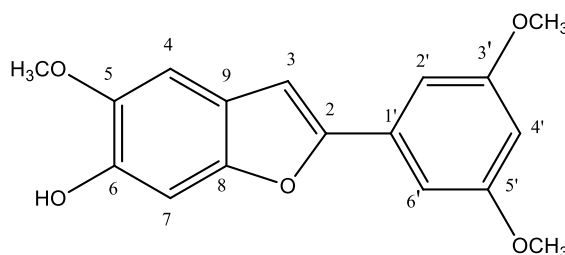


กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ สาร P-1, P-6 และ P-8 มีโครงสร้างเป็น 2-phenylbenzofuran โดยมีโครงสร้างแกนและระบบการนับตำแหน่งในโครงสร้าง ดังนี้



รายละเอียดเกี่ยวกับการศึกษาโครงสร้างของสารแต่ละชนิด มีดังต่อไปนี้

4.4.1 สาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1)



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

สาร P-1 ลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน มีปริมาณทั้งหมดที่สกัดแยกได้ 7.5 mg (คิดเป็น yield = 0.005% จากน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อละลายในเมทานอลแล้วนำไปวัดการดูดกลืนรังสี UV พบว่ามีค่า λ_{\max} ($\log \epsilon$)=220 (4.59) และ 325 (4.62) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี infrared spectroscopy (IR) พบว่ามี ν_{\max} ที่ 3489 (OH), 3010, 2936, 1604, 1472, 1329, 1211 และ 1154 cm^{-1} สารชนิดนี้เมื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง high resolution mass spectrometry (HR-MS) พบว่ามี pseudomolecular ion peak ($[M+H]^+$) ที่ 301.1071 (ค่าจากการคำนวณ คือ 301.1076) ซึ่งเทียบเท่ากับมีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$

สาร P-1 เป็น stilbene ซึ่งโดยปกติถ้าเป็น *trans*-stilbene จะคำนวณ degree of unsaturation (ซึ่งแสดงถึงจำนวนวงแหวนรวมกับจำนวนของพันธะคู่ในสูตรโครงสร้าง) ได้เพียง 9 แต่สำหรับสาร P-1 สามารถคำนวณได้เท่ากับ 10 แสดงว่ามีอีก 1 วงแหวนในโครงสร้าง จากการเกิด ether linkage จากตำแหน่งหนึ่งใน ethylene bridge ไปยังวงแหวน aromatic ในซีกหนึ่งของโมเลกุล เกิดเป็นโครงสร้างแบบ benzofuran ซึ่งมีหมู่ phenyl ต่ออยู่ตำแหน่ง 2 ยืนยันด้วยข้อมูล ^1H NMR (300 MHz) และ ^{13}C NMR (75 MHz) (ตารางที่ 23) ของตำแหน่ง 3 บน furan ring ซึ่งปรากฏเป็น proton singlet ที่ δ_{H} 6.96 (δ_{C} 101.4) ในขณะที่ส่วน benzene ring ของ benzofuran มีหมู่แทนที่ในตำแหน่ง 5 กับ 6 ทำให้โปรตอนของตำแหน่ง 4 กับ 7 ปรากฏเป็น singlet ที่ δ_{H} 6.88 (δ_{C} 101.9) และ 7.09 (δ_{C} 97.7) ตามลำดับ ส่วนหมู่ phenyl ในอีกซีกหนึ่งของโมเลกุลนั้น เมื่อพิจารณาจากข้อมูล NMR จะทราบว่าหมู่แทนที่ในลักษณะสมมาตรที่ตำแหน่ง 3' กับ 5' ทำให้โปรตอนของตำแหน่งที่ 2' กับ 6' ซึ่งสมมาตรกัน ปรากฏเป็น doublet ที่ chemical shift เดียวกันที่ δ_{H} 6.94 (δ_{C} 102.4) และต่างก็มี *meta*-coupling ($J = 2.2$ Hz) ไปยัง triplet ของโปรตอนตำแหน่ง 4' ที่ δ_{H} 6.94 (δ_{C} 100.4)

ตารางที่ 21 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-1 ใน CDCl_3

ตำแหน่ง	δ_{H}	δ_{C}	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	-	-	-
2	-	154.8 (s)	-
3	6.96 (s)	101.4 (d)	C-4, (C-5), C-8
4	6.88 (s)	101.9 (d)	(C-2),C-3,C-8,C-9
5	-	144.2 (s)	-
6	-	144.5 (s)	-
7	7.09 (s)	97.7 (d)	C-5, C-8, C-9
8	-	149.8 (s)	-
9	-	120.9 (s)	-

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

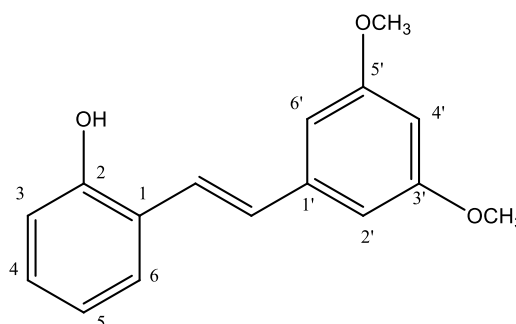
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 21 (ต่อ)

ตำแหน่ง	δ_{H}	δ_{C}	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1'	-	132.5 (s)	-
2'	6.94 (d, $J = 2.2$ Hz)	102.4 (d)	C-2, C-3', C-4', C-6'
3'	-	161.0 (s)	-
4'	6.41 (t, $J = 2.2$ Hz)	100.4 (d)	C-2', C-3', C-5', C-6'
5'	-	161.0 (s)	-
6'	6.94 (d, $J = 2.2$ Hz)	102.4 (d)	C-2, C-2', C-4', C-5'
5-OCH ₃	3.93 (s)	56.4 (q)	C-5
3'-OCH ₃	3.85 (s)	55.5 (q)	C-3'
5'-OCH ₃	3.85 (s)	55.5 (q)	C-5'

ข้อมูล NMR ยังแสดงให้เห็นว่า สาร P-1 นี้มีหมู่ methoxyl อยู่ 3 หมู่ในโครงสร้าง (δ_{C} 55.5, 55.5 และ 56.4) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรโมเลกุล ทำให้ทราบว่าหมู่แทนที่ซึ่งเหลืออยู่อีก 1 หมู่ คือ หมู่ hydroxyl โดยในโครงสร้างส่วนหมู่ phenyl มีการแทนที่เป็น 3',5'-dimethoxy และใน ส่วน benzofuran มีหมู่แทนที่ที่ ตำแหน่ง 5 เป็นหมู่ methoxyl กับตำแหน่ง 6 เป็นหมู่ hydroxyl ซึ่งลักษณะการแทนที่ในโมเลกุลซีก benzofuran นี้เข้ากับสารกลุ่ม stilbene ที่เคยมีรายงานมาก่อน ได้แก่ สาร 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (สาร P-8) ซึ่งสามารถเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กันได้ ทั้งยังยืนยันตำแหน่งของหมู่ methoxyl ที่ ตำแหน่ง 5 ได้จาก long-range HMBC correlations ระหว่างสัญญาณโปรตอนของตำแหน่ง 7 และ methoxyl proton ของตำแหน่ง 5 (δ_{H} 3.93, s) มายังสัญญาณคาร์บอนตำแหน่ง 5 ที่ δ_{C} 144.2 แต่ความแตกต่างของการแทนที่ในอีกซีกหนึ่งของโมเลกุล (ส่วน phenyl) ทำให้โครงสร้างของ stilbene P-1 จัดเป็นโครงสร้างของสารใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนจากธรรมชาติ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ให้ชื่อสารนี้ว่าคือ สาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran

4.4.2 สาร 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol (P-2)



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

สาร P-2 ลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล สกัดแยกได้ในปริมาณ 6.0 mg (คิดเป็น yield = 0.004% จากน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับสารที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าเป็นสารในกลุ่ม *trans-stilbene* ชื่อ 2-[(*E*)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_3$ ตารางที่ 24 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ระหว่างสาร P-2 กับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน¹²

ตารางที่ 22 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-2 และ 2-[(*E*)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol ใน CDCl_3

ตำแหน่ง	P-2		2-[(<i>E</i>)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	123.7 (s)	-	123.6 (s)
2	-	153.2 (s)	-	153.2 (s)
3	6.81 (d, $J = 7.5$ Hz)	115.9 (d)	6.71 - 6.76 (m)	115.9 (d)
4	7.14 (t, $J = 2.2$ Hz)	129.9 (d)	7.15 - 7.21 (m)	129.7 (d)
5	6.94 (t, $J = 2.2$ Hz)	121.0 (d)	6.96 - 7.01 (m)	120.9 (d)
6	7.52 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz)	128.7 (d)	7.75 (m)	128.7 (d)
α	7.36 (d, $J = 16.4$ Hz)	124.5 (d)	7.43 (d, $J = 16.5$ Hz)	124.4 (d)
β	7.05 (d, $J = 16.4$ Hz)	127.2 (d)	7.10 (d, $J = 16.5$ Hz)	127.1 (d)
1'	-	139.7 (s)	-	139.7 (s)
2'	6.69 (d, $J = 2.4$ Hz)	104.6 (d)	6.96 - 7.01 (m)	104.6 (d)
3'	-	160.9 (s)	-	160.8 (s)
4'	6.40 (t, $J = 16.4$ Hz)	100.0 (d)	6.45 (t, $J = 2.1$ Hz)	99.9 (d)
5'	-	160.9 (s)	-	160.8 (s)
6'	6.69 (d, $J = 2.4$ Hz)	104.6 (d)	6.84 (m)	104.6 (d)
3'-OCH ₃	3.83 (s)	55.4 (q)	3.87 (s)	55.3 (q)
5'-OCH ₃	3.83 (s)	55.4 (q)	3.87 (s)	55.3 (q)

สารชนิดนี้เดิมเคยถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของสาร resveratrol เพื่อทดสอบผลต่อเซลล์ลูคีเมีย¹² หลังจากนั้นจึงมีการค้นพบสารนี้ในธรรมชาติ โดยพบเป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในกล้วยไม้ *Phragmipedium calurum* และพบว่ามียฤทธิ์ antiproliferative ต่อเซลล์มะเร็งชนิด

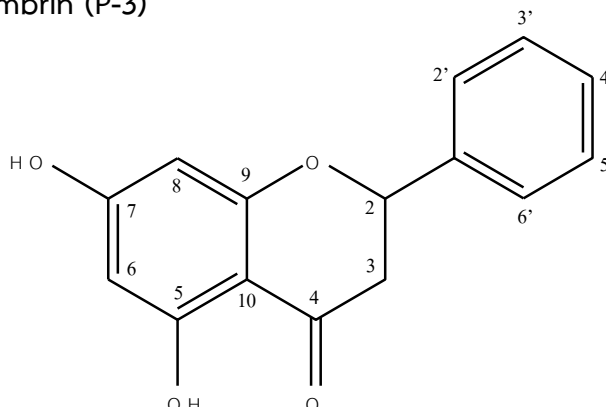
large cell lung carcinoma (NCI-H460) โดยมีค่า IC_{50} คือ $8.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ¹³
 บทความและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

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.

4.4.3 สาร pinocembrin (P-3)



สาร P-3 ลักษณะเป็นผงสีเหลือง สกัดแยกได้ในปริมาณ 18.2 mg (คิดเป็น yield = 0.012% จากน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าเป็นสาร flavonoid ในกลุ่ม flavanone ชื่อ pinocembrin มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ตารางที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ระหว่างสาร P-3 กับข้อมูลของสาร pinocembrin ที่เคยมีรายงานมาก่อน¹⁴

ตารางที่ 23 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-3 และ pinocembrin ใน CDCl_3

ตำแหน่ง	P-3		pinocembrin
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	-	-	-
2	5.33 (dd, $J = 13.0, 1.2$ Hz)	79.1 (d)	78.4 (d)
3	3.01 (dd, $J = 17.2, 13.0$ Hz) 2.73 (dd, $J = 17.2, 13.0$ Hz)	43.2 (t)	42.2 (t)
4	-	195.7 (s)	195.8 (s)
5	-	164.2 (s)	163.6 (s)
6	5.95 (d, $J = 2.4$ Hz)	96.7 (d)	96.1 (d)
7	-	165.8 (s)	166.6 (s)
8	5.94 (d, $J = 2.4$ Hz)	95.6 (d)	95.1 (d)
9	-	163.1 (s)	162.7 (s)
10	-	102.8 (s)	101.9 (s)
1'	-	138.3 (s)	138.0 (s)
2'	7.30-7.70 (m)	126.1 (d)	126.5 (d)
3'	7.30-7.70 (m)	128.8 (d)	128.5 (d)
4'	7.30-7.70 (m)	128.8 (d)	128.5 (d)
5'	7.30-7.70 (m)	128.8 (d)	128.5 (d)
6'	7.30-7.70 (m)	126.1 (d)	126.5 (d)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

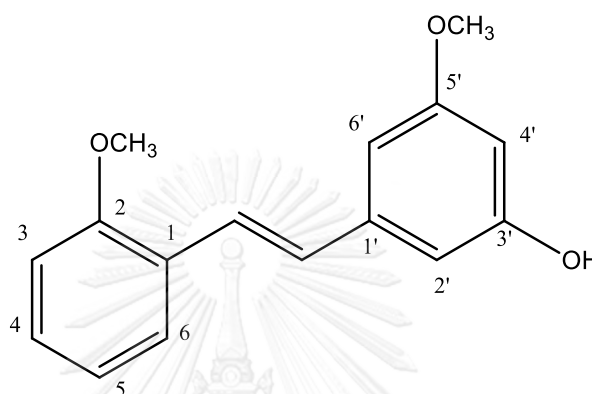
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

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

Pinocebrin เป็น flavanone ที่พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ในแก่นไม้ของสนสกุล *Pinus*¹⁵, พืชสกุล *Eucalyptus*¹⁶, สกุล *Populus*¹⁷, สกุล *Euphorbia*¹⁸ รวมทั้งในกล้วยไม้บางชนิด เช่น *Eria marginata*¹⁹ โดยมีรายงานว่ามีการศึกษาทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง²⁰

4.4.4 สาร 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene (P-4)



สาร P-4 ลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน ปริมาณ 6.0 mg (คิดเป็น yield = 0.004% จาก น้ำหนักพืชแห้ง) สารละลายของ P-4 ในเมทานอลมีการดูดกลืนรังสี UV ด้วยค่า λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 220 (4.58), 292 (4.51) และ 317 (4.51) เมื่อวัดการดูดกลืนรังสี IR พบว่ามี ν_{\max} ที่ 3366 (OH), 3198, 2923, 2852, 1658, 1633, 1468 และ 1425 cm^{-1} เมื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง high resolution-MS พบว่ามี $[\text{M}+\text{H}]^+$ peak ที่ 257.1154 (ค่าจากการคำนวณ คือ 257.1177) ซึ่งเทียบเท่ากับมีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_3$

จากสูตรโมเลกุล สามารถคำนวณค่า degree of unsaturation ได้เท่ากับ 9 และเมื่อพิจารณาข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) จะพบ doublet peaks ($J = 16.4$ Hz) ของโปรตอนในแต่ละด้านของพันธะคู่แบบ *trans* ที่ δ_{H} 7.42 (H- α) กับ 6.98 (H- β) จึงแสดงว่าสาร P-4 เป็น *trans*-stilbene ซึ่งมีหมู่แทนที่ 3 หมู่ โดยหมู่หนึ่งเป็นหมู่ hydroxyl และอีก 2 หมู่เป็นหมู่ methoxyl ซึ่งปรากฏเป็น NMR peaks ที่ δ_{H} 3.87 (s) หรือ δ_{C} 55.5 (2-OCH₃) กับที่ δ_{H} 3.80 (s) หรือ δ_{C} 55.4 (5'-OCH₃) โดยวงแหวน aromatic ทางซีกหนึ่งของโมเลกุลมีลักษณะการจัดเรียงหมู่แทนที่ในตำแหน่ง 1 กับ 2 จึงปรากฏ peaks ของตำแหน่งที่เหลืออีก 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง 3 ที่ δ_{H} 6.88 (d, $J = 8.3$ Hz), δ_{C} 110.9, ตำแหน่ง 4 ที่ δ_{H} 7.24 (dd, $J = 8.3, 7.6$ Hz), δ_{C} 128.7, ตำแหน่ง 5 ที่ δ_{H} 6.95 (t, $J = 7.6$ Hz), δ_{C} 120.7 และตำแหน่ง 6 ที่ δ_{H} 7.55 (d, $J = 7.6$ Hz), δ_{C} 126.5 ในขณะที่วงแหวน aromatic ทางอีกด้านหนึ่งของ ethylene chain มีหมู่แทนที่ในตำแหน่ง 3' กับ 5' ซึ่งไม่สมมาตรกัน จึงปรากฏ peaks ของตำแหน่ง 2' ที่ δ_{H} 6.62 (br s), δ_{C}

เป็นข้อมูลเพิ่มเติมของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

105.9, ตำแหน่ง 4' ที่ δ_{H} 6.31 (br s), δ_{C} 100.7 และตำแหน่ง 6' ที่ δ_{H} 6.64 (br s), δ_{C} 105.0 นอกจากนี้ ความไม่สมมาตรของหมู่แทนที่ใน ring นี้ทำให้ทราบว่าหมู่แทนที่ในตำแหน่ง 3' คือหมู่ hydroxyl ส่วนตำแหน่ง 5' ถูกแทนที่ด้วยหมู่ methoxyl และตำแหน่ง 2 ของวงแหวน aromatic อีกด้านหนึ่งนั้นถูกแทนที่ด้วยหมู่ methoxyl ข้อมูลในส่วนย่อยของโมเลกุลเหล่านี้ สอดคล้องกับข้อมูล NMR ของสารอื่นที่เคยมีการค้นพบมาก่อน และมีรูปแบบการแทนที่เช่นเดียวกัน (เช่น สาร P-7, P-9 และ P-10) ทำให้สามารถสรุปได้ว่า สาร P-4 เป็นสารใหม่ในธรรมชาติ ชื่อ 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene มีข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 26

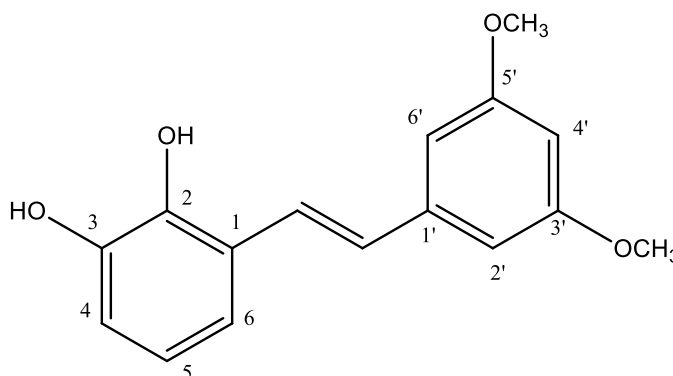
ตารางที่ 24 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-4 ใน CDCl_3

ตำแหน่ง	δ_{H}	δ_{C}
1	-	126.1 (s)
2	-	156.8 (s)
3	6.88 (d, $J = 8.3$ Hz)	110.9 (d)
4	7.24 (dd, $J = 8.3, 7.6$ Hz)	128.7 (d)
5	6.95 (t, $J = 7.6$ Hz)	120.7 (d)
6	7.55 (d, $J = 7.6$ Hz)	126.5 (d)
α	7.42 (d, $J = 16.4$ Hz)	124.2 (d)
β	6.98 (d, $J = 16.4$ Hz)	128.8 (d)
1'	-	140.3 (s)
2'	6.62 (br s)	105.9 (d)
3'	-	156.9 (s)
4'	6.31 (br s)	100.7 (d)
5'	-	161.0 (s)
6'	6.64 (br s)	105.0 (d)
2-OCH ₃	3.87 (s)	55.5 (q)
5'-OCH ₃	3.80 (s)	55.4 (q)

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.

4.4.5 สาร 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (P-5)



สาร P-5 มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล สกัดแยกได้ในปริมาณทั้งหมด 6.0 mg (คิดเป็น yield = 0.004% จากน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับสารที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าเป็นสาร 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene ซึ่งเป็น *trans*-stilbene มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4$ ตารางที่ 27 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ระหว่างสาร P-5 กับข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน²¹

ตารางที่ 25 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-5 (ใน CDCl_3) และ 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxy stilbene (ใน CD_3OD)

ตำแหน่ง	P-5		2,3-Dihydroxy-3',5'-dimethoxy stilbene	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	124.8 (s)	-	-
2	-	142.2 (s)	-	144.7 (s)
3	-	143.4 (s)	-	146.8 (s)
4	6.77 (dd, $J = 6.3, 3.2$ Hz)	114.2 (d)	6.67 (m)	115.3 (d)
5	6.77 (t, $J = 6.3$ Hz)	120.3 (d)	6.67 (m)	120.3 (d)
6	7.11 (dd, $J = 6.3, 3.2$ Hz)	119.2 (d)	7.05 (br t)	118.6 (d)
α	7.34 (d, $J = 16.2$ Hz)	123.4 (d)	7.44 (d, $J = 16.4$ Hz)	125.3 (d)
β	7.08 (d, $J = 16.2$ Hz)	130.1 (d)	7.06 (d, $J = 16.4$ Hz)	129.5 (d)
1'	-	139.7 (s)	-	141.5 (s)
2'	6.69 (d, $J = 2.1$ Hz)	104.6 (d)	6.69 (s)	105.4 (d)
3'	-	160.9 (s)	-	163.2 (s)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

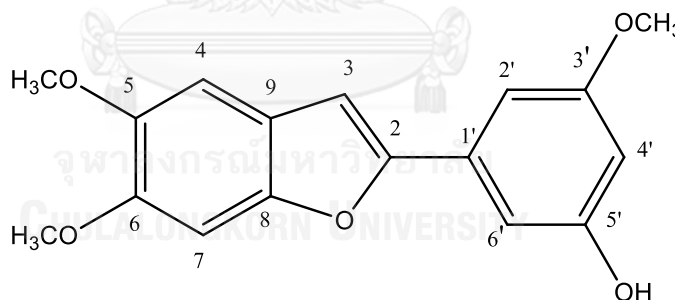
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

ตารางที่ 25 (ต่อ)

ตำแหน่ง	P-5		2,3-Dihydroxy-3',5'-dimethoxy stilbene	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
4'	6.40 (d, $J = 2.1$ Hz)	100.0 (d)	6.37 (br s)	100.5 (d)
5'	-	160.9 (s)	-	163.2 (s)
6'	6.69 (d, $J = 2.1$ Hz)	104.6 (d)	6.69 (s)	105.4 (d)
3'-OCH ₃	3.83 (s)	55.4 (q)	3.81 (s)	55.6 (q)
5'-OCH ₃	3.83 (s)	55.4 (q)	-	55.6 (q)

ในอดีตเคยพบสารชนิดนี้ครั้งแรกในกล้วยไม้ *Phragmipedium calurum*²¹ หลังจากนั้นมียางานการพบสารนี้อีก 1 ครั้งจากหญ้าจิมฟันควาย (*Arundina graminifolia*) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ดินชนิดหนึ่ง และพบว่ามีฤทธิ์เป็นพิษปานกลางต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ human acute promyelocytic leukemia (NB4) กับ human prostate cancer (PC3) โดยมีค่า IC₅₀ = 8.2 และ 9.0 μM ตามลำดับ²² การพบสารชนิดนี้ในรากองเท้านารีเหลืองตรังเป็นการพบครั้งที่ 3 ในธรรมชาติ

4.4.6 สาร 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran (P-6)



สาร P-6 มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล สกัดแยกได้ในปริมาณ 6.6 mg (คิดเป็น yield = 0.005% จากน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบข้อมูล ¹H และ ¹³C NMR กับสารที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าเป็นสารในกลุ่ม stilbene ชนิด 2-phenylbenzofuran ชื่อ 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran มีสูตรโมเลกุล C₁₇H₁₆O₅ ตารางที่ 28 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ของสาร P-6 ที่แยกได้กับข้อมูลของสารชนิดนี้ที่เคยมีรายงานมาก่อน²³

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 26 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-6 (ใน CDCl_3) และ 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran (ใน acetone-d_6)

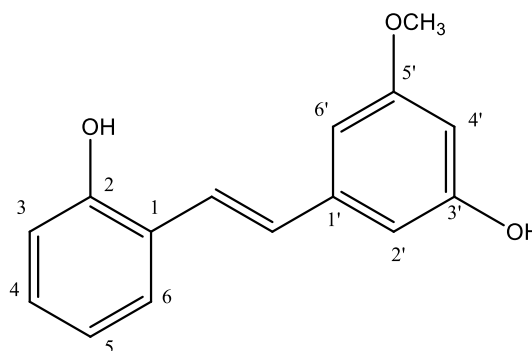
ตำแหน่ง	P-6		5,6-Dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl) benzofuran	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	-	-	-
2	-	154.6 (s)	-	155.7 (s)
3	6.99 (s)	102.1 (d)	7.12 (br s)	102.9 (d)
4	6.87 (s)	102.2 (d)	7.13 (br s)	103.9 (d)
5	-	146.7 (s)	-	148.2 (s)
6	-	148.2 (s)	-	149.8 (s)
7	7.06 (s)	95.2 (d)	7.20 (br s)	96.5(d)
8	-	149.9 (s)	-	150.5 (s)
9	-	120.6 (s)	-	122.0 (s)
1'	-	132.7 (s)	-	133.4 (s)
2'	6.87 (br s)	104.0 (d)	6.95 (br s)	104.7 (d)
3'	-	157.1 (s)	-	159.9 (s)
4'	6.36 (br s)	101.4 (d)	6.41 (br s)	102.2 (d)
5'	-	161.2 (s)	-	162.3 (s)
6'	6.91 (br s)	102.5 (d)	6.92 (br s)	102.0 (d)
5-OCH ₃	3.91 (s)	56.4 (q)	3.85 (s)	56.6 (q)
6-OCH ₃	3.93 (s)	56.3 (q)	3.89 (s)	56.5 (q)
5'-OCH ₃	3.83 (s)	55.5 (q)	3.83 (s)	55.6 (q)

สาร stilbene ชนิดนี้สกัดแยกได้ในธรรมชาติครั้งแรกจากส่วนลำต้นของ *Morus notabilis* (วงศ์ Moraceae) ซึ่งเป็นพืชที่พบในประเทศจีนแถบมณฑลเสฉวนและยูนนาน และมีการนำสารนี้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase แต่พบว่าไม่มีฤทธิ์²³ การพบสารชนิดนี้ในกล้วยไม้โดยคณะผู้วิจัยเป็นการค้นพบสารเป็นครั้งที่สองในธรรมชาติ

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.

4.4.7 สาร 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene (P-7)



สาร P-7 มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล ปริมาณ 6.9 mg (คิดเป็น yield = 0.005% จากน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับสารที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าเป็นสาร *trans*-stilbene ชื่อ 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ซึ่งพบครั้งแรกในกล้วยไม้ *Phragmipedium calurum*²¹ การพบครั้งนี้เป็นครั้งที่สองในธรรมชาติ เปรียบเทียบข้อมูล NMR ระหว่างสาร P-7 กับข้อมูลที่เคยรายงานในการค้นพบครั้งแรกแสดงในตารางที่ 29

ตารางที่ 27 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-7 (ใน CDCl_3) และ 2,3'-dihydroxy-5'-methoxy stilbene (ใน CD_3OD)

ตำแหน่ง	P-7		2,3'-dihydroxy-5'-methoxy stilbene	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	123.7 (s)	-	-
2	-	153.1 (s)	-	155.6 (s)
3	6.79 (d, $J = 7.8$ Hz)	115.9 (d)	6.81 (m)	116.9 (d)
4	7.13 (t, $J = 7.8$ Hz)	129.5 (d)	7.06 (t, $J = 6.8$ Hz)	129.5 (d)
5	6.92 (t, $J = 7.8$ Hz)	121.1 (d)	6.81 (m)	120.7 (d)
6	7.49 (d, $J = 7.8$ Hz)	128.8 (d)	7.51 (d, $J = 7.5$ Hz)	127.5 (d)
α	7.48 (d, $J = 16.3$ Hz)	124.4 (d)	7.39 (d, $J = 16.4$ Hz)	125.0 (d)
β	6.98 (d, $J = 16.3$ Hz)	127.2 (d)	7.03 (d, $J = 16.5$ Hz)	129.2 (d)
1'	-	140.0 (s)	-	141.2 (s)
2'	6.61 (br s)	105.9 (d)	6.59 (br s)	106.7 (d)
3'	-	156.9 (s)	-	-
4'	6.32 (t, $J = 2.0$ Hz)	100.9 (d)	6.26 (br s)	101.5 (d)
5'	-	161.1 (s)	-	162.5 (s)
6'	6.63 (br s)	105.0 (d)	6.59 (br s)	104.4 (d)
3'-OCH ₃	3.81 (s)	55.4 (q)	3.78 (s)	55.5 (q)

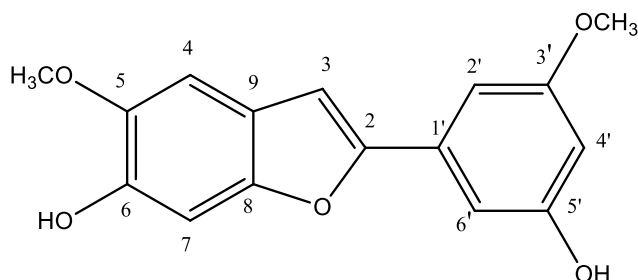
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

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.

4.4.8 สาร 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-8)



สาร P-8 มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล สกัดแยกได้ในปริมาณ 25.0 mg (คิดเป็น yield = 0.017% จากน้ำหนักพืชแห้ง) พิสูจน์เอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับสารที่เคยมีรายงานมาก่อน²⁴ ดังแสดงในตารางที่ 30 พบว่าเป็น stilbene ชนิด 2-phenylbenzofuran ชื่อ 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran มีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ สาร stilbene ชนิดนี้พบครั้งแรกในฝักของ *Erythrina latissima* วงศ์ Leguminosae โดยมีรายงานว่ามียูทรีต้านจุลชีพต่อสปอร์ของเชื้อยีสต์ รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบบางชนิด การพบสารชนิดนี้ในรากกรองเท่านั้นที่เหลือตรงเป็นการพบครั้งที่สองในธรรมชาติ

ตารางที่ 28 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-8 (ใน CDCl_3) และ 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran ใน (acetone-d_6)

ตำแหน่ง	P-8		2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	-	-	-
2	-	154.6 (s)	-	159.2 (s)
3	6.95 (s)	101.6 (d)	7.14 (s)	102.8 (d)
4	6.84 (d, $J = 1.0$ Hz)	102.1 (d)	7.10 (d, $J = 0.8$ Hz)	102.5 (d)
5	-	144.4 (s)	-	145.8 (s)
6	-	144.7 (s)	-	146.1 (s)
7	7.09 (d, $J = 1.0$ Hz)	97.7 (d)	7.04 (d, $J = 0.8$ Hz)	97.9 (d)
8	-	150.0 (s)	-	121.0 (s)
9	-	120.9 (s)	-	150.2 (s)
1'	-	132.8 (s)	-	133.0 (s)
2'	6.86 (dd, $J = 2.0, 1.5$ Hz)	104.2 (d)	6.95 (dd, $J = 2.2, 2.2$ Hz)	104.1 (d)

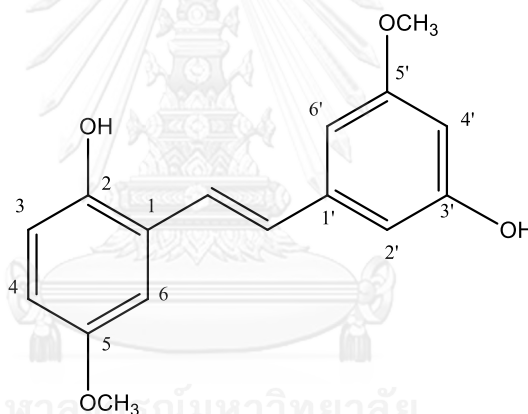
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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 28 (ต่อ)

ตำแหน่ง	P-8		2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)- 6-hydroxy-5-methoxybenzofuran	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
3'	-	157.0 (s)	-	154.8 (s)
4'	6.36 (t, $J = 2.0$ Hz)	101.5 (d)	6.41 (t, $J = 2.2$ Hz)	101.5 (d)
5'	-	161.4 (s)	-	161.8 (s)
6'	6.92 (dd, $J = 2.0, 1.5$ Hz)	102.8 (d)	6.92 (dd, $J = 2.2, 2.2$ Hz)	101.5 (d)
5-OCH ₃	3.92 (s)	56.5(q)	3.91 (s)	55.3 (q)
3'-OCH ₃	3.83 (s)	55.5 (q)	3.84 (s)	55.1 (q)

4.4.9 สาร 2,3'-dihydroxy-5,5'-dimethoxystilbene (P-9)



สาร P-9 ลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล ปริมาณ 7.8 mg (คิดเป็น yield = 0.005% จากน้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับสารที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าเป็นสาร 2,3'-dihydroxy-5,5'-dimethoxystilbene ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ พบครั้งแรกในกล้วยไม้ *Phragmipedium hybrid* (var. Sorcerer's Apprentice) โดยครั้งนี้เป็นการพบครั้งที่สอง ตารางที่ 31 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ระหว่างสาร P-9 กับข้อมูลที่รายงานไว้ในการพบครั้งแรก²¹

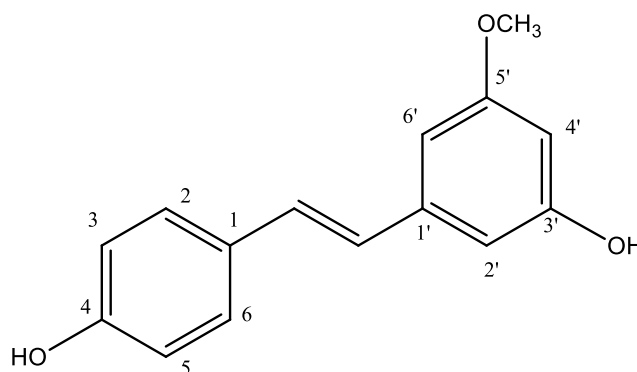
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นเพิ่มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

ตารางที่ 29 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-9 (ใน CDCl_3) และ 2,3'-dihydroxy-5'-methoxy stilbene (ใน CD_3OD)

ตำแหน่ง	P-9		2,3'-dihydroxy-5'-dimethoxy stilbene	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	125.1 (s)	-	126.3 (s)
2	-	147.3 (s)	-	150.4 (s)
3	6.75 (d, $J = 8.4$ Hz)	116.9 (d)	6.74 (d, $J = 8.7$ Hz)	117.6 (d)
4	6.72 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz)	114.7 (d)	6.68 (dd, $J = 8.7, 2.9$ Hz)	115.8 (d)
5	-	153.9 (s)	-	154.7 (s)
6	7.04 (d, $J = 2.4$ Hz)	111.6 (d)	7.08 (d, $J = 2.8$ Hz)	112.0 (d)
α	7.30 (d, $J = 16.2$ Hz)	123.7 (d)	7.38 (d, $J = 16.4$ Hz)	125.5 (d)
β	6.97 (d, $J = 16.2$ Hz)	129.7 (d)	7.02 (d, $J = 16.4$ Hz)	129.8 (d)
1'	-	139.8 (s)	-	141.6 (s)
2'	6.63 (d, $J = 2.0$ Hz)	105.9 (d)	6.60 (br d, $J = 2.0$ Hz)	107.1 (d)
3'	-	156.9 (s)	-	159.8 (s)
4'	6.34 (t, $J = 2.0$ Hz)	101.1 (d)	6.27 (t, $J = 2.0$ Hz)	101.9 (d)
5'	-	161.1 (s)	-	162.8 (s)
6'	6.64 (d, $J = 2.0$ Hz)	105.1 (d)	6.59 (br d, $J = 2.0$ Hz)	104.7 (d)
5-OCH ₃	3.80 (s)	55.4 (q)	3.78 (s)	56.0 (q)
3'-OCH ₃	3.81 (s)	55.4 (q)	-	55.6 (q)

4.4.10 สาร 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene (P-10)



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.

สาร P-10 มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล ปริมาณ 6.1 mg (คิดเป็น yield = 0.004% จาก น้ำหนักพืชแห้ง) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR กับข้อมูลของสารกลุ่ม *trans*-stilbene ที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าเป็นสาร 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene หรือ *trans*-pinostilbene ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$ สารชนิดนี้เป็นอนุพันธ์ของสาร resveratrol พบในธรรมชาติครั้งแรกจากส่วนเปลือกชั้นในของพืชวงศ์สน (Pinaceae) คือ *Pinus karaiensis* ตารางที่ 32 แสดงการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ระหว่างสาร P-10 กับข้อมูลของสาร *trans*-pinostilbene ที่เคยมีรายงานไว้²⁵

ตารางที่ 30 แสดงข้อมูล ^1H - และ ^{13}C -NMR ของสาร P-10 (ใน CDCl_3) และ 2,3'-dihydroxy-5'-methoxy stilbene (ใน CD_3OD)

ตำแหน่ง	P-10		2,3'-dihydroxy-5'-methoxy stilbene	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	133.0 (s)	-	130.4
2	7.25 (d, $J = 8.4$ Hz)	128.9 (s)	7.40 (d, $J = 8.7$ Hz)	128.4
3	6.83 (d, $J = 8.4$ Hz)	115.4 (d)	6.77(d, $J = 8.4$ Hz)	116.0
4	-	155.4 (d)	-	157.8
5	6.83 (d, $J = 8.4$ Hz)	115.4 (s)	6.77 (d, $J = 8.4$ Hz)	116.0
6	7.25 (d, $J = 8.4$ Hz)	128.9 (d)	7.40 (d, $J = 8.4$ Hz)	128.4
α	7.33 (d, $J = 16.2$ Hz)	124.7 (d)	6.87 (d, $J = 16.3$ Hz)	125.8
β	7.03 (d, $J = 16.2$ Hz)	129.6 (d)	7.03 (d, $J = 16.3$ Hz)	128.9
1'	-	140.1 (s)	-	139.9
2'	6.64 (br s)	105.7 (d)	6.56 (br s)	106.3
3'	-	157.1 (s)	-	159.1
4'	6.35 (br s)	101.1 (d)	6.24 (br s)	103.0
5'	-	161.1 (s)	-	161.1
6'	6.64 (br s)	105.1 (d)	6.53 (br s)	104.7
3'-OCH ₃	3.82 (s)	55.4 (q)	3.72, s	55.4

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.

4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารบริสุทธิ์

เมื่อนำสารบริสุทธิ์ 6 ชนิด ที่สกัดแยกได้จากรากของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง คือ สาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1), pinocembrin (P-3), 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (P-5), 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl) benzofuran (P-6), 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene (P-7) และ 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofura (P-8) ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml มาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Vero cell: African green monkey kidney) ได้ผลดังตารางที่ 33

ตารางที่ 31 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารจากรากรองเท้านารีเหลืองตรัง 6 ชนิด

สาร	Vero cell	
	activity	IC ₅₀ (µg/ml)
P-1	Active	-
P-3	Active	-
P-5	Inactive	-
P-6	Active	-
P-7	Inactive	-
P-8	Active	-
Ellipticine	Active	1.2

พบว่าสารบริสุทธิ์ที่มีความเป็นพิษต่อ Vero cell ได้แก่ 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran, pinocembrin, , 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran, และ 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran

4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์

สารสกัดบริสุทธิ์ทั้ง 10 ชนิดที่สกัดแยกได้จากรากของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187, KB และ MCF7 ดังแสดงในตารางที่ 34 แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับปริมาณสาร จึงเลือกหาค่า IC₅₀ เฉพาะต่อเซลล์ NCI-H187

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 32 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์

สาร	NCI-H187		KB		MCF7	
	activity	IC ₅₀ (µg/ml)	activity	IC ₅₀ (µg/ml)	activity	IC ₅₀ (µg/ml)
P1	Active	18.52	Active	-	Active	-
P2	Active	31.98	-	-	-	-
P3	Inactive	-	Inactive	-	Inactive	-
P4	Active	19.79	-	-	-	-
P5	Inactive	-	-	-	-	-
P6	Active	1.53	Active	-	Active	-
P7	Active	40.66	Active	-	Active	-
P8	Active	17.95	Active	-	Active	-
P9	Active	18.33	Active	-	Active	-
P10	Active	17.97	-	-	-	-
Ellipticine	Active	4.46	Active	2.04	-	-
Doxorubicin	Active	0.070	Active	0.398	Active	7.13
Tamoxifen	-	-	-	-	Active	6.95

สารบริสุทธิ์ทั้ง 10 ชนิด มีเพียงสาร pinocembrin (P-3) ซึ่งเป็น flavonoid เพียงชนิดเดียวที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใดเลย ส่วนสาร 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (P-5) ที่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ในขณะที่สาร 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol (P-2), 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene (P-4) และ 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene (P-10) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187 และยิ่งไปกว่านั้นสาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1), 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl) benzofuran (P-6), 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene (P-7), 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofura (P-8) และ 2,3'-dihydroxy-5,5'-dimethoxystilbene (P-9) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด

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

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 4 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองกระบี่ รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีเหลืองตรัง และรองเท้านารีฟายหอย มาคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187, KB, MCF7 และการยับยั้งเอนไซม์ดีโทโพไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 ด้วยวิธี yeast cell-based assay พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนรากของรองเท้านารีเหลืองตรังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดีโทโพไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 ดีที่สุด และมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง NCI-H187 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.47 $\mu\text{g/ml}$ จึงได้เลือกทำการสกัดแยกสารเคมีจากรากรองเท้านารีเหลืองตรังด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้ต่อไป

เมื่อนำสารสกัดหยาบของรากรองเท้านารีเหลืองตรังมาสกัดแยกเบื้องต้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 5 fractions คือ PG-1 ถึง PG-5 นำทั้ง 5 fractions มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดีโทโพไอโซเมอเรสชนิดที่ 1 ด้วยวิธี yeast cell-based assay พบว่า fraction PG-3 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ได้และเมื่อนำมาทำการสกัดแยกต่อ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 10 ชนิด เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 1 ชนิด ได้แก่ pinocembrin (P-3) และสารกลุ่มสติลบิน 9 ชนิด ซึ่งมีโครงสร้างแกนแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่ม *trans*-1,2-diphenylethylene ได้แก่ 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol (P-2), 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene (P-4), 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (P-5), 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene (P-7), 2,3'-dihydroxy-5,5'-dimethoxystilbene (P-9) และ 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene (P-10) และกลุ่ม 2-phenylbenzofuran ได้แก่ 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1), 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran (P-6) และ 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-8) โดยในจำนวนนี้เป็นสารชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1) และ 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene (P-4)

เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) ทำให้ทราบข้อมูลอนุกรมวิธานเคมีของพืชสกุลนี้ว่ามีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับสารเคมีในกลุ่มสติลบินที่พบในกล้วยไม้สกุลอื่น เช่น *Arundina* หรือกล้วยไม้ดินหญ้าจิมฟันควาย, *Eria* และ *Phragmipedium*

ลักษณะเด่นของสารสติลบินในกลุ่ม *trans*-1,2-diphenylethylene จากรากรองเท้านารีเหลืองตรัง คือมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ methoxy บน ring B ที่ตำแหน่ง 5' ในขณะที่สารสติลบินในกลุ่ม 2-phenylbenzofuran จะพบหมู่ methoxy บน ring A ที่ตำแหน่ง 5 และ ring B ในตำแหน่ง 3'

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.

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187 พบว่า สารสตีลปีนในกลุ่ม 2-phenylbenzofuran มีฤทธิ์แรงกว่าสารสตีลปีนที่มีโครงสร้างหลักเป็นแบบ *trans*-1,2-diphenylethylene ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเพราะโครงสร้างแบบ 2-phenylbenzofuran มีลักษณะที่แบนราบมีโอกาสที่จะไปแทรกตัว (intercalate) ระหว่างดีเอ็นเอได้ดีกว่าสตีลปีนในกลุ่ม *trans*-1,2-diphenylethylene ที่จะมีการหมุนของวงแหวนอะโรมาติกทั้ง 2 ข้างของโมเลกุลอย่างอิสระ

สารสตีลปีนในกลุ่ม 2-phenylbenzofuran นอกจากจะมีฤทธิ์ที่แรงแล้ว ยังพบว่าการมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ methoxy บน ring A ในตำแหน่งที่ 6 เช่น สาร 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran ($IC_{50} = 1.53 \mu\text{g/ml}$) จะมีฤทธิ์แรงกว่าสารที่มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ hydroxy ในตำแหน่งเดียวกัน เช่น สาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran และ 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran ($IC_{50} = 18.52$ และ $17.95 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ ในขณะที่ชนิดของหมู่แทนที่บน ring B ในตำแหน่งที่ 5' ไม่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์

นอกจากนี้ยังพบว่าการที่ตำแหน่ง 3 บน ring A ของสารสตีลปีนในกลุ่ม *trans*-1,2-diphenylethylene มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ hydroxy เช่น สาร 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene จะทำให้สารไม่มีฤทธิ์ ในขณะที่สาร 2-[(*E*)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol ซึ่งไม่มีหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่งเดียวกัน มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งปานกลาง ($IC_{50} = 31.98 \mu\text{g/ml}$) ส่วนชนิดของหมู่แทนที่บน ring B ในตำแหน่งที่ 3' ไม่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์

หากพิจารณาถึงความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไปนั้น ควรเลือกสารที่มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย เช่น สาร 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene ซึ่งมีฤทธิ์ปานกลาง ($IC_{50} = 40.66 \mu\text{g/ml}$) ไปพัฒนาต่อทั้งในด้านฤทธิ์และความปลอดภัย

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นเพียงจุดเริ่มต้นในการค้นคว้าวิจัยองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้รองเท้านารี ซึ่งจะเห็นได้ว่ารากของรองเท้านารีเหลืองตรังมีความน่าสนใจทั้งในแง่องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นอย่างมาก ถือว่าเป็นพืชที่มีความน่าสนใจและมีศักยภาพที่จะสามารถนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไปได้ในอนาคต

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. Martha R, Gutierrez P. Orchid: A Review of Uses in Traditional medicine, Its Phytochemistry and Pharmacology. J Med Plants Res. 2010; 4(8):529-638.
2. Dash PK, Sahoo S, Bal S. Ethnobotanical Studies on Orchid of Niyamgiri Hill Ranges, Orissa, India. Ethnobot Leaflets. 2008; 12:70-8.
3. Ho CK, Chen CC. Moscatilin form the Orchid *Dendrobium loddigesii* is a Potential Anticancer Agent. Cancer Invest. 2003; 21(5):729-36.
4. Dressler RL, Dodson CH. Classification and phylogeny in the Orchidaceae. Ann Mo Bot Gard. 1960; 47: 25-68.
5. Nanakorn W, Indharamusika S. *Ex-situ* conservation of native Thai orchids at Queen Sirikit Botanic Garden. Pure Appl Chem. 1998; 70(11): 2065-145.
6. สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. รองเท้านารี. [Online]. 2013; [cited 2015 April]. Available from:
<http://web3.dnp.go.th/botany/detail.aspx?words=รองเท้านารี&typeword=group>
7. Atta-ur-Rahman. Structure and Chemistry (Part E). Studies in Natural Products Chemistry. 19. Amsterdam: Elsevier; 1987: 751.
8. Mfotie Njoya E, Weber C, Hernandez-Cuevas NA, Hon C-C, Janin Y, et al. Bioassay-Guided Fractionation of Extracts from *Codiaeum variegatum* against *Entamoeba histolytica* Discovers Compounds That Modify Expression of Ceramide Biosynthesis Related Genes. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(1): e2607.
9. Pommier Y, Leo E, Zhang HL, Marchand C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. Chem Biol. 2010; 17(5): 421-33.
10. Reid RJ, Benedetti P, Bjornsti MA. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. Biochim Biophys Acta. 1998; 1400(1-3): 289-300.
11. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer. 2006; 6(10): 789-802.
12. Roberti M, Pizzirani D, Recanatini M, Simoni D, Grimaudo S, Di Cristina A, Abbadessa V, Gebbia N, Tolomeo M. Identification of a terphenyl derivative that blocks the cell cycle in the G0-G1 phase and induces differentiation in leukemia cells. J Med Chem. 2006; 10: 3012-8.

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.

13. Starks CM, Williams RB, Norman VL, Lawrence JA, O'Neil-Johnson M, Eldridge GR. Phenylpropanoids from *Phragmipedium calurum* and their antiproliferative activity. *Phytochem.* 2012; 82: 172-5.
14. Agrawal PK. Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier; 1989.
15. Loman AA. Bioassays of fungi isolated from *Pinus contorta* var. *latifolia* with pinosylvin, pinosylvinmonomethyl ether, pinobanksin, and pinocembrin. *Can J Bot.* 1970; 7: 1303-8.
16. Sarat I, Choudhary A, Sharma RJ, Dandia K, Marsh KJ, Foley WJ, et al. Extraction of Pinocembrin from Leaves of Different Species of Eucalyptus and its Quantitative Analysis by qNMR and HPTLC. *Nat Prod Commun.* 2015; 3: 379-82.
17. Egger K, Tissut M, Wollenweber E. 3-O-methyläther des kaempferols und des galangins im knospenöl von *Populus nigra*. *Phytochem.* 1969; 8: 2425-6.
18. Demirkiran O, Topcu G, Hussain J, Ahmad VU, Choudhary MI. Structure elucidation of two new unusual monoterpene glycosides from *Euphorbia decipiens*, by 1D and 2D NMR experiments. *Magn Reson Chem.* 2011; 49(10): 673-7.
19. Sun Q, Liu Y, Jiang J, Huang G, Liu B, Zhan R, et al. Isolation of New Flavonone Glycoside from *Eria marginata*. *Bull Korean Chem Soc.* 2014; 35: 2544-6.
20. Rasul A, Millimouno FM, Eltayb WA, Ail M, Li J, Li X. Pinocembrin: A Novel Natural Compound with versatile Pharmacological and Biological Activity. *Biomed Res Int.* 2013: 1-9.
21. Garo E, Hu JF, Goering M, Hough G, O'Neil-Johnson M, Eldridge G. Stilbenes from the orchid *Phragmipedium* sp. *J Nat Prod.* 2007; 70: 968-73.
22. Li YK, Zhou B, Ye YQ, Du G, Niu DY, Meng CY, et al. Two new diphenylethylenes from *Arundina graminifolia* and their cytotoxicity. *Bull Korean Chem Soc.* 2013; 34: 3257-60.
23. Hu X, Wang M, Yan GR, Yu MH, Wang HY, Hou AJ. 2-Arylbenzofuran and tyrosinase inhibitory constituents of *Morus notabilis*. *J Asian Nat Prod Res.* 2012; 14: 1103-8.
24. Wanjala CC, Juma BF, Bojase G, Gashe BA, Majinda RR. Erythraline Alkaloids and Antimicrobial Flavonoids from *Erythrina latissima*. *Planta Med.* 2002; 68: 640-2.
25. Kwon DJ, Bae YS. Stilbenoids of Korean Pine (*Pinus koraiensis*) Inner bark. *Mokchae Konghak.* 2009; 37: 474-9.

บทความและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

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

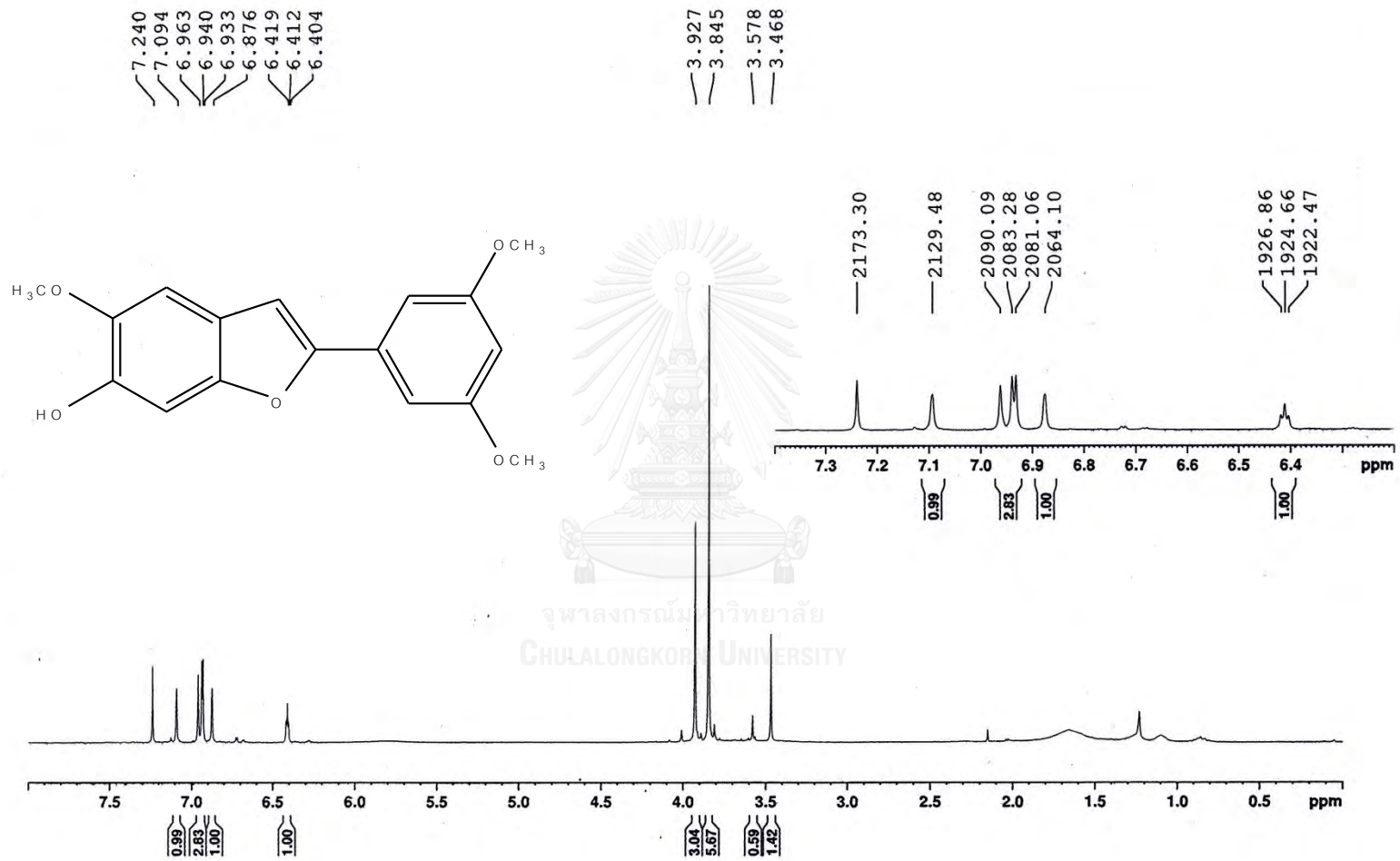


บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

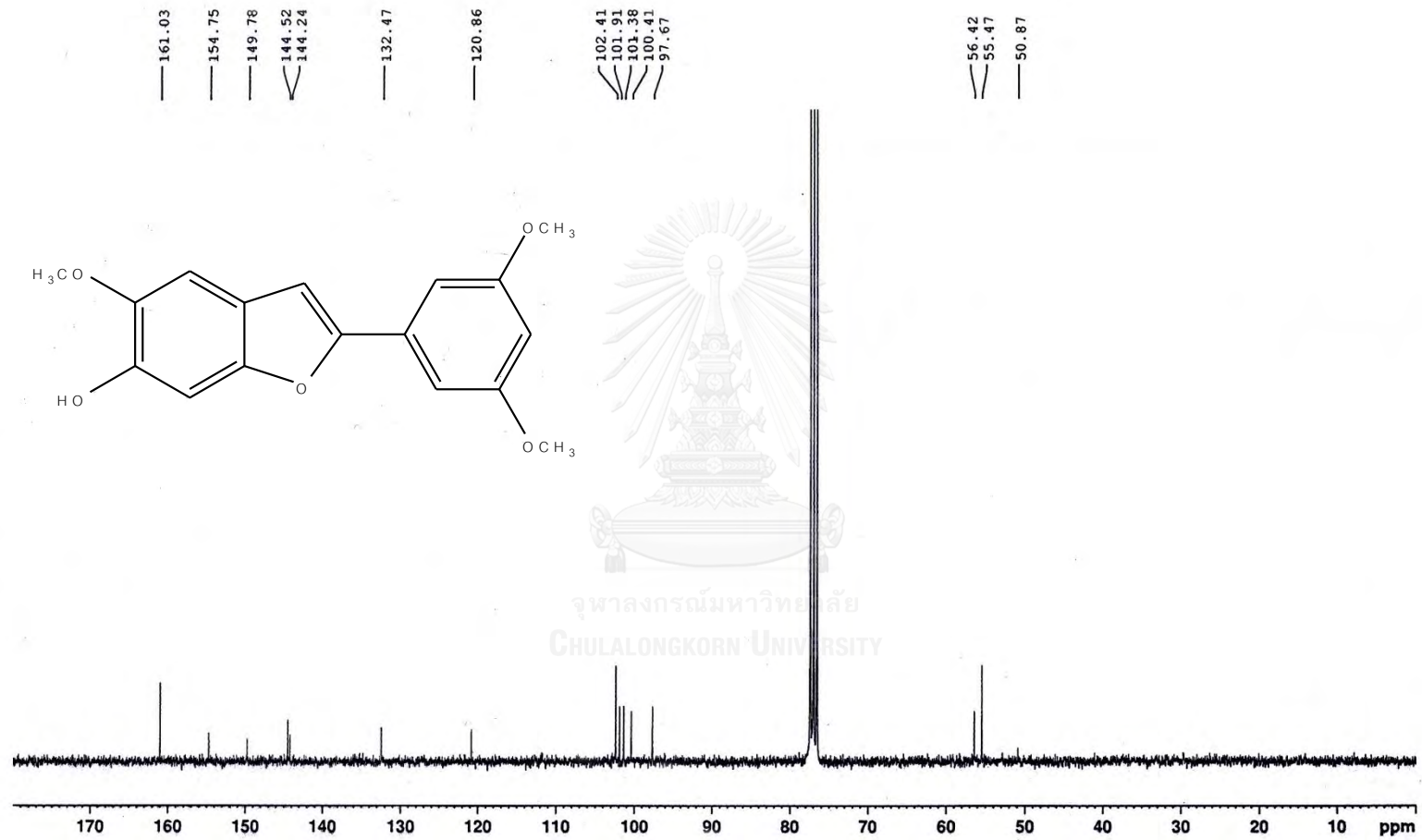
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.



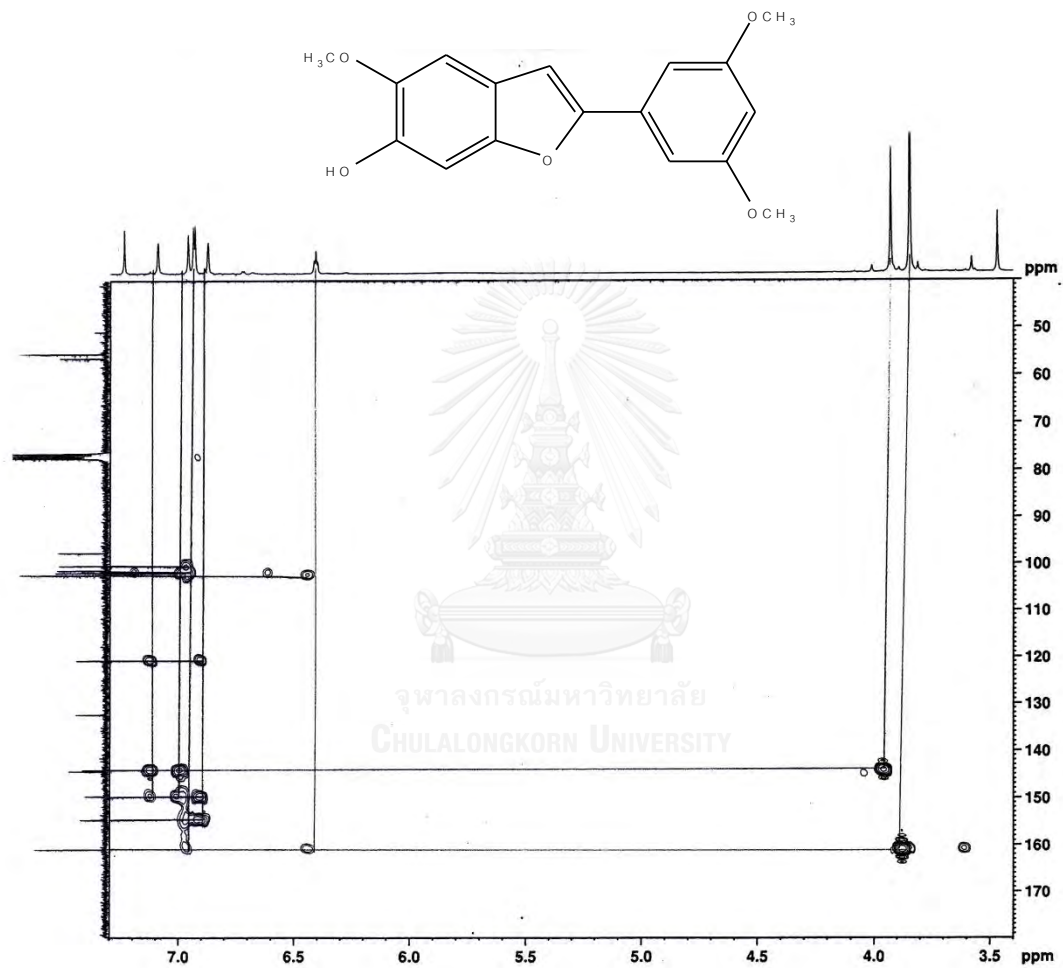
บทคัดย่อและเพิ่มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการปริญญาโทที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) รูป A1 แผนภาพแสดงการแยกสารด้วยวิธี column chromatography เป็นเพิ่มข้อมูลของนักศึกษาของโครงการปริญญาโทที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด



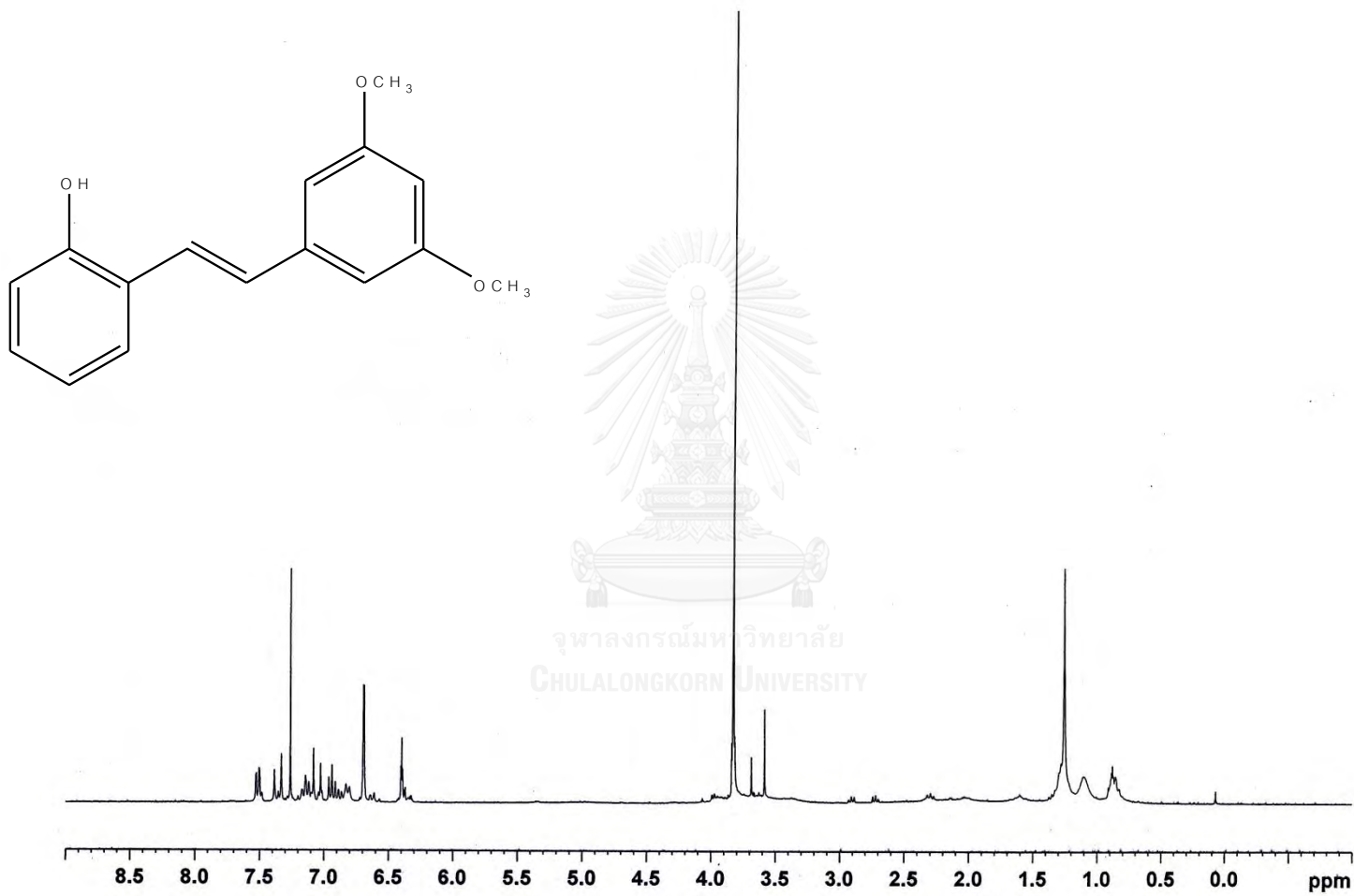
รูป A2 แสดง ¹H-NMR spectrum ของสาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1)



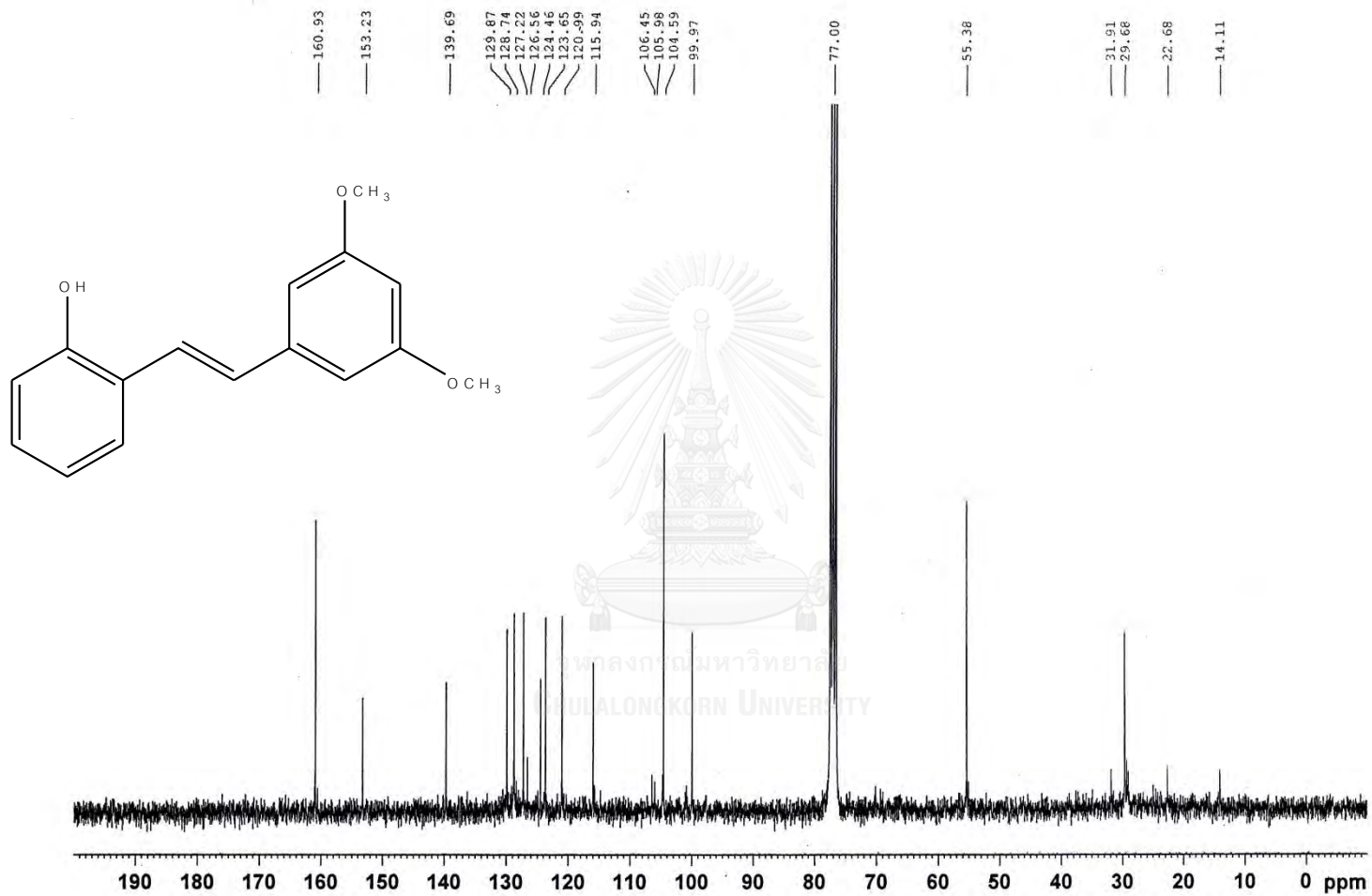
รูป A3 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1)



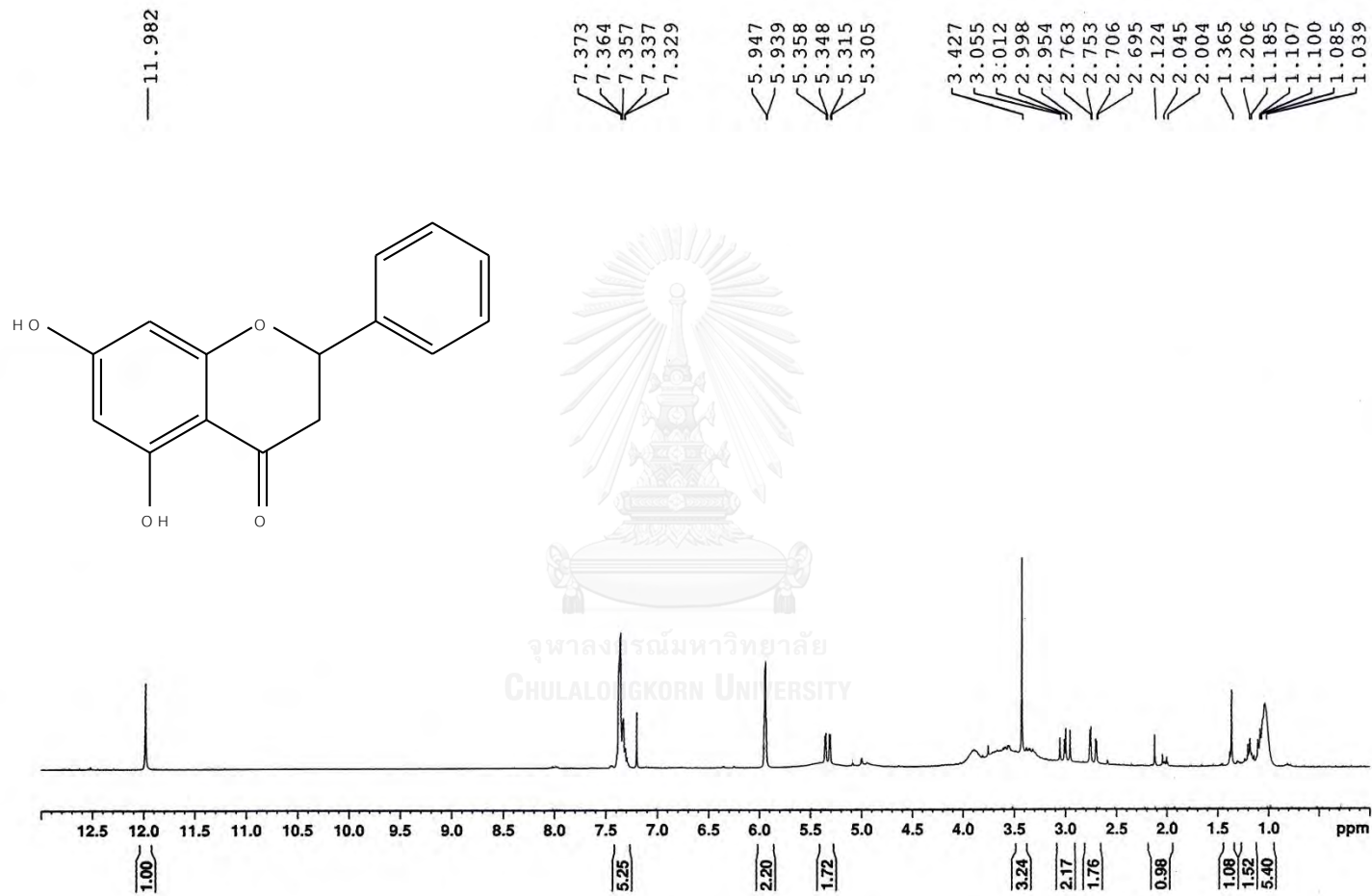
รูป A4 แสดง HMBC spectrum ของสาร 2-(3',5'-dimethoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-1)



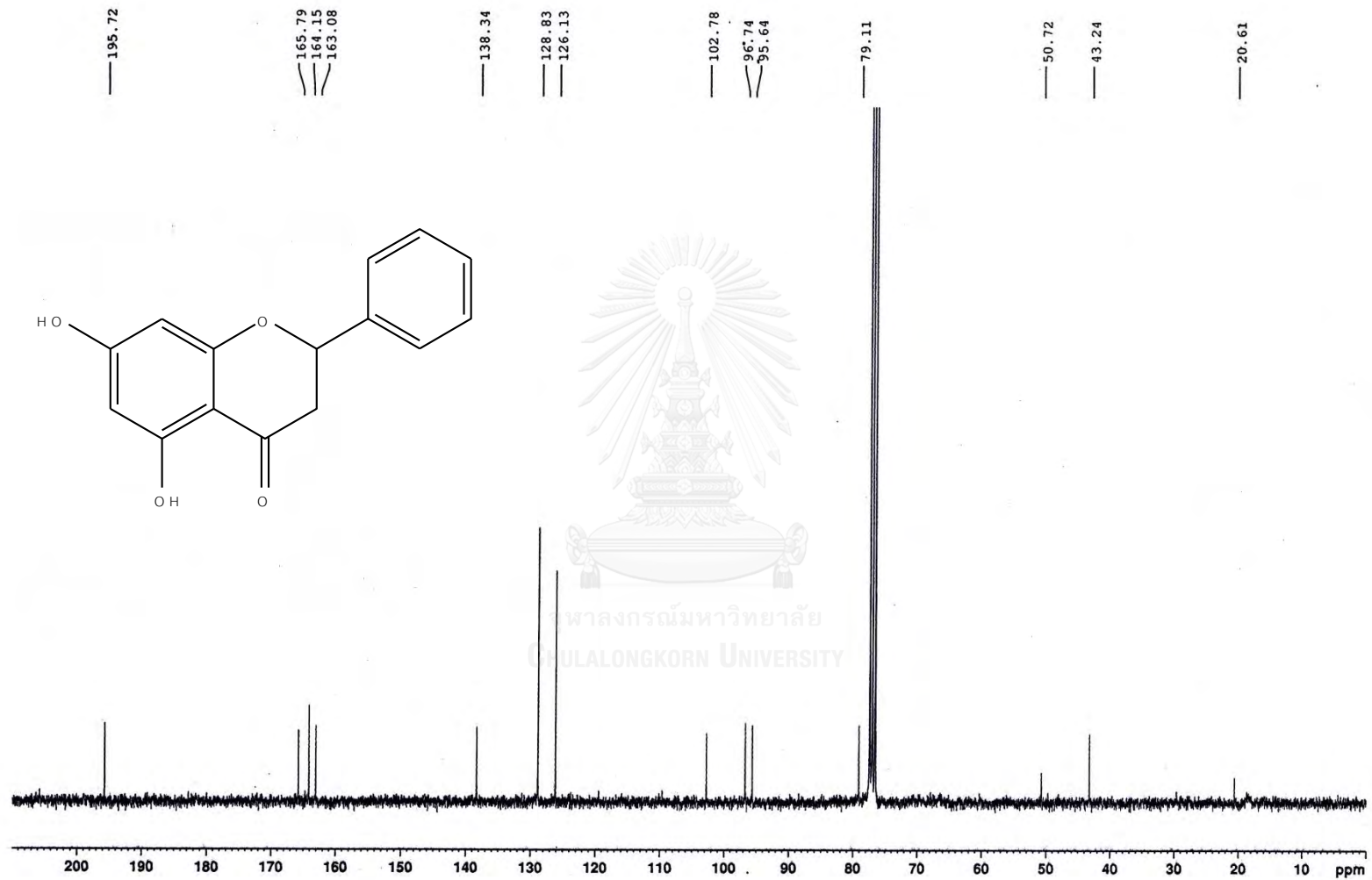
รูป A5 แสดง ¹H-NMR spectrum ของสาร 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol (P-2)



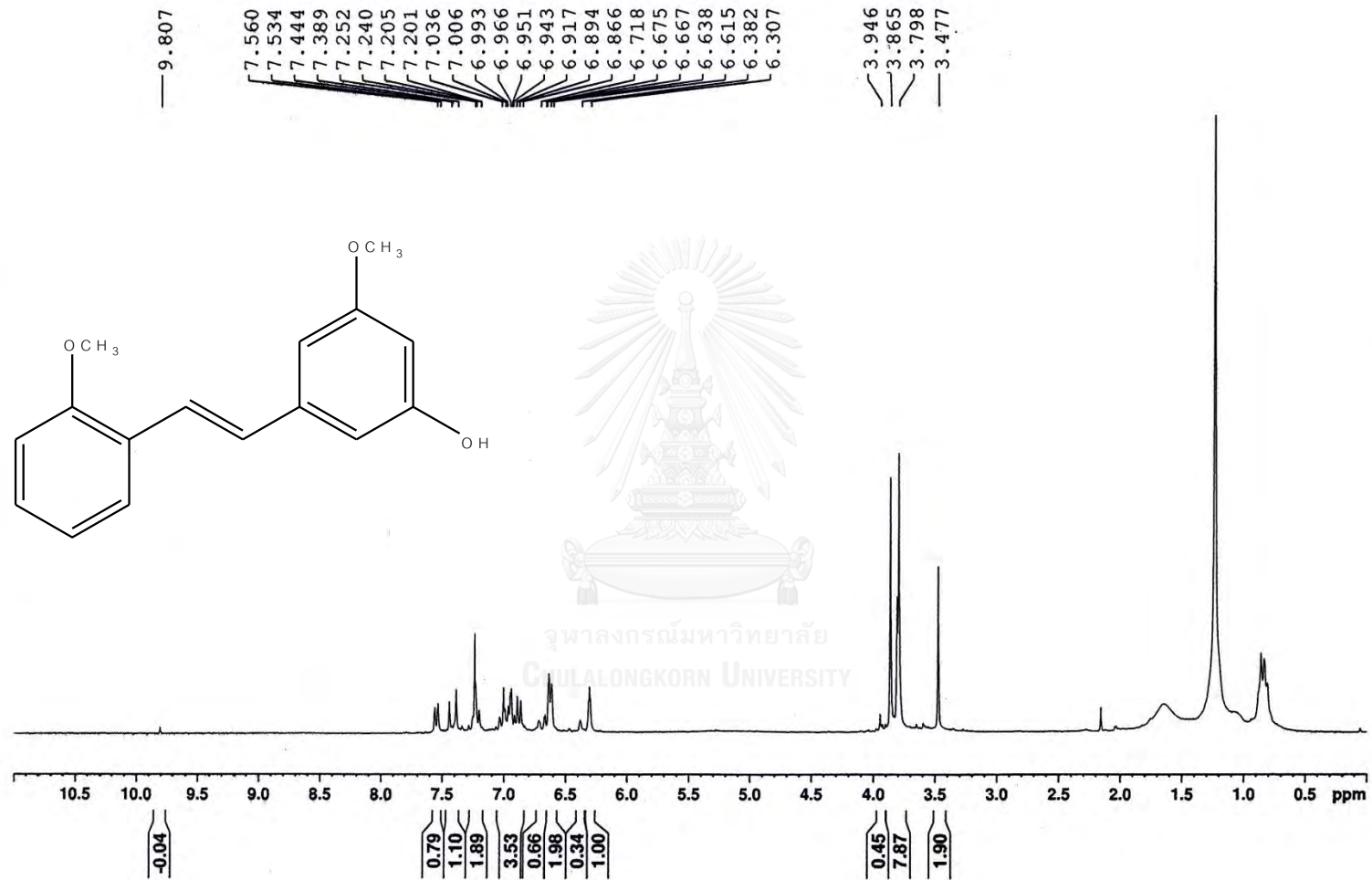
รูป A6 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 2-[(E)-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-phenol (P-2)



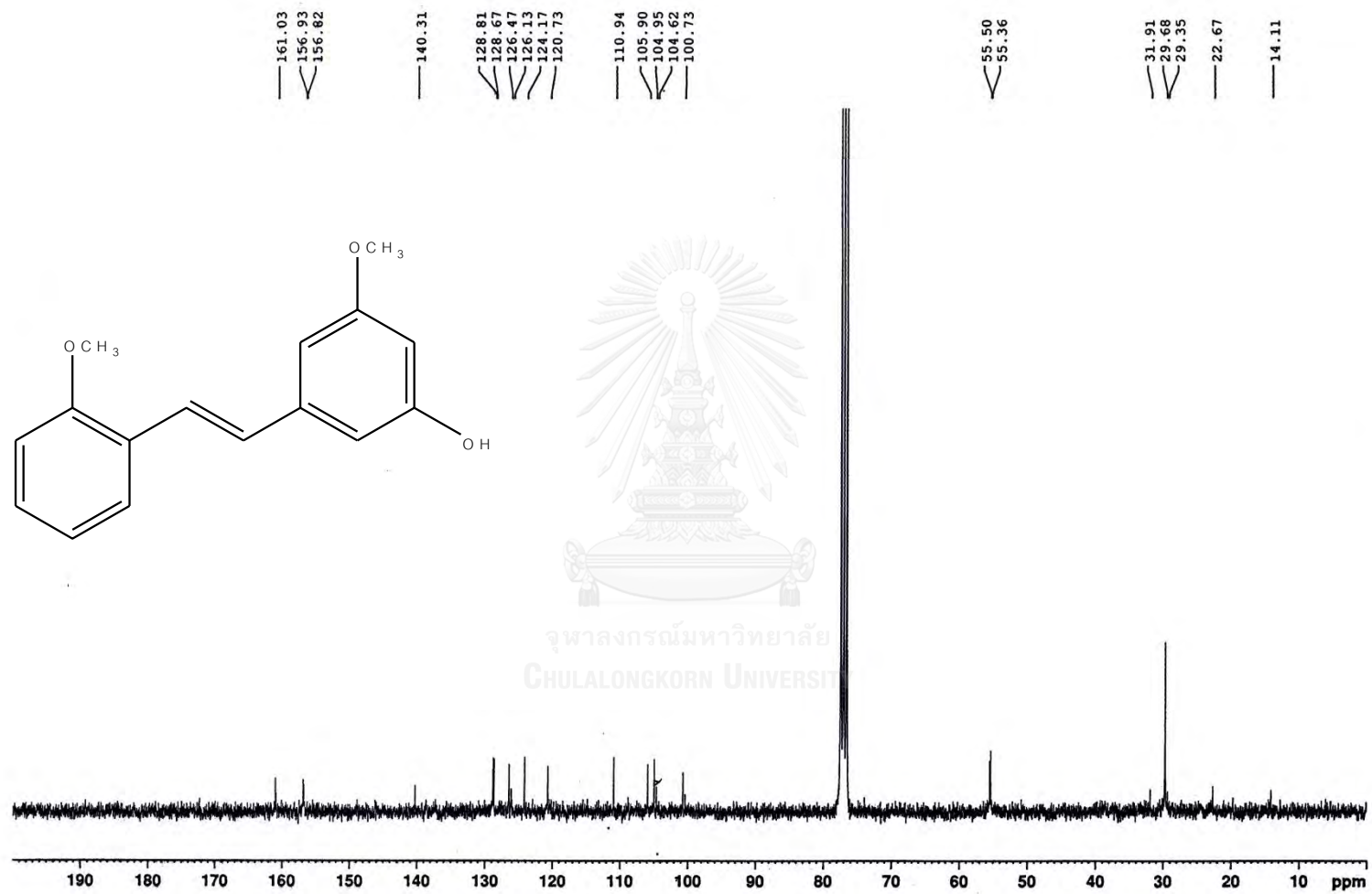
รูป A7 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร pinocembrin (P-3)



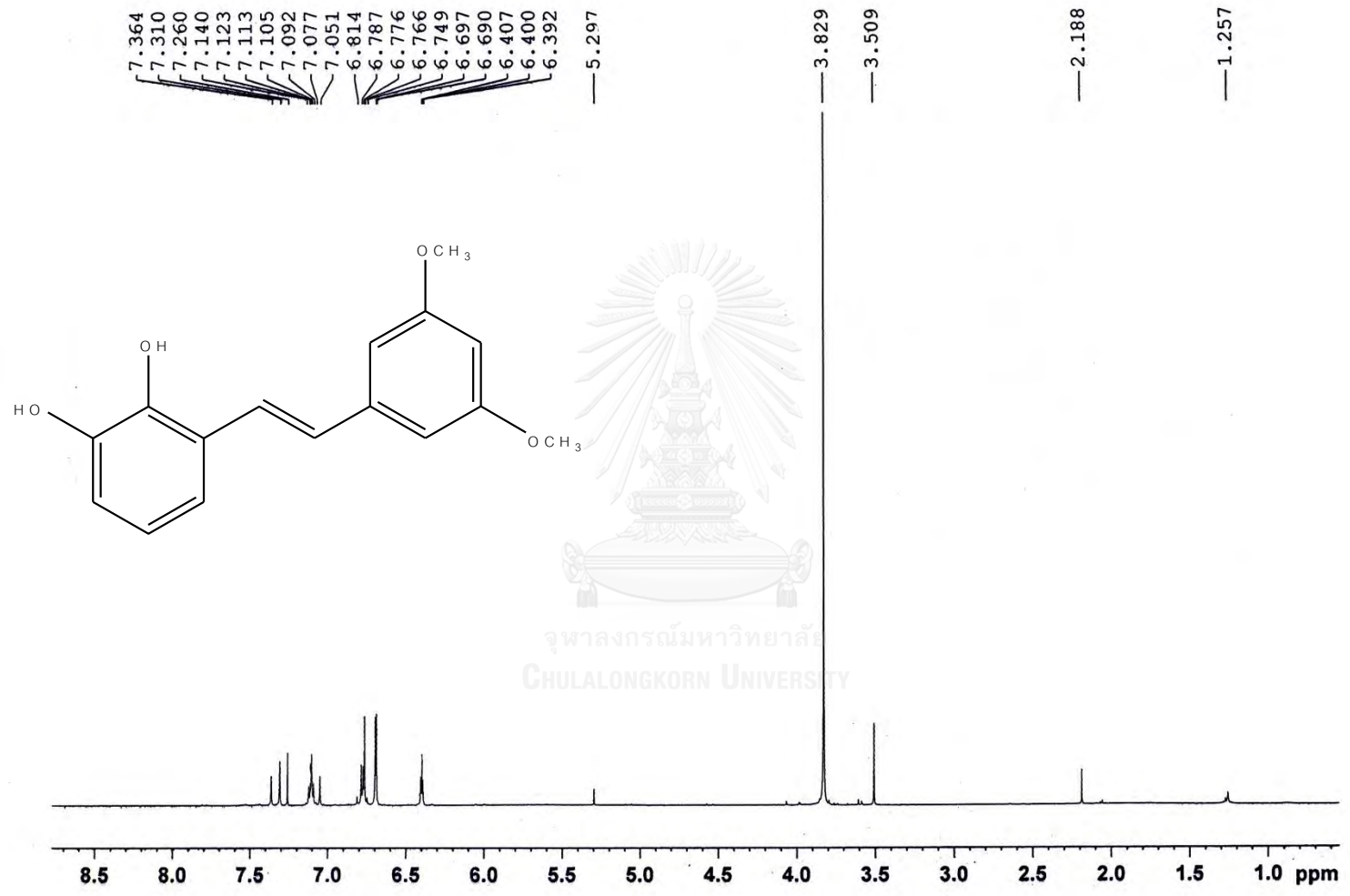
รูป A8 แสดง ¹³C-NMR spectrum ของสาร pinocembrin (P-3)



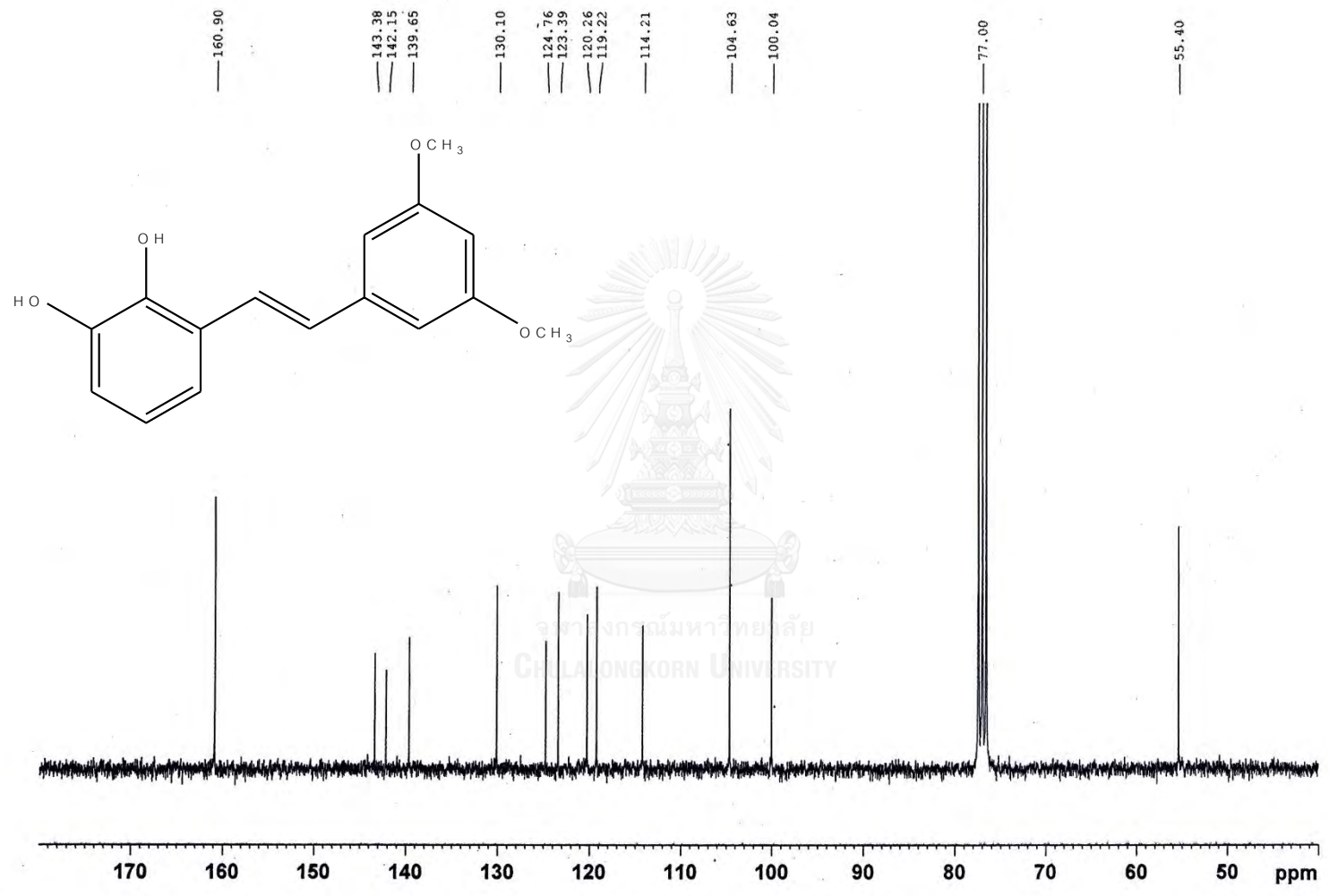
รูป A9 แสดง ¹H-NMR spectrum ของสาร 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene (P-4)



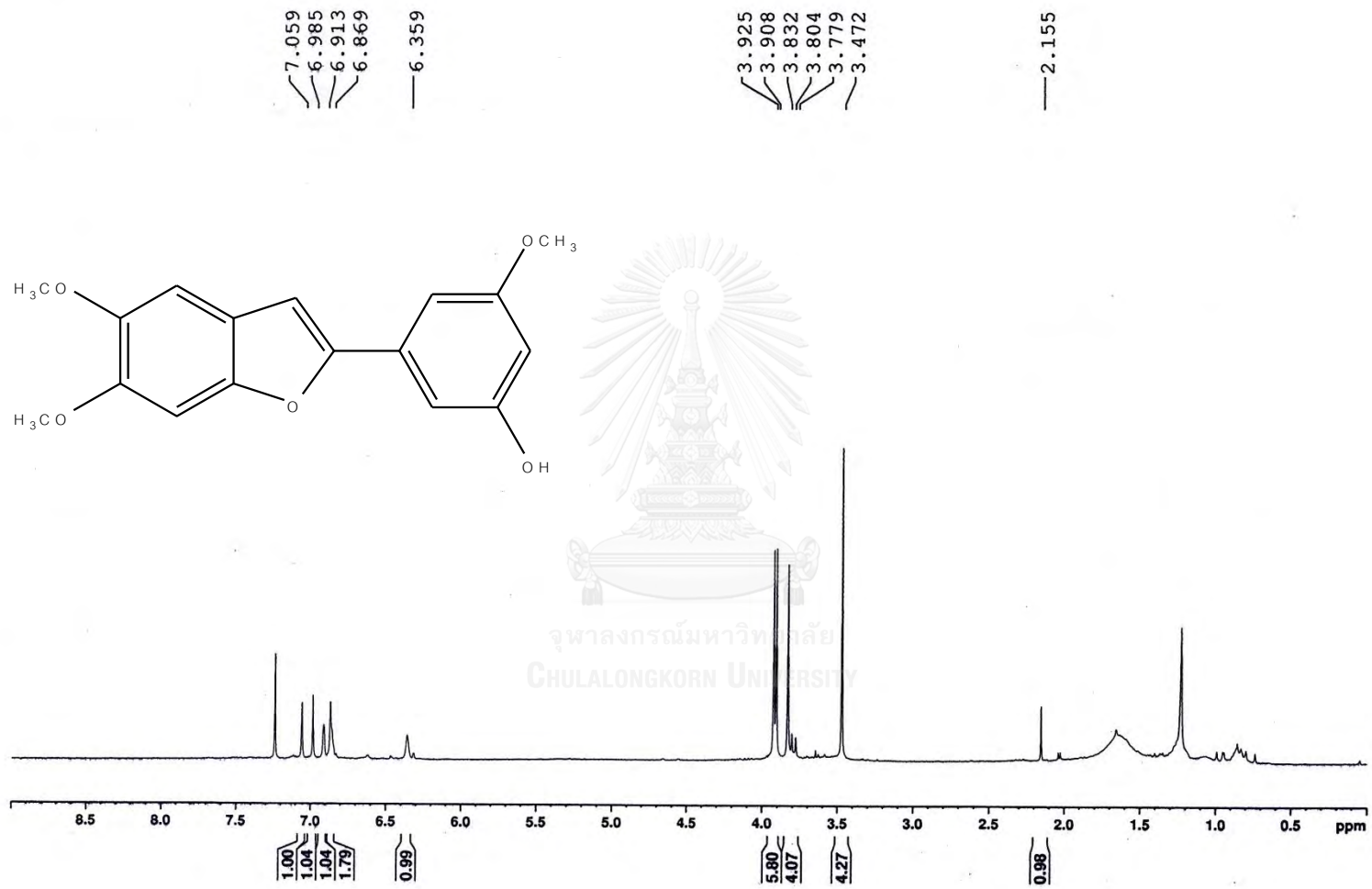
รูป A10 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 3'-hydroxy-2,5'-dimethoxystilbene (P-4)



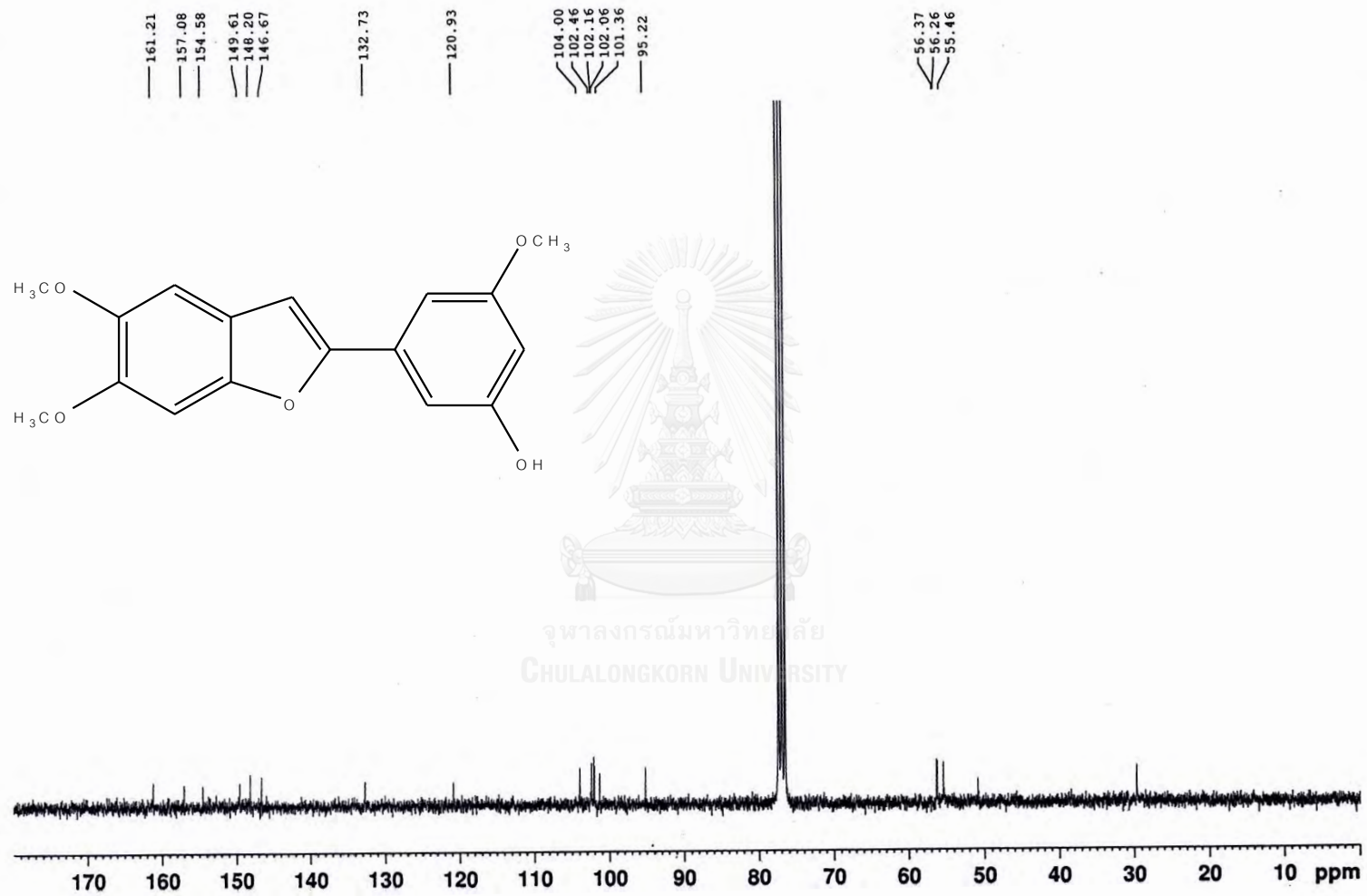
รูป A11 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสาร 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (P-5)



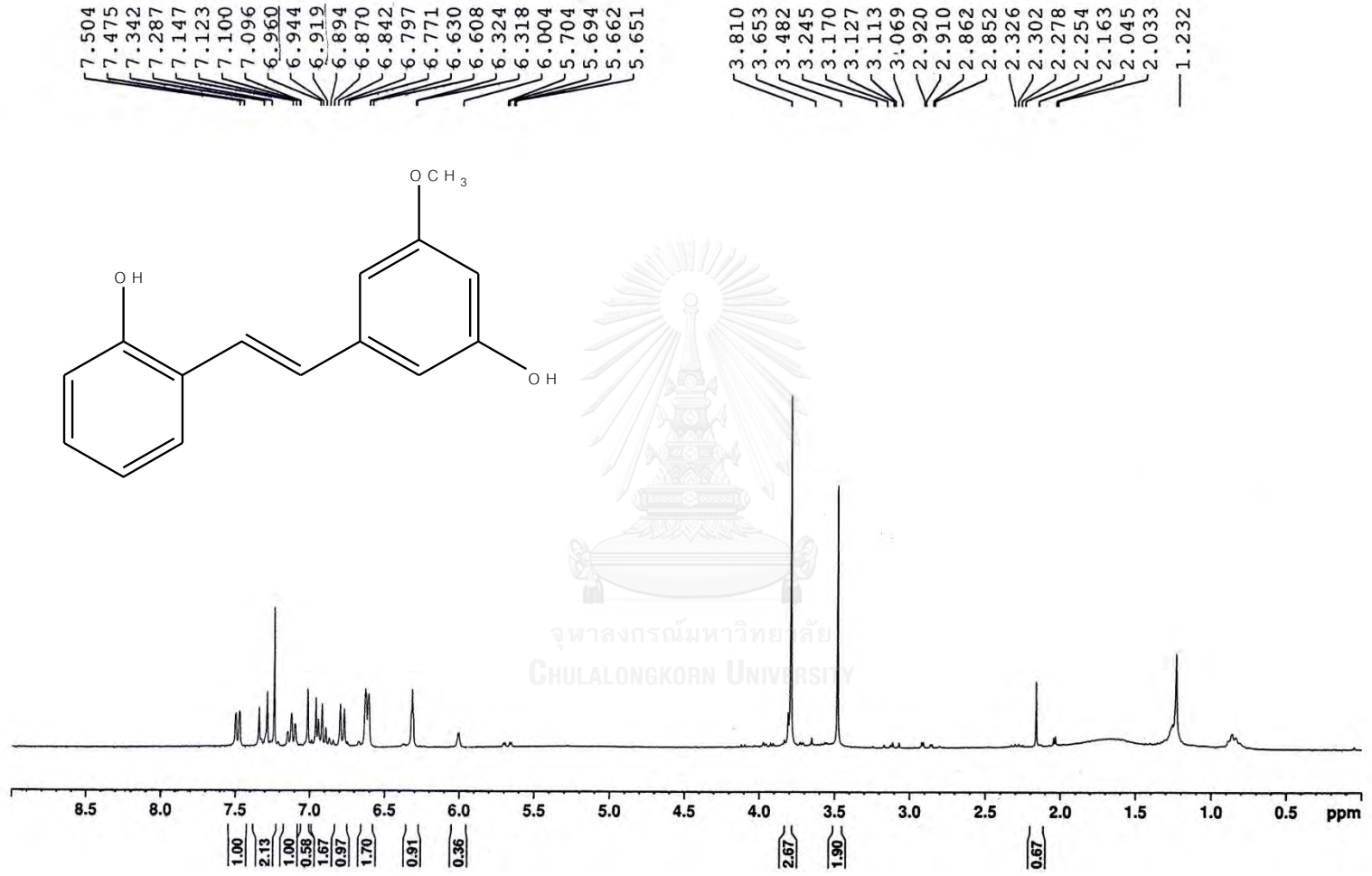
รูป A12 แสดง ¹³C-NMR spectrum ของสาร 2,3-dihydroxy-3',5'-dimethoxystilbene (P-5)



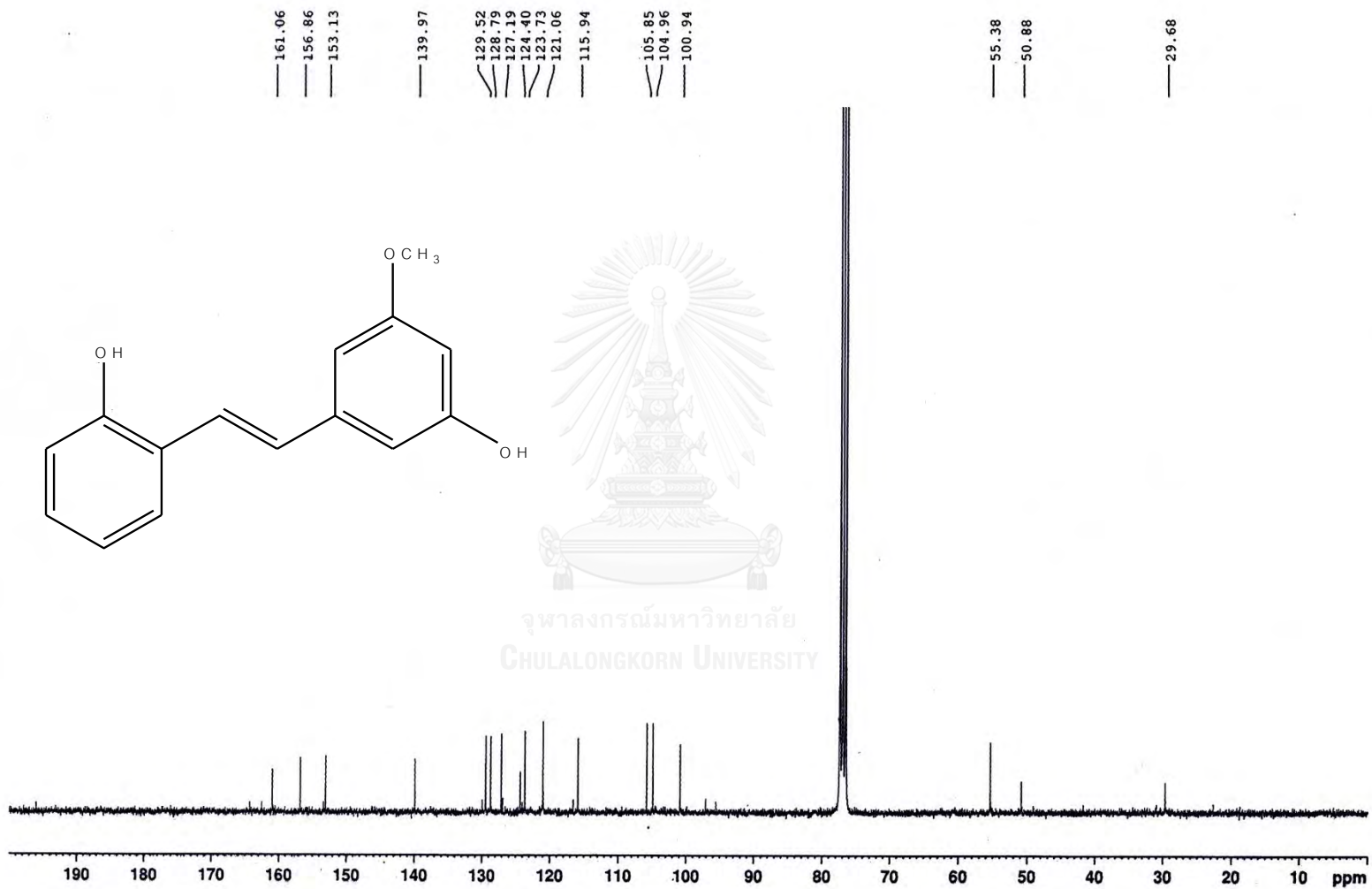
รูป A13 แสดง ¹H-NMR spectrum ของสาร 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran (P-6)



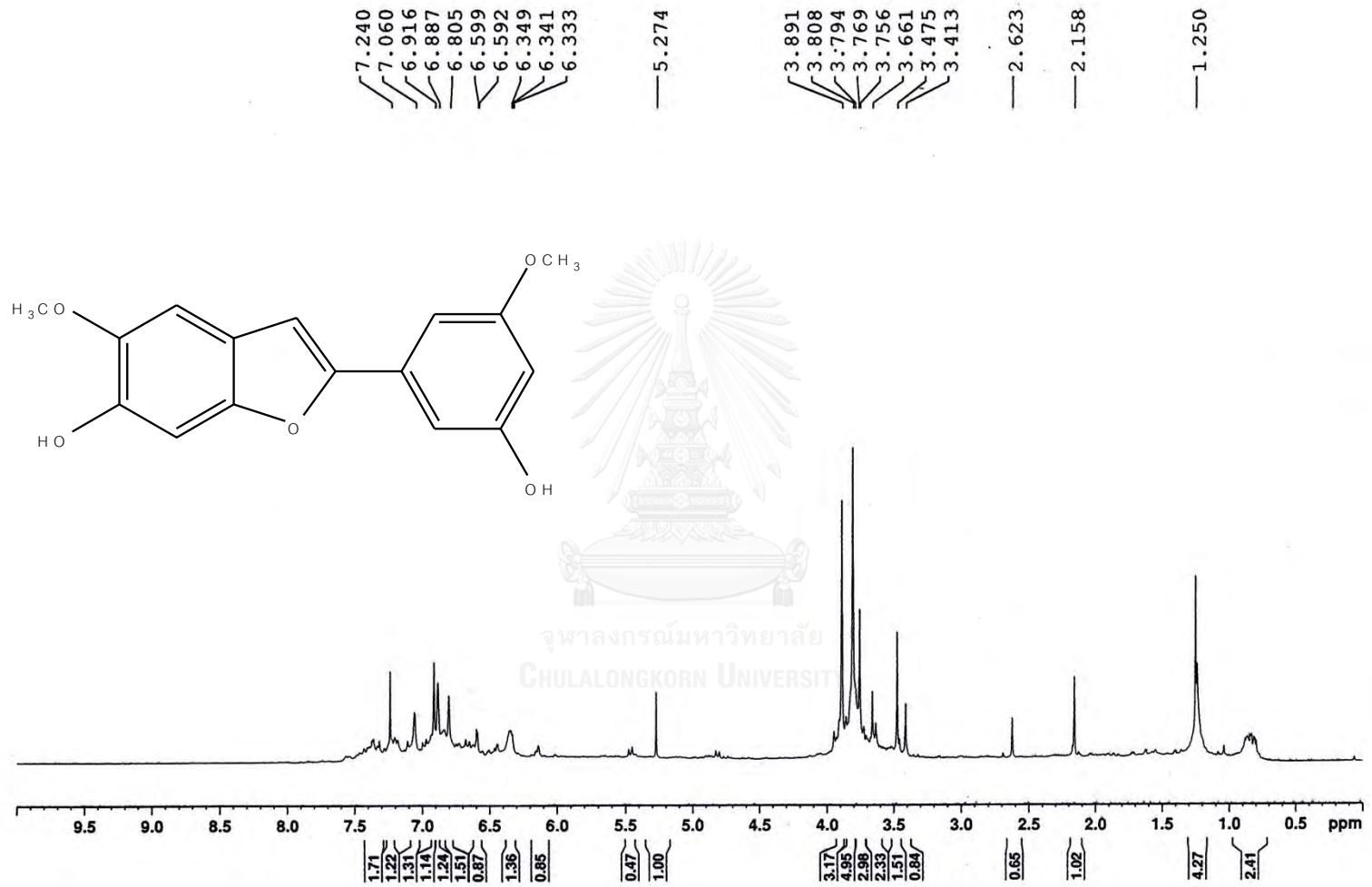
รูป A14 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 5,6-dimethoxy-2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)benzofuran (P-6)



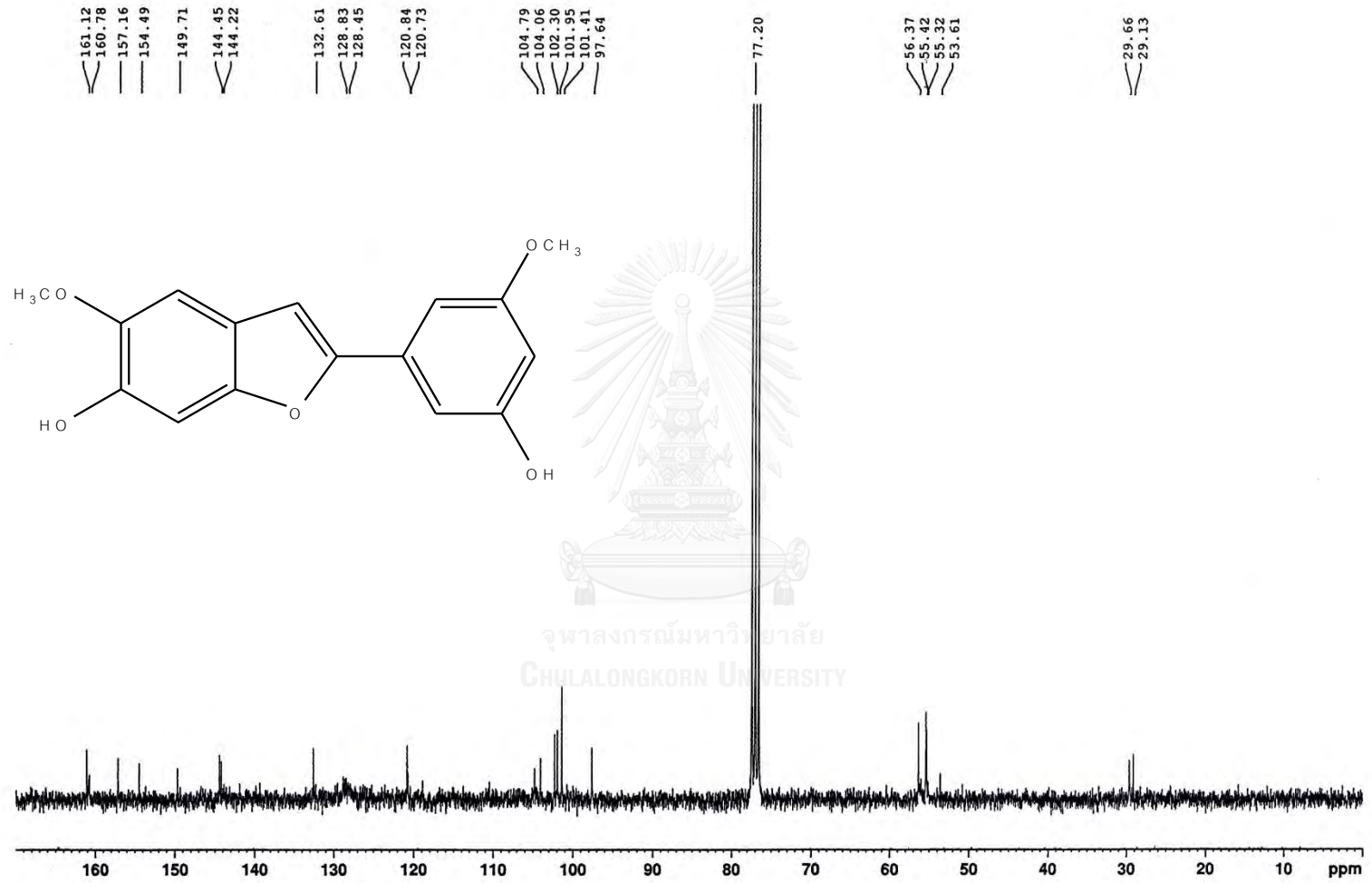
รูป A15 แสดง ¹H-NMR spectrum ของสาร 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene (P-7)



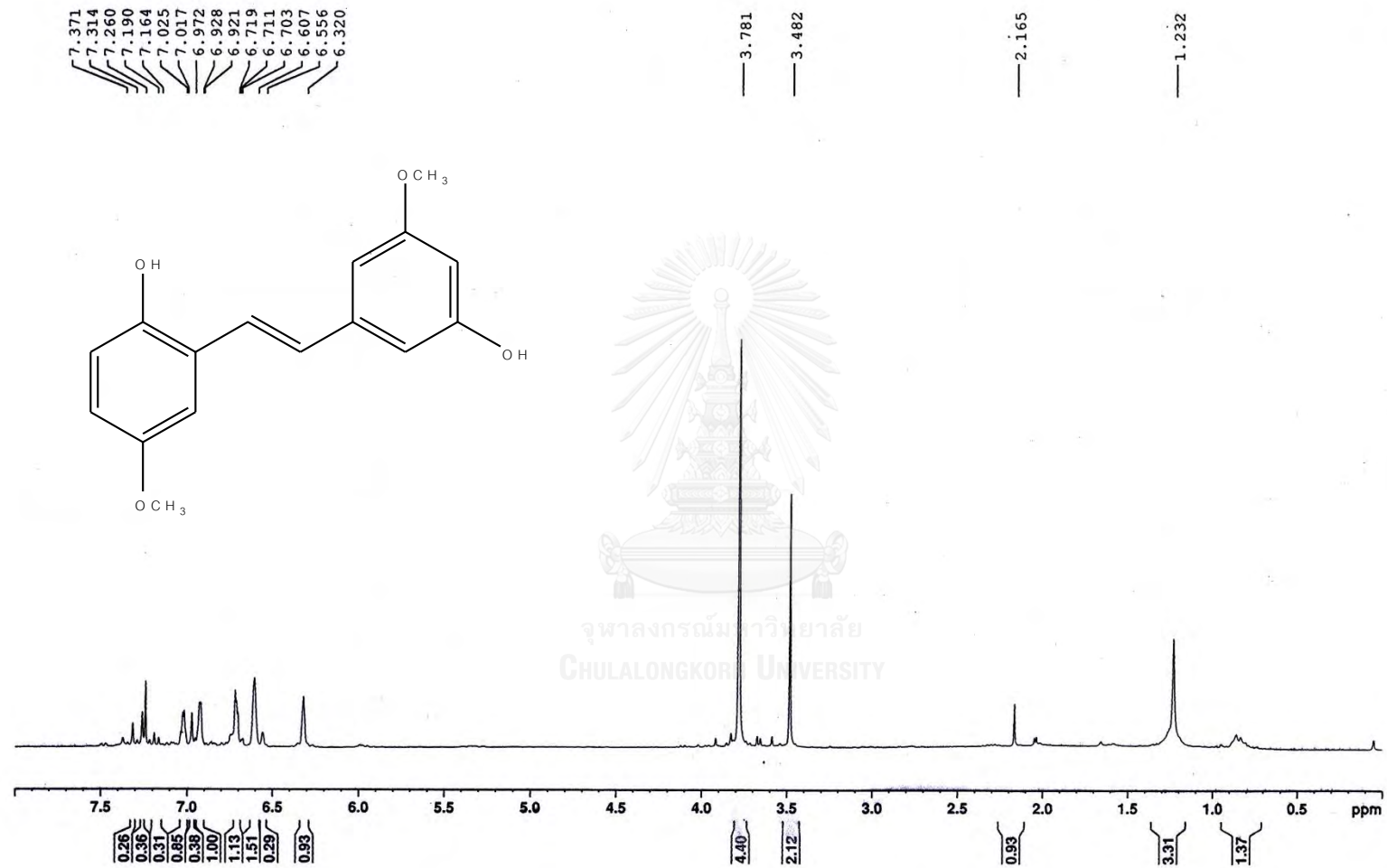
รูป A16 แสดง ¹³C-NMR spectrum ของสาร 2,3'-dihydroxy-5'-methoxystilbene (P-7)



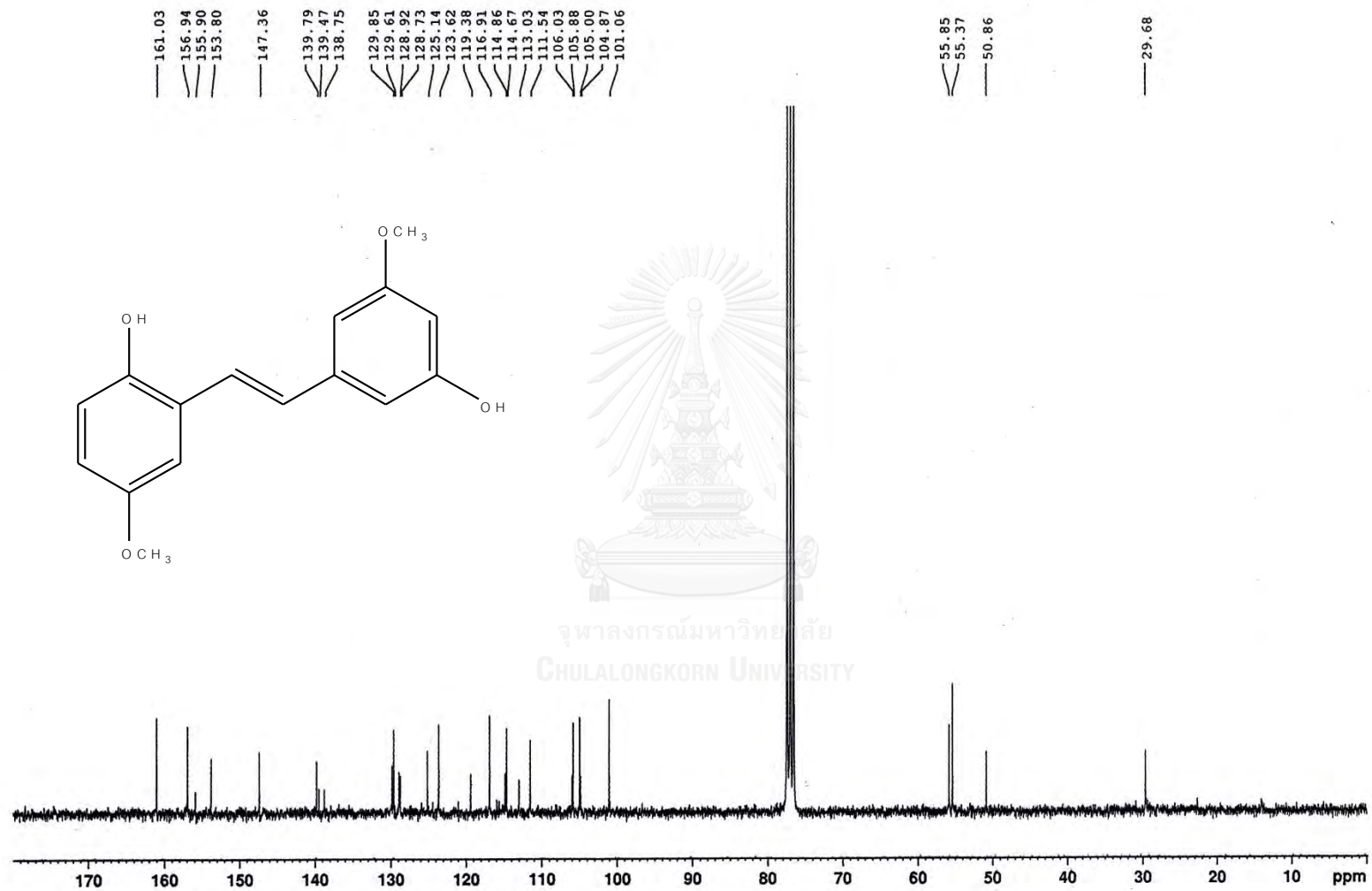
รูป A17 แสดง ¹H-NMR spectrum ของสาร 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-8)



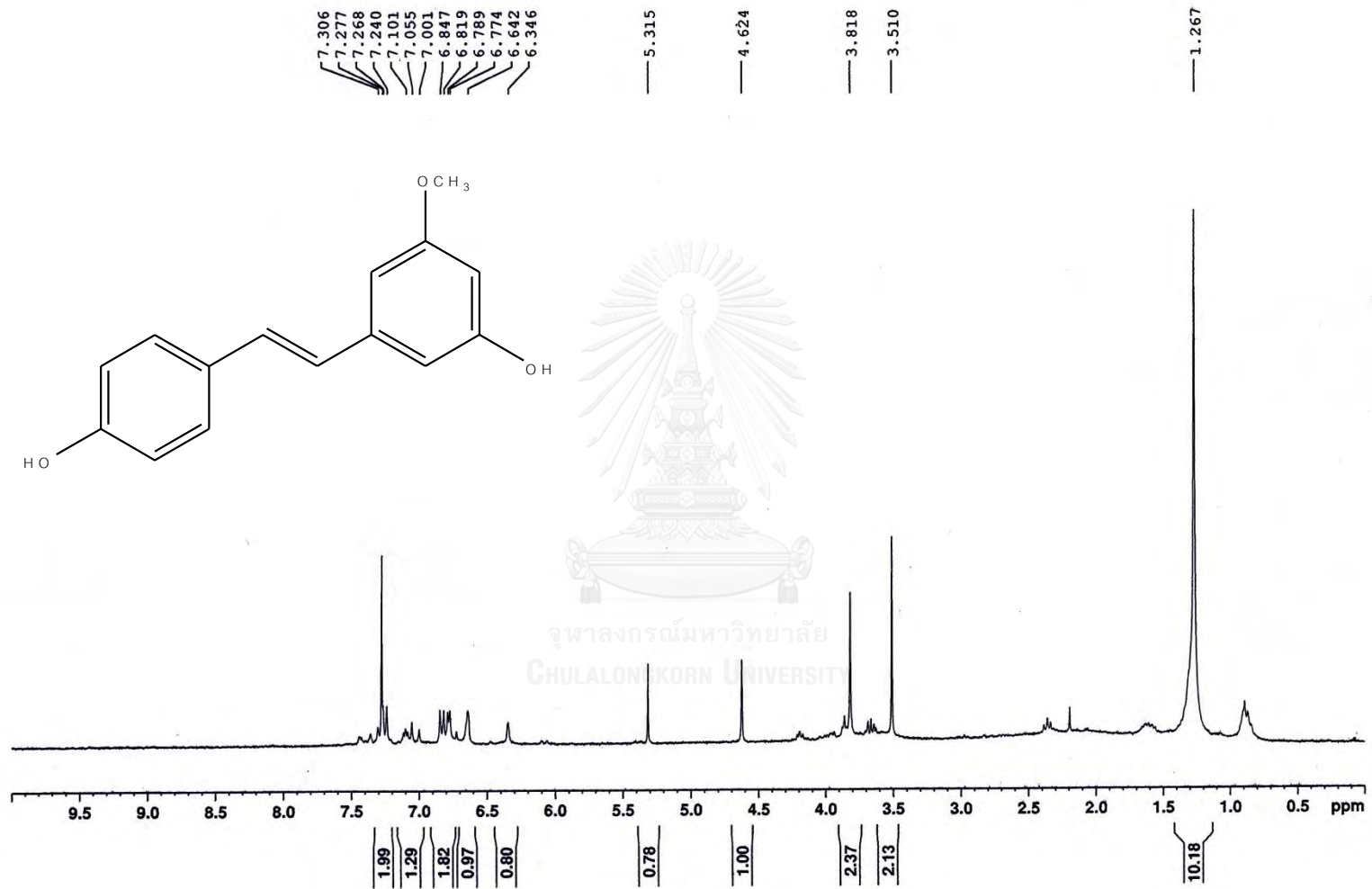
รูป A18 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 2-(5'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-6-hydroxy-5-methoxybenzofuran (P-8)



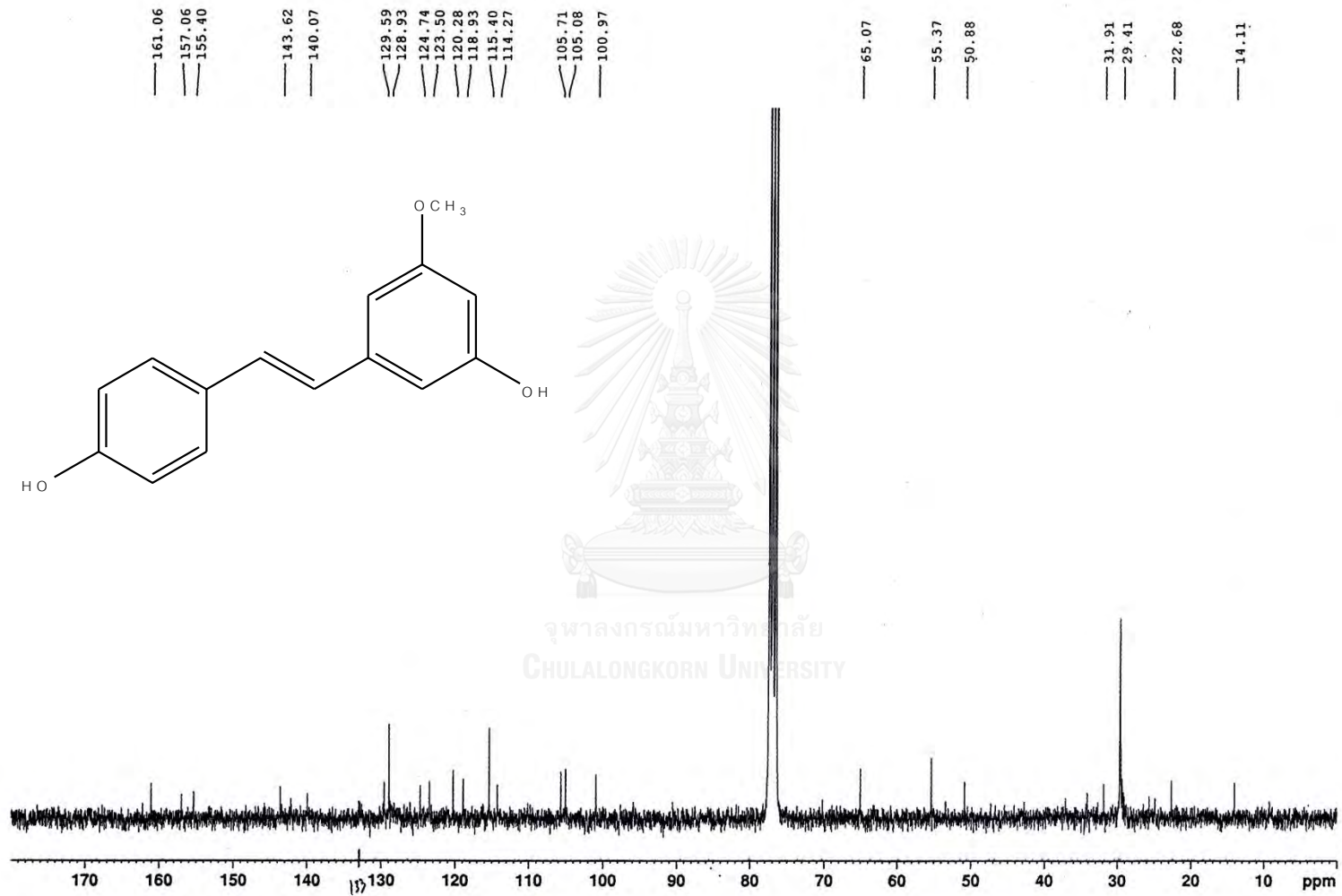
รูป A19 แสดง ¹H-NMR spectrum ของสาร 2,3'-dihydroxy-5,5'-dimethoxystilbene (P-9)



รูป A20 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสาร 2,3'-dihydroxy-5,5'-dimethoxystilbene (P-9)



รูป A21 แสดง ¹H-NMR spectrum ของสาร 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene (P-10)



รูป A22 แสดง ¹³C-NMR spectrum ของสาร 3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene (P-10)