



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระ¹
จากข้าพ鞠²

Acetylcholinesterase inhibitory and free radical scavenging
activities compounds from *Piper sarmentosum*

โดย

นางสาวระวีวรรณ แก้วอมตะวงศ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวนุตติยา วีระวัฒนชัย³
ผู้ร่วมวิจัย

คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พฤษภาคม 2557



สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระ¹
จากช้าพลู²

Acetylcholinesterase inhibitory and free radical scavenging
activities compounds from *Piper sarmentosum*

โดย

นางสาวรรภวิวรรณ แก้วอมวงศ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวนุตติยา วีระวรรณชัย³
ผู้ร่วมวิจัย

คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2553-2555
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อ.บ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เอื้อเพื่อ
สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ สำหรับทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกฝ่ายที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยเฉพาะ
นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการที่อำนวยความสะดวกด้านในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้ทุนสนับสนุนการดำเนินงานโครงการวิจัยจน
แล้วเสร็จ

รายงานการวิจัยเรื่อง	สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระ
หัวหน้าโครงการวิจัย	จากข้าพ鞠
ผู้ร่วมโครงการวิจัย	นางสาวระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์
ปีงบประมาณ	นางสาวนุตติยา วิระวันชัย
งบประมาณที่ได้รับ	2553-2555
คำสำคัญ	งบประมาณ 666,660 บาท
	ข้าพ鞠 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แอลคา洛iyd พลาโนโนยด์

บทคัดย่อ

ข้าพ鞠 เป็นพืชในสกุลพิริกไทย (*Piper*) ในประเทศไทยใช้เป็นอาหารและใช้เป็นพิชสมุนไพร ใน การศึกษานี้สามารถแยกสารได้ 7 ชนิดโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟหlays นิด จำกนั้นทำการพิสูจน์ เอกลักษณ์ของสารด้วยวิธีทางสเปคโทรสโคป และนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสาร 1-nitrosoimino-2,4,5-trimethoxybenzene แสดงฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้สูงที่สุด มีค่า IC_{50} เป็น $3.80 \mu M$ ส่วนสาร Isovitexin 2"-O- α -rhamnoside แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ NO ด้วยค่า IC_{50} 107.35 และ $97.96 \mu M$ ตามลำดับ

Research report name Acetylcholinesterase inhibitory and free radical scavenging activities compounds from *Piper sarmentosum*

Head of project Miss Rawiwun Kaewamatawong

Co-researcher Miss Nuttiya Werawattanachai

In Finance Year 2553-2555 for 666,660.- Baht

Keyword *Piper sarmentosum*; acetylcholinesterase inhibitory; free radical scavenging; alkaloids; flavonoid

Abstract

Piper sarmentosum Roxb., a plant of the genus *Piper*, is used for food and as a traditional medicine in Thailand. In this study, several chromatographic techniques were used to purify seven compounds from the leaf extract of this plant. The structures of these compounds were identified by extensive analyzing spectral data. The isolated compounds were studied for their ability to inhibit acetylcholinesterase and to scavenge free radicals. Among these compounds, 1-nitrosoimino-2,4,5-trimethoxybenzene had the highest acetylcholinesterase inhibitory activity, with an IC₅₀ value of 3.80 μM. Isovitexin 2"-O-α-rhamnoside showed free radical scavenging activity against the DPPH and NO radicals, with IC₅₀ values of 107.35 and 97.96 μM, respectively.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์	ญ
บทสรุปผู้บริหาร	ภ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 โรคอัลไซเมอร์	3
2.2 กระบวนการซึ่งสังเคราะห์และการทำลายอะเซทิลโคเลิน	3
2.3 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคเลินเอสเทอเรส	4
2.4 ภาวะเครียดออกซิเดทีฟ	5
2.5 อนุมูลอิสระกับกระบวนการเกิดโรค	5
2.6 การป้องกันอันตรายและความเสี่ยหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ	6
2.7 ลักษณะทางพฤติศาสตร์ของช้าพลู	10
2.8 องค์ประกอบเคมีของช้าพลู	11
2.9 ฤทธิ์ทางชีวภาพของช้าพลู	11
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	
3.1 การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร	23
3.2 เทคนิคทั่วไป	23

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.3 วิธีเตรียมสารสกัดจากพืช	25
3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	26
3.5 การแยกสารบริสุทธิ์	27
3.6 การหาค่า IC ₅₀ ของสารบริสุทธิ์	29
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผล	
4.1 ผลการสกัดใบโดยวิธีแข่สกัด	30
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัด	30
4.3 ผลการแยกสารสกัดทยาน	31
4.4 ผลการแยกสารบริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ที่แยกได้	31
4.4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-1	32
4.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-2	33
4.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-3	35
4.4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-4	37
4.4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-5	38
4.4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-6	40
4.4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-7	41
4.5 ผลการทดสอบและการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีน เอสเทอเรสของสารบริสุทธิ์	43
4.6 ผลการทดสอบและการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร บริสุทธิ์	45
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา	61
บรรณานุกรม	62

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ โดยใช้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี ต่างๆ โดยใช้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี	9
2 อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้แยกสารสกัดชั้น methanol 3 อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้แยกสารจากส่วนสกัด PS-1 4 น้ำหนักของสารสกัดทราย 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ซึ่งภาพของสารสกัด 6 น้ำหนักส่วนสกัดย่อย 7 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-1 in acetone- d_6 8 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-2 in acetone- d_6 9 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-3 in acetone- d_6 10 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-4 in acetone- d_6 11 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-5 in acetone- d_6 12 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-6 in acetone- d_6 13 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-7 in methanol- d_4 14 ผลการศึกษา % ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคเลสเทอเรสของสารบริสุทธิ์ ของสารบริสุทธิ์	27 28 30 30 31 32 34 36 37 39 40 42 44

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
15 ผลการหาค่า IC_{50} ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอ เรสของสารบริสุทธิ์	44
16 ผลการศึกษา IC_{50} ในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร PS-7	46
17 ผลการศึกษา IC_{50} ในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ NO ของสาร PS-7	46

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ช้าพลู (<i>Piper sarmentosum Roxb.</i>)	10
2 องค์ประกอบเคมีของช้าพลู	13
3 ลักษณะของช้าพลู	25
4 การระเหยสารสกัดให้แห้ง	26
5 กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสาร PS-1-PS-7 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	43
6 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร PS-1-PS-7 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	45
7 The HREIMS mass spectrum of compound PS-1	47
8 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-1 (acetone- d_6)	47
9 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-1 (acetone- d_6)	48
10 The HMBC correlation of compound PS-1 (acetone- d_6)	48
11 The HREIMS mass spectrum of compound PS-2	49
12 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-2 (acetone- d_6)	49
13 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-2 (acetone- d_6)	50
14 The HMBC correlation of compound PS-2 (acetone- d_6)	50
15 The HREIMS mass spectrum of compound PS-3	51
16 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-3 (acetone- d_6)	51
17 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-3 (acetone- d_6)	52
18 The HMBC correlation of compound PS-3 (acetone- d_6)	52
19 The HREIMS mass spectrum of compound PS-4	53
20 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-4 (acetone- d_6)	53

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
21	The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-4 (acetone- d_6) 54
22	The HMBC correlation of compound PS-4 (acetone- d_6) 54
23	The HREIMS mass spectrum of compound PS-5 55
24	The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-5 (acetone- d_6) 55
25	The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-5 (acetone- d_6) 56
26	The HMBC correlation of compound PS-5 (acetone- d_6) 56
27	The HREIMS mass spectrum of compound PS-6 57
28	The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-6 (acetone- d_6) 57
29	The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-6 (acetone- d_6) 58
30	The HMBC correlation of compound PS-6 (acetone- d_6) 58
31	The HREIMS mass spectrum of compound PS-7 59
32	The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-7 (methanol- d_4) 59
33	The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-7 (methanol- d_4) 60
34	The HMBC correlation of compound PS-7 (methanol- d_4) 60

คำอธิบายสัญลักษณ์

br	= Board (for NMR spectra)
¹³ C NMR	= Carbon nuclear magnetic resonance
δ	= Chemical shift
d	= Doublet (for NMR spectra)
dd	= Doublet of doublet (for NMR spectra)
HREIMS	= High resolution electron impact mass spectrometry
g	= Gram
¹ H NMR	= Proton nuclear magnetic resonance
HMBC	= ¹ H-detected heteronuclear multiple bond coherence
HSQC	= Heteronuclear single quantum correlation
J	= Coupling constant
L	= Liter
m	= Multiplet (for NMR spectra)
mg	= Milligram
ml	= Milliliter
μ g	= Microgram
μ l	= Microliter
M ⁺	= Molecular ion
[M+H] ⁺	= Protonated molecular ion
m/z	= Mass to charge ratio
NOE	= Nuclear over hauser effect
nm	= Nanometer
ppm	= Part per million
q	= Quintet (for NMR spectra)
TLC	= Thin layer chromatography
t	= Triplet (for NMR spectra)
UV-VIS	= Ultraviolet Visible spectrophotometry

บทสรุปผู้บริหาร

จากการนำไปของช้าพลู *P. sarmentosum* มาทำแยกสารจากนั้นศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยการใช้วิธีการทางスペคโตรเมทรี จากนั้นนำสารเหล่านั้นทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูลสารที่แยกได้ประกอบด้วยกลุ่มสาร aromatic alkenes, alkalooids และ flavonoid ได้แก่ α -asarone, 3-phenylpropanoyl pyrrole, 3-(4-methoxyphenyl)propanoyl pyrrole, 1-nitrosoimino-2,4,5-trimethoxybenzene, 2',4',5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine, ρ -methoxycinnamic acid และ isovitexin 2"-O- α -rhamnoside

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารบริสุทธิ์ จากช้าพลู พบร่วงสารที่แสดงฤทธิ์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นี้ได้ที่สุดคือ 1-nitrosoimino-2,4,5-trimethoxy benzene ที่ IC_{50} 3.80 μM

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ NO ของสารบริสุทธิ์จากช้าพลู พบร่วงสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ NO ได้สีที่สุดคือ isovitexin 2"-O- α -rhamnoside ที่ IC_{50} 107.35 และ 97.96 μM ตามลำดับ

บทที่ 1

บทนำ

(Introduction)

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ภาวะสมองเสื่อม เกิดจากการทำงานของสมองที่เสื่อมลงจนมีผลกระทบต่อการรับรู้ต่างๆ ทั้งการสูญเสียความทรงจำ และการใช้ความคิด ซึ่งข้อมูลในต่างประเทศพบว่า ร้อยละ 1 ของผู้ที่มีอายุเกิน 60 ปี เป็นผู้ป่วยสมองเสื่อมและจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในทุกๆ 5 ปี ทั้งนี้สาเหตุอันดับหนึ่งของภาวะสมองเสื่อม เกิดจากโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer) ปัจจุบันในประเทศไทย โรคอัลไซเมอร์เป็นสาเหตุอันดับท้าของการเสียชีวิตในประชากรอายุ 65 ปี ขึ้นไป และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในอนาคต ทำให้คาดการณ์ว่าจะต้องใช้จ่ายงบประมาณในการรักษาโรคนี้และความจำเสื่อมอีก รวมเป็นเงินประมาณ 148 พันล้านเหรียญสหรัฐอเมริกา (Alzheimer's association, 2009) สำหรับประเทศไทย โครงสร้างประชากรกำลังเปลี่ยนไปสู่สังคมผู้สูงอายุ โดยคาดว่าในปี พ.ศ. 2578 จำนวนผู้สูงอายุจะเพิ่มขึ้นเป็น 16 ล้านคน (ร้อยละ 25) ของประชากรทั้งหมด (ปัทมาและปราโมทย์, 2548) และขณะนี้มีประชากรสูงอายุ ตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไป เกิดภาวะสมองเสื่อมโดยเฉลี่ย ร้อยละ 4-11 หรือประมาณ 4-5 แสนคน โดยสาเหตุหลัก มาจากโรคอัลไซเมอร์ถึงร้อยละ 10 และคาดว่าในปี 2563 จะเพิ่มเป็นร้อยละ 15 (สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ, 2550)

สาเหตุของการเกิดอัลไซเมอร์มีหลายสาเหตุ ได้แก่ การมีระดับของสารสื่อประสาทชนิดอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ลดลงมาก สารสื่อประสาทชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทโคลิเนอจิก (cholinergic) ในร่างกาย ทำให้การส่งสัญญาณประสาทไปยังสมองส่วนนีโอคอร์เทกซ์ (neocortex) และ hippocampus ที่ควบคุมการเรียนรู้และความจำลดน้อยลง (Perry et al., 1999) จากการศึกษาสมองผู้ป่วยอัลไซเมอร์จะพบการสะสมของอิมโคลอยด์เปปไทด์ (amyloid peptides) เกิดเป็นแผ่นคราบอิมโคลอยด์ (amyloid plaque) และเกิดปมไขประสาท (neurofibrillary tangles) จากการเติมหมุ่ฟอสเฟตของเทาโปรตีน (hyperphosphorylated tau protein) ทำให้การเชื่อมต่อสัญญาณ (synapse) ของเซลล์ประสาทสูญหายไป และการสะสมของแผ่นคราบอิมโคลอยด์ ทำให้สมองอักเสบจากภาวะเครียดออกซิเดทีฟ (oxidative stress) จากการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (เกษร และคณะ, 2548) จากหล่ายสาเหตุร่วมกันส่งผลให้ผู้ป่วยมีความสามารถในการเรียนรู้ สติปัญญา และความจำที่ลดลง มีอาการความจำเสื่อม อารมณ์เปลี่ยนแปลงง่าย บุคลิกภาพเปลี่ยนแปลงและมีอาการมาก ๆ ผู้ป่วยจะไม่สามารถช่วยตัวเองได้ เป็นปัญหาของคน老และผู้อื่น (สุทธิพันธ์, 2538)

ในปัจจุบันการรักษาโรคอัลไซเมอร์จะใช้หล่ายวิธีร่วมกัน ได้แก่ การให้ยาในกลุ่มยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterase inhibitors, AChE-Is) โดยยาท่องค์การอาหารและยา

รับรองได้แก่ donezepil, rivastigmine และ galantamine จะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ทำให้ระดับของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนเพิ่มขึ้น ช่วยเพิ่มการทำงานของระบบประสาทโคลิเนอร์จิก (Liston et al., 2004; Rathmann and Conner, 2007) และสามารถยับยั้งการสะสมของอไมโลยดเปปไทด์ ในสมองได้ (Sabbagh et al., 2006) ยกกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ ยาป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท (neuroprotective agents) (Longo and Massa, 2004) รวมถึงสารต้านออกซิเดชัน (antioxidants) ได้แก่ วิตามินอี (Remington, 2009) สารสกัดจากพืช ได้แก่ สารสกัดใบแบงกัวย EGb 761 หรือ สารสติลเบนส์ (stillbenes) เช่น resvaratrol มีผลลดภาวะการเกิดออกซิเดชันทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลายน้อยลง (ชุดima, 2550)

สารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส เช่น huperzine A แยกจากมoss *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. สาร (-)-galantamine แยกจากดอก *Galanthus nivalis* L. และสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น EGb 761 แยกจาก *Ginkgo biloba* L., resvaratrol แยกจาก *Vitis vinifera* L. ดังนั้นพืชจึงเป็นแหล่งสำคัญในการค้นหาสารที่มีฤทธิ์รักษาโรคนี้

จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยต่อพืชหลายชนิดในวงศ์พริกไทย (Piperaceae) เพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส พบร่วมกับสารสกัดเมธานอลของใบช้าพลู *Piper sarmentosum* Roxb. ที่ความเข้มข้น 100 มิโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ดี และมีผู้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ในสารสกัดเมธานอลของใบช้าพลูพบว่ามีดัชนีต้านออกซิเดชัน (antioxidant index) ที่สูง (Chanwitheesuk et al., 2005) คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส และต้านอนุมูลอิสระจากช้าพลู โดยการสกัด ทดสอบ และเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระ จากนั้นแยกบริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์สารจากส่วนของพืชที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี เพื่อทำให้เกิดการวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรอย่างเป็นระบบ และนำความรู้ที่จะได้นี้ไปวิจัยต่อยอดหรือใช้พัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่างๆ เป็นการพัฒนาองค์ความรู้บนพื้นฐานจากความหลากหลายทางชีวภาพ เป็นการเพิ่มคุณค่าและอนุรักษ์ผ้าพื้นบ้านของไทย นำไปสู่การใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างคุ้มค่าและยั่งยืน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ทดสอบและเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารสกัดจากช้าพลู
- 1.2.2 ทดสอบฤทธิ์และเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบช้าพลู
- 1.2.3 แยกและพิสูจน์เอกลักษณ์สารออกฤทธิ์จากสารสกัดช้าพลู

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม (Literature Review)

2.1 โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคทางสมองชนิดหนึ่งที่พับได้บอยที่สุด โดยจะมีการเสื่อมของเซลล์สมองทุกส่วน เป็นแล้วไม่มีวันหาย ผู้ป่วยจะไม่สามารถควบคุมอารมณ์ต้นเองได้ นอกจากนั้นยังไม่สามารถแยกถูกผิดความจำเสื่อม มีปัญหาในเรื่องการใช้ภาษา การประสานงานของกล้ามเนื้อเสีย ในสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์จะพบการทำลายของระบบประสาทโคลิเนอร์จิกในระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้ระดับของอะเซทิลโคลีนและเอนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานส์เฟอเรส (choline acetyltransferase) ที่ใช้ในการสังเคราะห์อะเซทิลโคลีน (acetylcholine) ลดลง พบรากะสมของแผ่นคราบอ่อนลอยด์และปมไขประสาท ส่งผลกระตุ้นให้เซลล์ประสาทเกิดกระบวนการออกซิเดชัน ทำให้เซลล์ประสาထายนิ่วสุด

พยายามสภาพของการเกิดโรค พบรากะสมของแผ่นคราบอ่อนลอยด์และปมไขประสาท จะกระตุ้นให้เซลล์ประสาทเกิดกระบวนการออกซิเดชันและการอักเสบ มีการสะสมของอนุมูลอิสระ (free radical) ที่มากขึ้น ซึ่งทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดทิฟ ทำให้ร่างกายไม่มีความสมดุลกันระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น อนุพันธ์ของออกซิเจน เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) และ ไฮโดรเจนเพอโรอิด (hydrogen peroxide) อนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าไปทำลายโมเลกุลต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น กรณีวิตามิน โปรตีนและไขมัน เป็นต้น เป็นผลให้เซลล์สมองถูกทำลายไป จึงมีการนำสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาให้ในภารกษา เพื่อชะลอการดำเนินไปของโรค

2.2 กระบวนการซึ่งสังเคราะห์และการทำลายอะเซทิลโคลีน

อะเซทิลโคลีนเป็นสารสื่อประสาทที่หลังจากปลายประสาทโดยมีโคลีน (choline) จากตับเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ ปลายประสาทที่สร้างอะเซทิลโคลีน (acetylcholine) จะถูกซึมโคลีนเข้าสู่ไซโตพลาสซัม (cytoplasm) โดยระบบตัวพาที่ใช้พลังงาน เพื่อร่วมกับกลุ่มอะเซทิลโคลีนไชม์เอ (acetyl CoA) โดยใช้ออนไซม์โคลีนอะเซทิลทรานส์เฟอเรสได้ผลิตภัณฑ์อะเซทิลโคลีนสะสมไว้ใน-vesicle ที่ปลาย axon เมื่อกระแทกประสาทวิ่งมาถึงปลายประสาทจะเปิดช่องให้แคลเซียมไอออน (Ca^{++}) เข้าไปในปลายประสาท เพื่อช่วยดึงกระเบ้าให้สัมผัสเยื่อหุ้มเซลล์แล้วหลังอะเซทิลโคลีนหล่ายพันโนเมเลกุลผ่านช่องว่างไซแนปส์ไปกระทบต่อรีเซปเตอร์ (receptor) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ถัดไป

อะเซทิลโคลีนมีคุณสมบัติเป็นทั้งแบบกระตุ้นและแบบยับยั้งขึ้นอยู่กับชนิดของรีเซปเตอร์ที่กระทบต่ออะเซทิลโคลีนนั้น ซึ่งเมื่อทำงานเสร็จอะเซทิลโคลีนจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์อะเซทิลโคลีน

เอสเตอเรสที่อยู่ตามผิวเยื่อหุ้มเซลล์ให้กล้ายเป็นโคลีนและกรดอะซิติก นอกจากนี้โคลีนส่วนหนึ่งจะถูกดูดกลับเข้าปลายประสาทเพื่อใช้สังเคราะห์อะเซทิลโคลีนขึ้นมาใหม่ (สุทธิพันธ์, 2538)

2.3 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

Huperzine A เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นอัลคาโลย์ดจำพวก unsaturated sesquiterpene alkaloid ที่แยกได้จากมoss *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. มีชื่อเรียกในภาษาจีน ว่า Qian Ceng Ta หรือ Jin Bu Huan (แปลว่ามีค่ามากกว่าทอง) ในยาจีนแผนโบราณ จะใช้มอสชนิดนี้รักษาอาการไข้ อาการอักเสบ การไหลเวียนโลหิตที่ผิดปกติ และโรคจิตเภท (schizophrenia) (Lu et al., 1988) อัลคาโลย์ดชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลายอะเซทิลโคลีนในสมองด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส จึงทำให้ปริมาณอะเซทิลโคลีนในช่องว่างไชแคนป์ของสมองเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การส่งกระแทประสาทในสมองดีขึ้น โดย huperzine A จะจับกับไฮโรซีน ตำแหน่งที่ 337 ในส่วนโคลีนของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งการจับที่จำเพาะเจาะจงเช่นนี้จะพบรูปแบบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น นอกจากนี้ huperzine A ยังสามารถผ่านแนวกั้นระหว่างเลือดกับสมอง (blood-brain barrier) ได้ดีกว่า physostigmine, galanthamine, donepezil และ tacrine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเช่นกัน

Huperzine ประกอบด้วย enantiomer 2 ชนิด คือ (-)-huperzine A และ (+)-huperzine A สามารถพบ (-)-huperzine A ได้ในธรรมชาติและมีฤทธิ์ดีกว่า (+)-huperzine A ต่อมาได้มีการนำ huperzine A มาทดสอบทางคลินิกในระยะที่ 4 กับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ พบว่า สามารถเพิ่มความจำและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ยาหลอก อาการข้างเคียงที่เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของระบบโคลีนergic ของ huperzine A มีน้อยมาก เช่น เวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาการไม่สบายที่กระเพาะและลำไส้ ปวดศีรษะ และหัวใจเต้นช้าลง แต่อย่างไรก็ตาม huperzine A ก็มีพิษต่อตับ (hepatotoxicity) ในประเทศสหรัฐอเมริกาและบางประเทศในยุโรปยังไม่รับรองให้ใช้ huperzine A เป็นยารักษาโรคอัลไซเมอร์ แต่อนุญาตให้ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สำหรับผู้ป่วยที่สูญเสียความจำและสมองเสื่อมเท่านั้น

สารอัลคาโลย์ดอื่นที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์เช่นกัน ได้แก่ (-)-galanthamine ซึ่งเป็นอัลคาโลย์ดที่พบในพืช *Glanthus nivalis* L. และในพืชตระกูล *Amaryllidaceae* อื่นๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสแบบแข่งขัน (competitive acetylcholinesterase inhibitor) ในอดีตใช้สารสกัดหยาบจากพืชชนิดนี้รักษาอาการปวดประสาทที่ใบหน้าและการอัมพาตที่หลงเหลืออยู่ในผู้ป่วยโรคโอลิโอด์ ต่อมาได้นำ (-)-galanthamine มาใช้รักษาโรคจิตเภท โรคสมองเสื่อม และโรคอัลไซเมอร์โดยเตรียมให้อยู่ในรูปของ hydrobromide salt ที่มีชื่อการค้าว่า Reminyl[®] หรือ Nivalin[®] อย่างไรก็ตามเนื่องจาก (-)-galanthamine ที่แยกได้จากพืชนั้นจะประกอบด้วย (+)-galanthamine จึงต้องทำการแยกเฉพาะ (-)-galanthamine ที่มีฤทธิ์ดีกว่าออกมาระบบโดยเทคนิคที่ใช้แยก enantiomer ให้ บริสุทธิ์ในที่นี้ คือ capillary

electrophoresis นอกจากนี้ยังพบว่าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหลายมีฤทธิ์ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ได้ (Liston et al., 2004; Mukherjee et al., 2007; Ziemianin et al., 2012)

2.4 ภาวะเครียดออกซิเดทีฟ (Oxidative stress)

ภาวะเครียดออกซิเดทีฟ คือ ภาวะที่เซลล์ภายในร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือถูกทำลายเนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร เช่น superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical (OH^-), peroxide radical (ROO^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เนื่องจากโครงสร้างของอนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวจึงทำให้สามารถไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นๆ มาให้โมเลกุลอนุมูลอิสระครบทุกและเสถียร หากการที่ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระลดลง ทำให้ออนุมูลอิสระมีมากเกินการควบคุมของสารต้านอนุมูลอิสระ มีผลทำให้เซลล์ภายในร่างกายถูกทำลายหรือได้รับบาดเจ็บแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างหรือน้ำที่ของเซลล์เหล่านั้นกลายเป็นสาเหตุของการเกิดโรคขึ้นได้

2.5 อนุมูลอิสระกับกระบวนการเกิดโรค

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดกระบวนการเผาผลาญในร่างกาย บางส่วนหลุดออกมานำมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันก่อให้เกิดความเสียหาย และมีผลกระทบต่อกระบวนการที่นำไปสู่การแสดงออกทางคลินิก ผลกระทบโดยตรง ได้แก่ การเกิดเปอร์ออกซิเดชันที่เซลล์เมมเบรนและองค์ประกอบอื่นๆ ของเซลล์ รวมถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นที่โปรตีนและดีเอ็นเอ โดยปกติแล้วร่างกายจะมีการป้องป้องโดยของเหลวภายในร่างกายที่มีส่วนประกอบเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีโลหะจับอยู่ ได้แก่ เอนไซม์และโปรตีน

เอนไซม์ชุบเปอร์ออกไซด์สมิวเตส (superoxide dismutase, SOD) เอนไซม์กลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPX) และเอนไซม์คاتาเลส (catalase, CAT) ที่อยู่ภายในเซลล์จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลชุบเปอร์ออกไซด์อันเป็นอนุมูลเริ่มต้นและอนุมูลเปอร์ออกไซด์ ก่อนที่อนุมูลทั้งสองนี้จะทำปฏิกิริยาต่อโดยมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงขึ้นกว่าเดิม อย่างไรก็ตามจะยังมีอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงจากปฏิกิริยาลูกโซ่เปอร์ออกซิเดชันที่เริ่มต้นโดยอนุมูลอิสระที่รอดพ้นจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ชั่งตัน ซึ่งอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงที่รอดพ้นจากการกำจัดของเอนไซม์ชั่งแรกจะถูกกำจัดต่อโดยสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่หยุดลง สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ได้แก่ วิตามินซีที่ละลายน้ำ วิตามินอีที่ละลายน้ำในไขมัน และยูบิคิโนน เป็นต้น

ภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิเดชันเนื่องจากความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระกับการทำจัดอนุมูลอิสระ มีบทบาทในการเกิดโรคต่างๆ เช่น ภาวะผังเส้นเลือดแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลง เนื่องจากการสะสมไขมันที่ผนังหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดตีบ เกิดภาวะขาดเลือดซึ่งขณะที่สมองและหัวใจ โรคที่เกี่ยวกับการเสื่อมของระบบประสาท โรคภูมิแพ้และโรคมะเร็ง นอกจากนี้การมีปริมาณอนุมูล

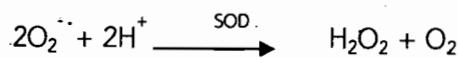
อิสระที่ไม่สมดุลนี้ยังสัมพันธ์กับลักษณะโรคหรืออาการผิดปกติอื่นๆ ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน อาการสมองและไขสันหลังอักเสบเนื่องมาจากโรคภูมิแพ้ โรคเนื้องอกเรื้อรัง โรคดาวน์ (Down's syndrome) โรคตับอักเสบ โรคข้ออักเสบ การติดเชื้อเอชไอวี โรคแทรกซ้อนอันเนื่องมาจากเป็นโรคเบาหวาน โรคต้อกระจก แผลเปื่อย โรคที่เกี่ยวกับปอดทรายโรค เช่น โรคปอดที่เกิดจากการสูดยาหินในโตรเจนไดออกไซด์ โอโซน ยากำจัดวัชพืช สารบอนเตตระคลอ

2.6 การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษ ประกอบด้วยอนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกจากกระบวนการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ อนุมูลอิสระที่มีเป็นปริมาณน้อยจะไม่ก่อให้โทษต่อร่างกาย เซลล์และร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหายหากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินสมดุล ดังนั้นร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลักอยู่สามกลไกเพื่อลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลอิสระต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ สามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลอิสระและปฏิกริยาออกซิเดชันที่มีมากเกินสมดุล จะก่อให้เกิดโรคต่างๆขึ้นในร่างกายได้กลไกที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ได้แก่

2.6.1 เอนไซม์

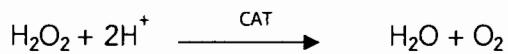
ในระดับเซลล์เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่



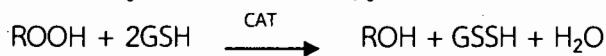
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์คاتาเลส และเอนไซม์กลูต้าไทด์เอนเปอร์ออกไซเดส นอกจากนี้เอนไซม์ SOD ยังทำหน้าที่ปักป้องเอนไซม์ในกลุ่มดีไซเดรส ได้แก่ เอนไซม์ดีไซเดรส แอดซิดดีไซเดรส เอนไซม์อะโคลอีเตส เอนไซม์ฟอสฟอกลูโคเนตดีไซเดรส เอนไซม์พูมาเรส-เอ และเอนไซม์พูมาเรส-บี ไม่ให้น้ำมันเหล่านี้ถูกอนุมูลชุบเปอร์ออกไซด์แอนอ่อนทำลาย

เอนไซม์คاتาเรส (CAT) เอนไซม์คاتาเลสเป็นเอนไซม์ซึ่งมีรูปแบบ ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์คاتาเลสจะประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีนชั้น 4 หน่วยย่อยที่

เอนไซม์กันแต่ละหน่วยมีขนาด 60 กิโลดัลตัน การจัดเรียงตัวของหน่วยทั้งสี่เป็นแบบเทตราէียดรัล ดังนั้น เออนไซม์นี้จึงมีสิ่งจำพวก 4 กลุ่มต่อ 1 โมเลกุลเอนไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 240 กิโลดัลตัน เออนไซม์คatalase ทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน



เอนไซม์กูลตาไทด์เอนเปอร์ออกซิเดส (GPX) เออนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะมีธาตุซีลินเนียมเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ เออนไซม์ GPX ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเรติกชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ไซด์ โดยมีกูลตาไทด์ (GSH) ร่วมในปฏิกิริยาด้วย เออนไซม์นี้ปกป้องเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้ถูกทำลายหรือเสียหายจากการที่ร่างกายถูกออกซิเดช์หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป



ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าเมื่อเออนไซม์ในกลุ่ม GPX อยู่ไม่ต่ำกว่า 5 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ GPX1 หรือ cGPX, GPX2 หรือ GPX-G1, GPX3 หรือ GPX-P, GPX4 หรือ PHGPX และ GPX5 แม้ว่า GPX หั้ง 5 ไอโซฟอร์มนี้จะอยู่ทั่วทุกแห่งในร่างกาย แต่ระดับปริมาณของแต่ละไอโซฟอร์มจะไม่เท่ากันในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด เออนไซม์ GPX ในไขโตซอลและในไมโตครอนเตรียมมักเป็น cGPX หรือ GPX1 ทำหน้าที่ลดไฮโดรเปอร์ออกไซด์โดยใช้กูลตาไทด์เอนร่วมในปฏิกิริยา ส่วน GPX4 หรือ PHGPX ที่อยู่ในไขโตซอลและในเมมเบรน จะทำหน้าที่ลดฟอสฟอลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ และโคเลสโตรอลเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้เกิดในปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ไอโซฟอร์ม GPX1 และ GPX4 จะพบในเนื้อเยื่อเป็นส่วนใหญ่ GPX1 ส่วนใหญ่จะอยู่ในเม็ดเลือดแดง ไต และตับ ในขณะที่ GPX4 จะมีมากในเซลล์เยื่อบุไตและอัณฑะ GPX2 ในไขโตซอล และ GPX3 ที่อยู่ภายนอกเซลล์แทบจะตรวจไม่พบในเนื้อเยื่อต่างๆ ยกเว้นในทางเดินอาหารและในไต ส่วน GPX5 จะพบเฉพาะที่ท่อน้ำเชือกและเป็นไอโซฟอร์มที่ทำงานไม่ขึ้นกับซีลินเนียม

2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้โดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารต้านอนุมูลที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริก บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูลอิสระ ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูต้าไทด์ เบตาแแคโรทีน และยูบิคิโนน จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระประเภทหลังมีบทบาทสำคัญในการทำให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวมานี้โครงสร้างเคมีและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน เช่น วิตามินอีมีโครงสร้างเคมีที่ละลายไขมันได้ดีดังนั้นจึงสามารถเข้าไปออกฤทธิ์ที่เนมเบรนได้ วิตามินอีจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ วิตามินอีจะทำปฏิกิริยาขัดอนุมูลลิพิดเปอร์ออกซิเดชันและได้เป็นอนุมูลวิตามินอี (E-O⁻) อนุมูล E-O⁻ เป็นอนุมูลที่มีความไวต่อการทำให้

ไม่สามารถเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันต่อไปได้ วิตามินซีจะถูกน้ำที่เปลี่ยนอนุมูล E-O⁻ ทำให้ได้ วิตามินอีกกลับคืนโดยการรับอิเล็กตรอนจากอนุมูล E-O⁻ อนุมูลวิตามินจะถูกขับออกทางปัสสาวะ

สารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืชผัก ผลไม้ และสมุนไพร ประกอบด้วยสารจำพวกโพลีฟีโนอลเป็นองค์ประกอบสำคัญ เช่น caffeic acid ในกาแฟ resveratrol ในไวน์แดง curcumin ในขมิ้น capsaicin ในพริกขี้หนู กลุ่มสาร flavonoids ที่พบในพืชต่างๆ มากกว่า 5,000 ชนิด สารฟลาโวนอยด์ที่มีการศึกษา กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ quercetin และ catechin เป็นต้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ โดยใช้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี ดังแสดงในตารางที่ 1 (Pietta, 2000)

2.6.3 สารคีเลทโลหะ (Metal chelators)

นอกจากเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวดังข้างต้นแล้ว สารที่ทำหน้าที่คีเลทโลหะ เป็นอีกกลไกหนึ่งในการทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ทั้งนี้ เพราะโลหะทранซิชัน เช่น ธาตุเหล็ก และทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ สารทำหน้าที่คีเลทโลหะในร่างกายส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่จับและแยกโลหะที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการเกิด OH เข้ามาร่วมไว้ในโครงสร้างให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้ โปรตีนที่จับกับโลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะในร่างกายมีดังนี้ ได้แก่ ทرانเฟอร์ริน (transferrin) เพอร์อีริติน (ferritin) แลกโตเฟอร์ริน (lactoferrin) เชรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) ไฮโมเพล็กซิน (hemopexin) แฮปโตโกลบิน (haptoglobin) และ อัลบูมิน (albumin) ในร่างกายเหล็กจะถูกเก็บสะสมอยู่ในรูปของ เพอร์อีริติน เพอร์อีริตินเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 460 กิโลดالتัน มีอ่อนเหล็ก (Fe^{3+}) จำนวน 2 อ่อนอนจับอยู่ ธาตุเหล็กยังสามารถรวมกับโปรตีนอื่นๆด้วยแรงจับที่แน่นกว่า ได้แก่ ไฮโมโกลบิน (hemoglobin) ไมโอกลบิน (myoglobin) และเพอร์เรดอกซิน (ferredoxin) ธาตุทองแดงจะเคลื่อนย้าย ทั่วร่างกายในรูปของเชรูโลพลาสมิน นอกจากนี้ยังมีสารคีเลทโลหะที่ใช้สำหรับในการบำบัดและรักษาโรค โดยควบคุมระดับปริมาณของธาตุเหล็กในผู้ป่วย ได้แก่ desferrioxamine เป็นต้น (โอภา, 2549)

ตารางที่ 1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ flavonoid กลุ่มต่างๆ โดยใช้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับอนุพันธ์วิตามินอี

ชนิด	สาร	-OH	TEAC (mM)
Flavonols	Quercetin	3,5,7,3',4'	4.7
	Rutin		2.42
	Kaempferol	3,5,7,4'	1.34
	Myricetin	3,5,7,3',4',5'	3.10
	Galangin	3,5,7	1.49
Flavones	Luteolin	5,7,3',4'	2.09
	Luteolin 4'-glucoside		1.74
	Apigenin	5,7,4'	1.45
	Chrysin	5,7	1.43
Flavanones	Eriodictyol	5,7,3',4'	1.8
	Hesperetin	5,7,3',4'-OCH ₃	1.4
	Naringenin	5,7,4'	1.5
	Naringenin 7-rutinoside		0.8
Flavans	Catechin	3,5,7,3',4'	2.4
	Epicatechin	3,5,7,3',4'	2.5
	Epigallocatechin	3,5,7,3',4',5'	3.8
	Epicatechin gallate		4.93
	Epigallocatechin gallate		4.75
Anthocyanidins	Cyanidin	3,5,7,3',4'	4.4
Anthocyanins	Cyanidin 3-rutinoside		3.2
	Pelargonidin	3,5,7,4'	1.3
Isoflavonoids	Genistein	5,7,4'	2.9
	Biochanin A	5,7,4'-OCH ₃	1.16
	Daidzein	7,4'	1.25
	Formononetin	7,4'-OCH ₃	0.11
	Genistein 7-glucoside		1.24

2.7 ลักษณะทางพฤกษาศาสตร์ของข้าพลู

ชื่อพฤกษาศาสตร์ *Piper sarmentosum* Roxb.

ชื่อพ้อง

ชื่ออื่นๆ ข้าพลู (ภาคกลาง) ชะพลูเตา เมอวูลู (สุรินทร์) นมวา (มาเลย์) ผักปูนา
ผักปูลิง ผักปูริง บูลิงนก ผักพลูนก ผักอีเลิศ พลูลิง (ภาคเหนือ)

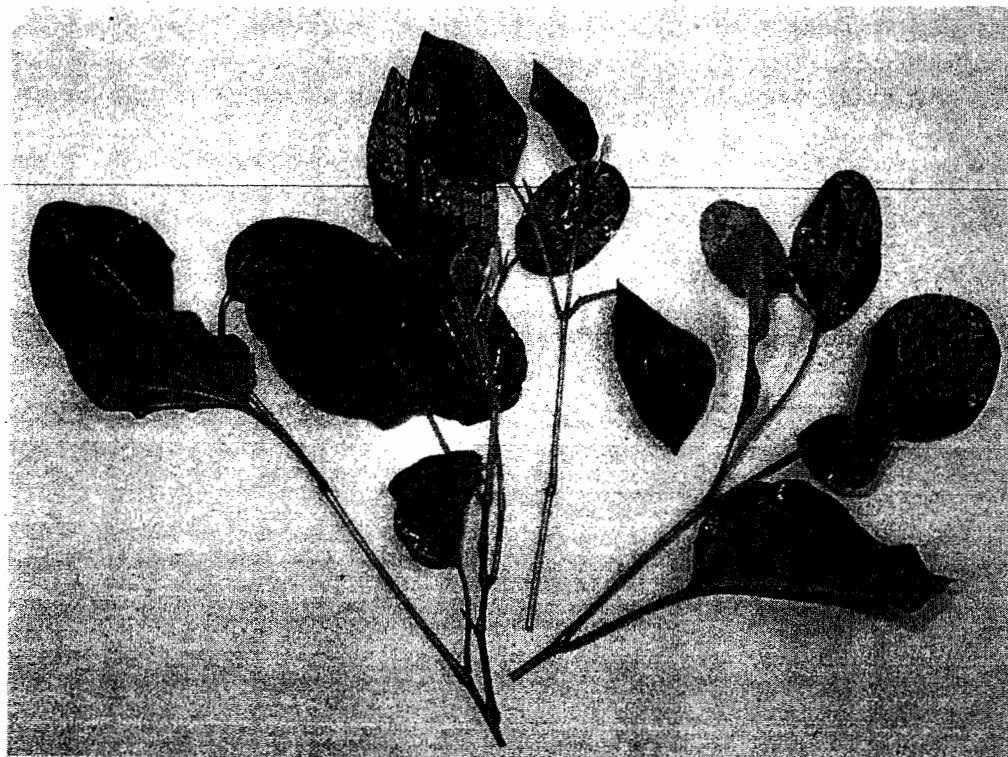
วงศ์ Piperaceae

ลักษณะทางพฤกษาศาสตร์

เป็นไม้เลื้อยทอต่ำพื้นดินเป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็กต้นเดี่ยว ลำต้นเป็นข้อ มีรากตามข้อ ใบรูปหัวใจลักษณะคล้ายใบพลู สีเขียวเข้ม เที้ยเส้นใบชัดเจน ผิวใบไม่เรียบ ใบมีกลิ่นฉุนเล็กน้อย ต้นและใบมีรสเผ็ดเล็กน้อย ดอกออกตามยอดเป็นช่ออัดแน่น มีดอกย่อยขนาดเล็ก กลีบดอกสีขาว ดอกย่อยแยกเพศ ผลเป็นแบบผลสด

ประโยชน์

ตำรายไทยใช้ทั้งต้นขับลม ผล ขับลมหงในเป็นยาขับลม (นันทวันและอรุณ, 2542)



รูปที่ 1 ข้าพลู (*Piper sarmentosum* Roxb.)

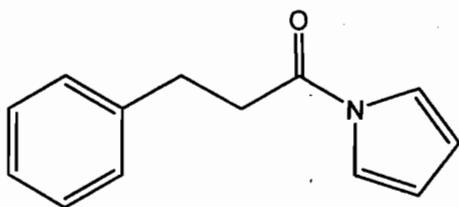
2.8 องค์ประกอบเคมีของข้าพลู

ในส่วนของผลแห้ง พบสารต่างๆ ได้แก่ N-(3-phenylpropanoyl)pyrrole (1), 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-trans-1-tetradecene (2), β -sitosterol (3), pellitorine (4), sarmentine (5), sarmentosine (6) (Likhitwitayawuid and Ruangrungsi, 1987), α -asarone (7), asaronaldehyde (8) (Likhitwitayawuid et al., 1988) นอกจากนั้นยังพบ guineensine (9), brachystamide B (10), 1-piperetyl pyrrolidine (11), 3',4',5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine (12), sesamin (13) (Rukachisirikul et al., 2004) ส่วนเห็นอื่นพบ pellitorine (4), N-2'-methylbutyl-2E,4E-decadienamide (14), N-isobutyl-2E,4E-octadienamide (15), N-isobutyl-2E,4E-dodecadienamide (16), N-isobutyl-2E,4E-tetradecadienamide (17), N-isobutyl-2E,4E-hexadecadienamide (18), N-isobutyl-2E,4E-octadecadienamide (19) (Stohr et al., 1999) ในรากพบ 1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-1E-tetradecene (20), asaricin (21), N-(3-phenylpropanoyl)pyrrole (1), sarmentamide A (22), sarmentamide B (23), N-(2,4,5-trimethoxycinnamoyl)pyrrolidine (24), pellitorine (4), sarmentosine (6), sesamin (13), horsfieldin (25), guineensine (8), brachystamide B (9), N-[9-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienoyl]pyrrolidine (26), brachyamide (27), sarmentine (5) (Tuntiwachwuttikul et al., 2006) จากการแยกสารบริสุทธิ์ที่ได้จากใบประกอบด้วยสาร 3-(4'-methoxyphenyl)propanoyl pyrrole (28) (Luker et al., 2002), piperlotine A (29), piperlotine B (30), piperlotine C (31), piperlotine D (32), piperlotine E (33), piperlotine F (34), piperlotine G (35), piperlotine H (36), piperlotine I (37), piperlotine J (38), piperlotine K (39), piperlotine L (40) (Li et al., 2007), N-(3',4',5'-trimethoxy-cis-cinnamoyl)pyrrolidine (sarmentomicine) (41) และ phenylpropanoids ชนิด asaricin (42) และ γ -asarone (43) (Sim et al., 2009) และ 1-nitosoimino-2,4,5-trimethoxybenzene (44) (Ee et al., 2009) ใน Borkesh et al., 2011 สามารถแยกสารใหม่ได้ 1 ชนิด คือ lankamide (45) ร่วมกับสารอื่นๆ ได้แก่ piplartine (46) และ 3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid (47)

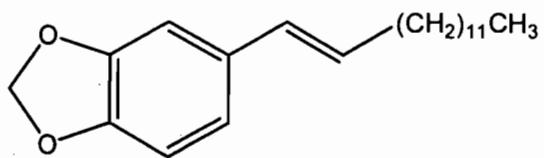
2.9 ฤทธิ์ทางชีวภาพของข้าพลู

พบว่าสารสกัดน้ำทั้งต้นของข้าพลูมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (Peungvicha et al., 1998) สารสกัดชั้นเมรานอลของใบมีฤทธิ์ neuromuscular blocking (Ridtitid et al., 1998), ฤทธิต้านออกซิเดชัน (Subramanium et al., 2003; Chanwitheesuk et al., 2005) สารจากผลได้แก่ guineensine, brachystamide B, 1-piperetyl pyrrolidine, 3',4',5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine, sarmentosine, (+)-asarinin, sesamin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *plasmodium* ส่วนสาร pellitorine, guineensine, brachystamide B, sarmentosine และ 1-(3,4-

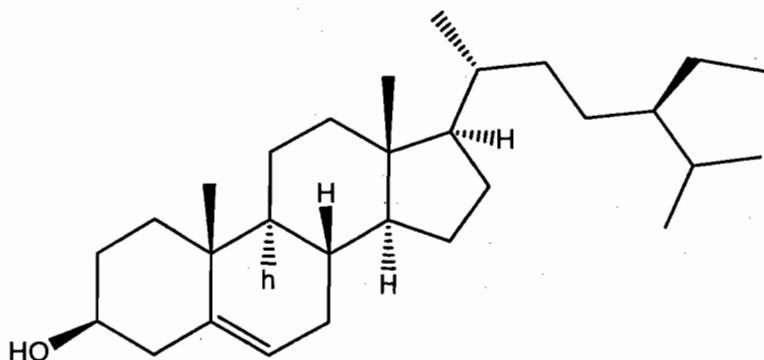
methyleneoxyphenyl)-1E-tetradecene มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (Rukachaisirikul et al., 2004) สารจากราก ได้แก่ aromatic alkene, 1-allyl-2-methoxy-4,5-methylenedioxybenzene และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค N-(3-phenylpropanoyl)pyrrole, brachystamide B และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรากนิด *Candida albican* (Tuntiwachwuttikul et al., 2006) สารสกัดชั้นเอทานอลของข้าวหลามมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด hepatoma (Ariffin et al., 2009) เมื่อทำการทดสอบสารสกัดชั้นน้ำจากใบกับกระต่าย ทดลองพบว่าสารสีอ่อนๆ สามารถอักเสบจำพวก vascular cell adhesion protein (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) และ c-reactive protein ลดลง (Amran, 2011) นอกจากนั้นพบว่าสารสกัดใบด้วยน้ำยังสามารถลดภาวะกระดูกพรุนในหนูได้ (Estai et al., 2011) สาร lanlamicide, piplartine และ 3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid (47) มีฤทธิ์ยับยั้ง hypoxia inducible factor-2 ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Borkesh et al., 2011)



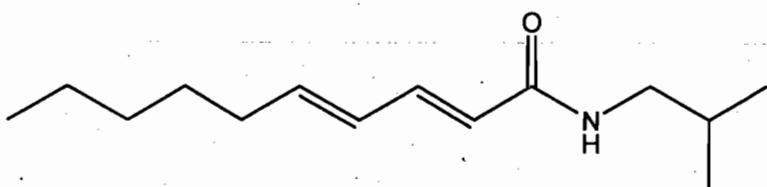
(1)



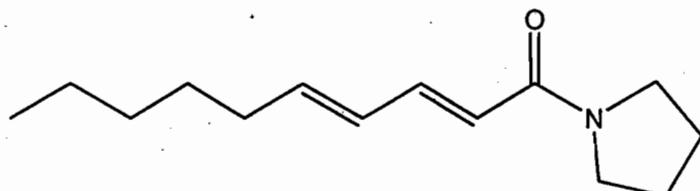
(2)



(3)

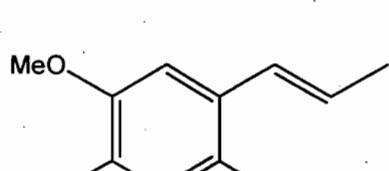
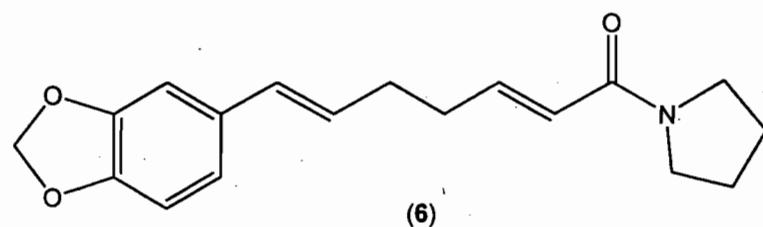


(4)

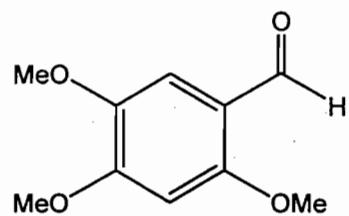


(5)

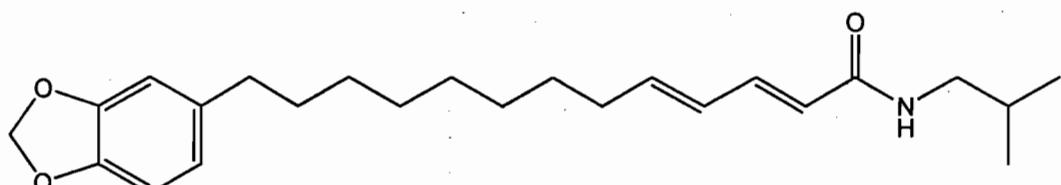
รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของข้าวพลู



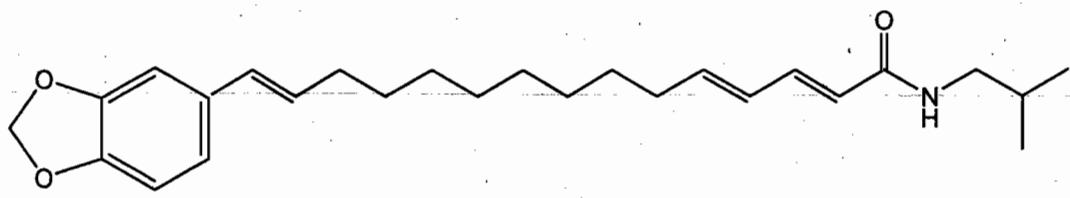
(7)



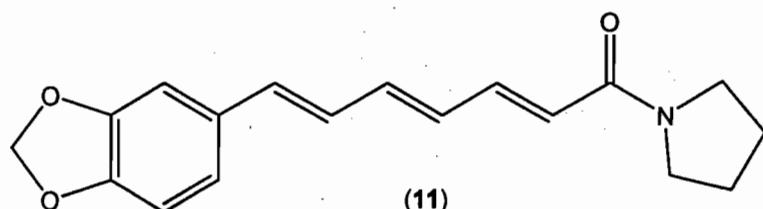
(8)



(9)

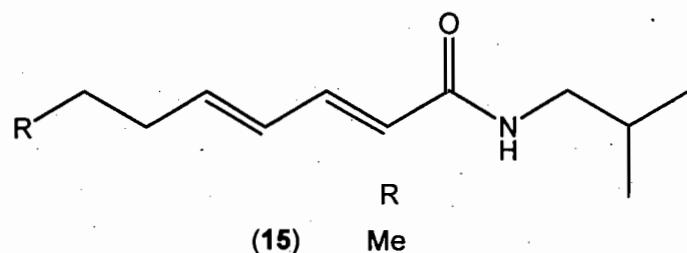
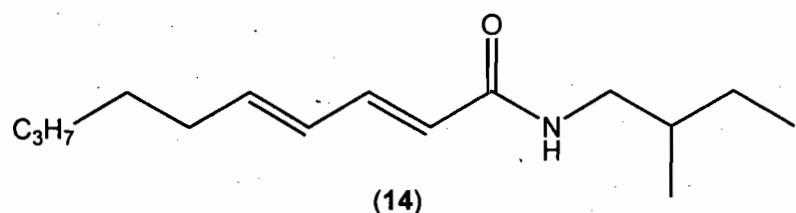
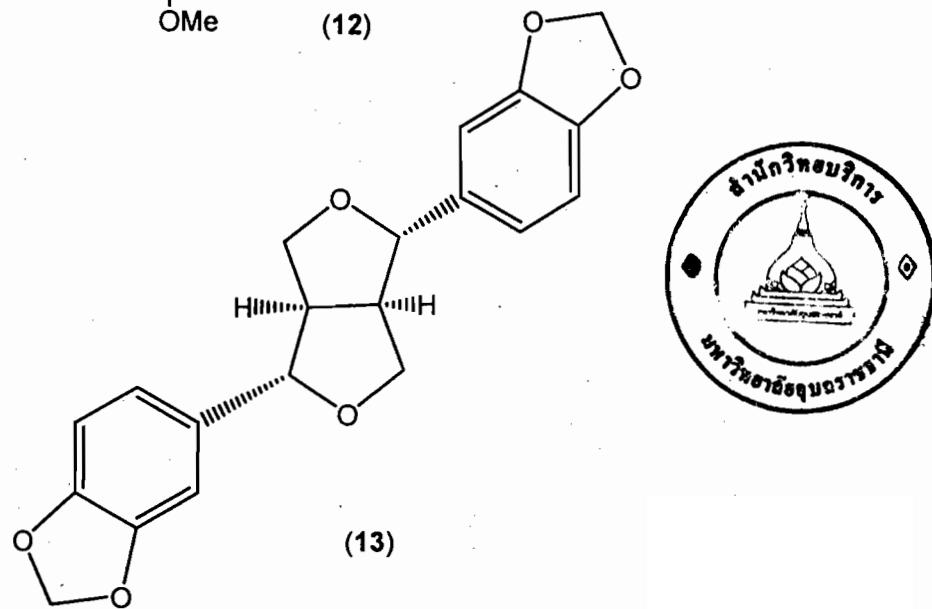
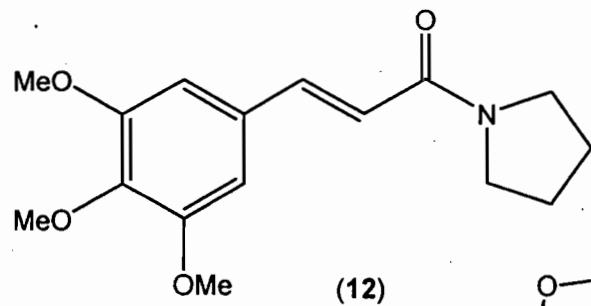


(10)



(11)

รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของชาพลุ (ต่อ)



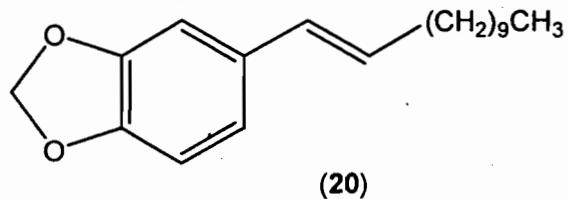
(16) C₅H₁₁

(17) C₇H₁₅

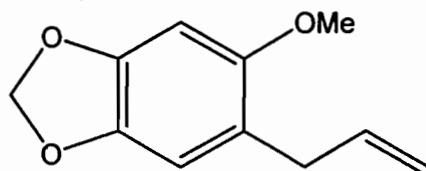
(18) C₉H₁₉

(19) C₁₁H₂₃

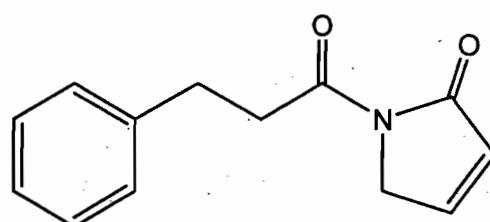
รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของช้าพลุ (ต่อ)



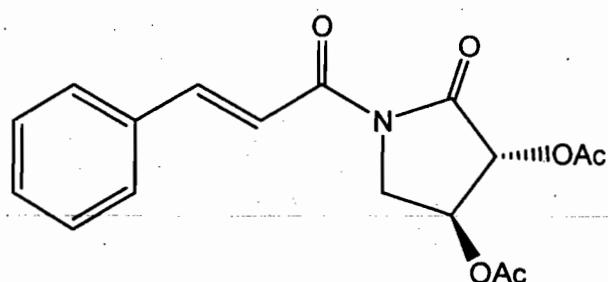
(20)



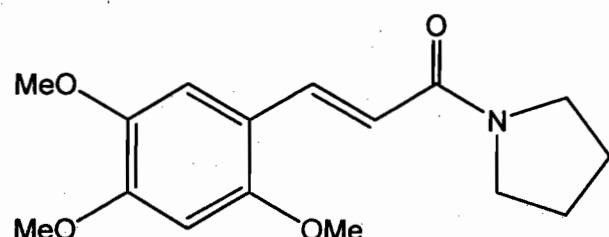
(21)



(22)

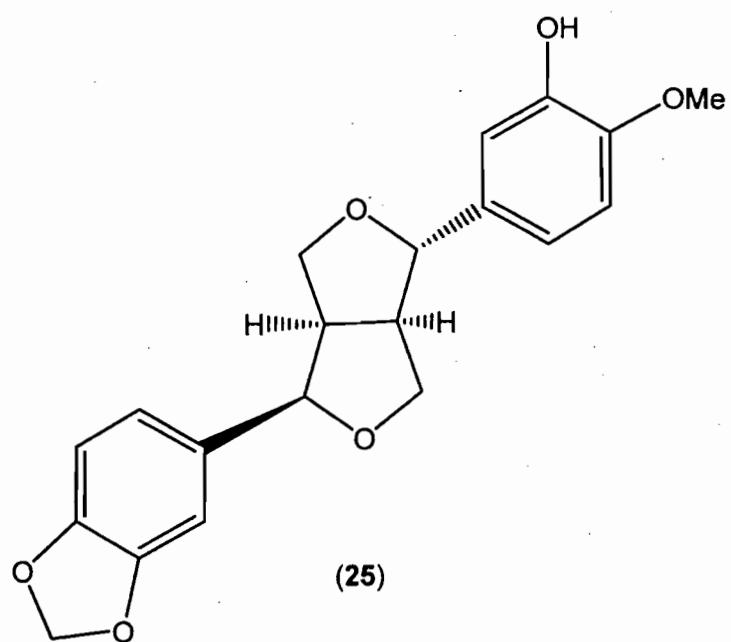


(23)

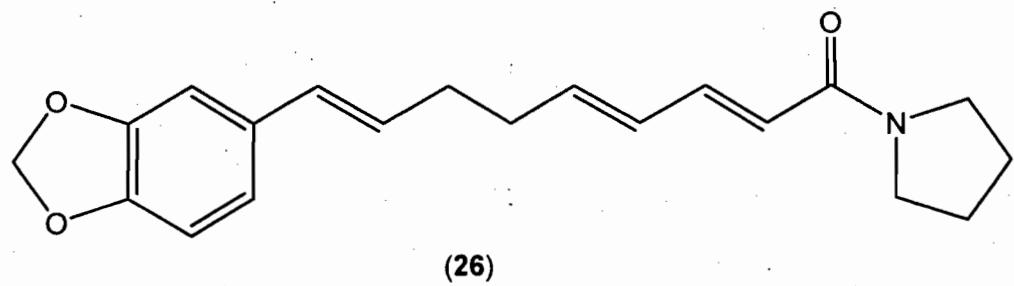


(24)

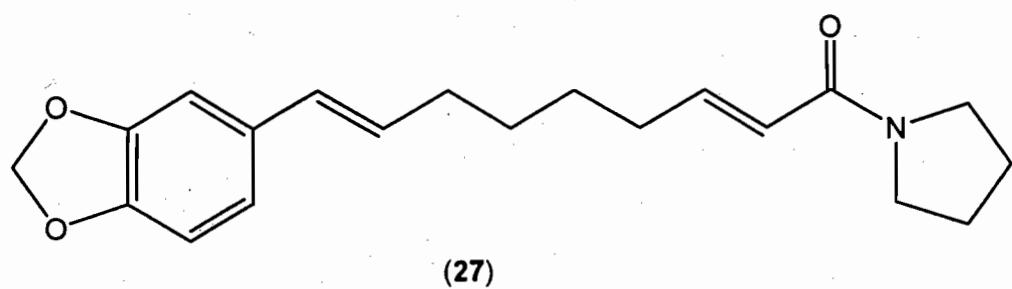
รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของชาพลุ (ต่อ)



(25)

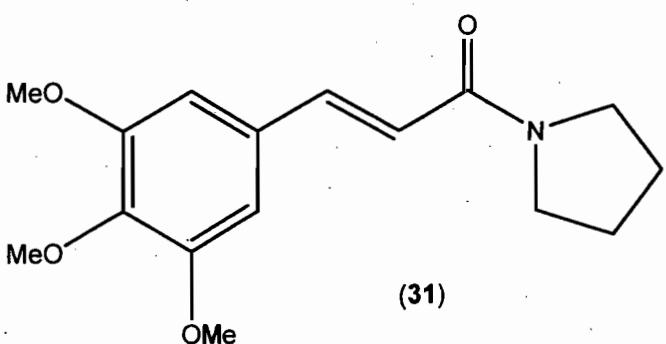
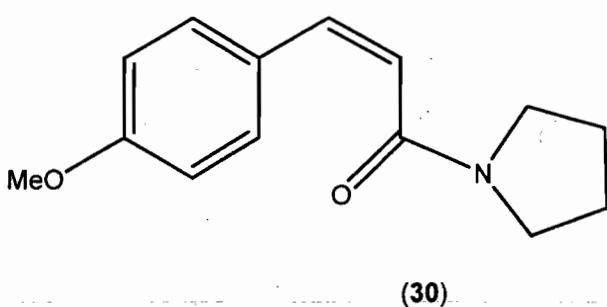
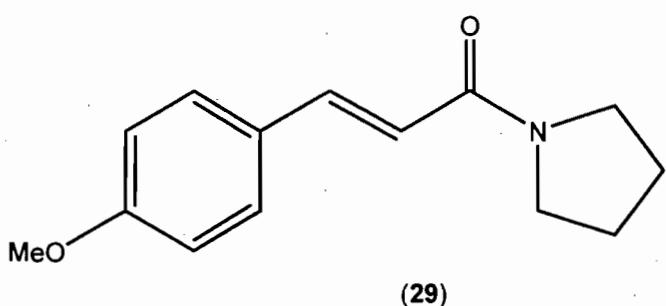
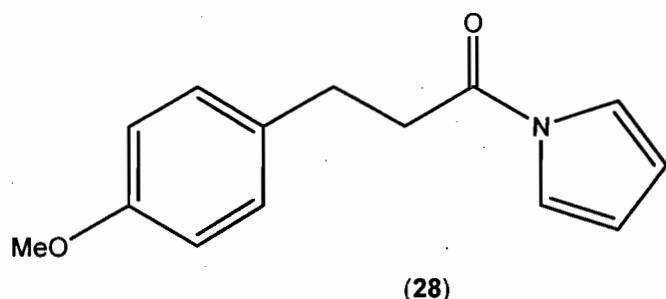


(26)

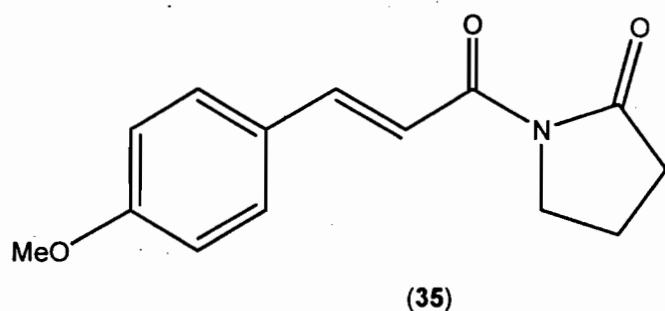
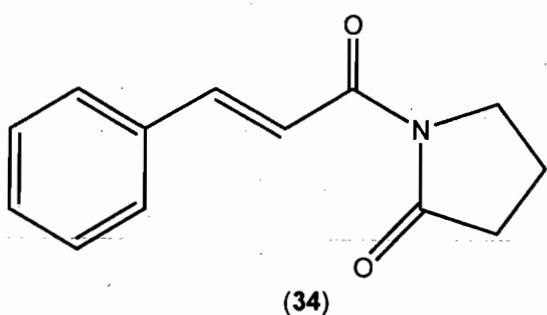
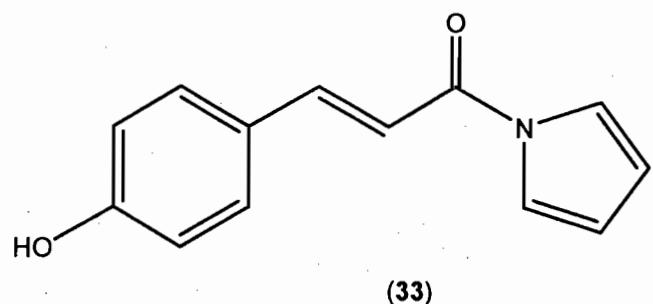
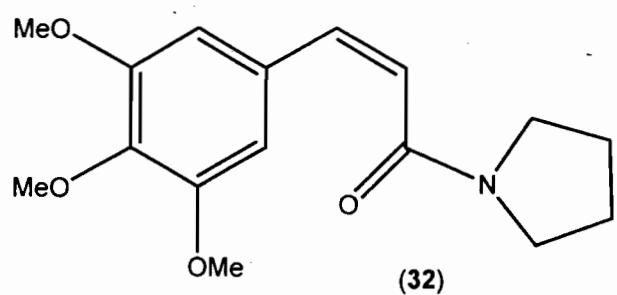


(27)

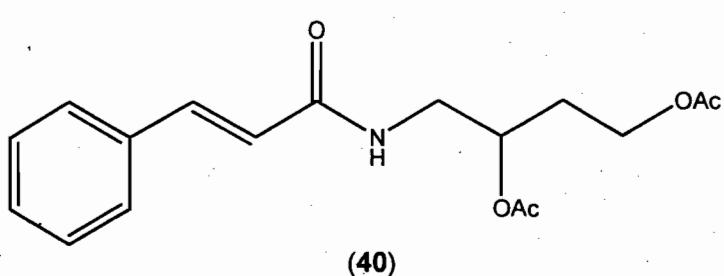
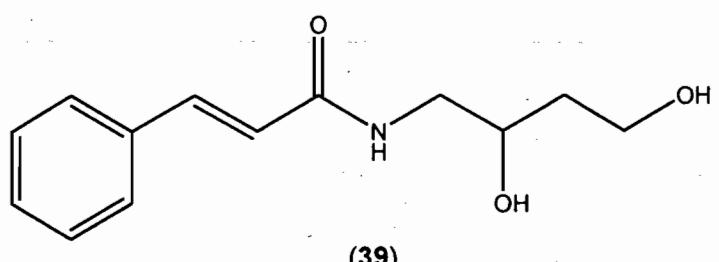
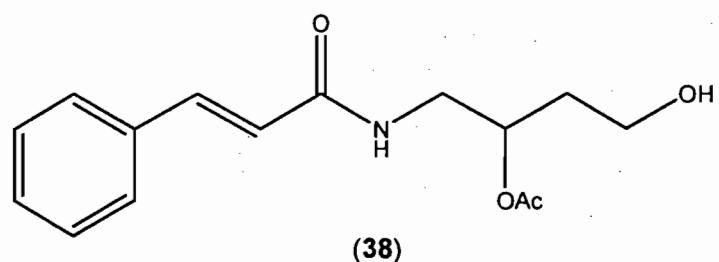
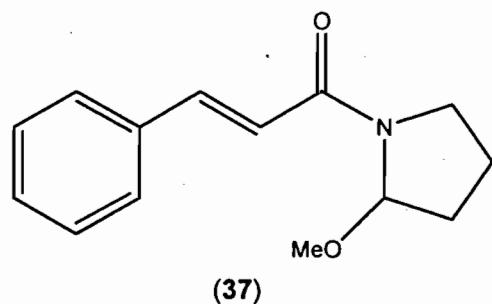
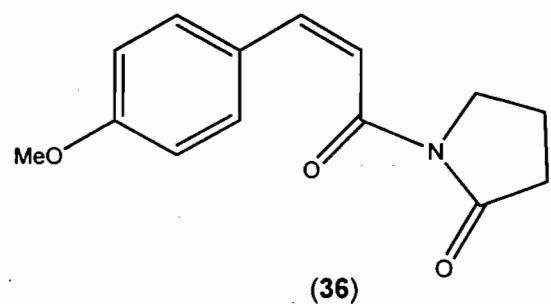
รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของข้าพลู (ต่อ)



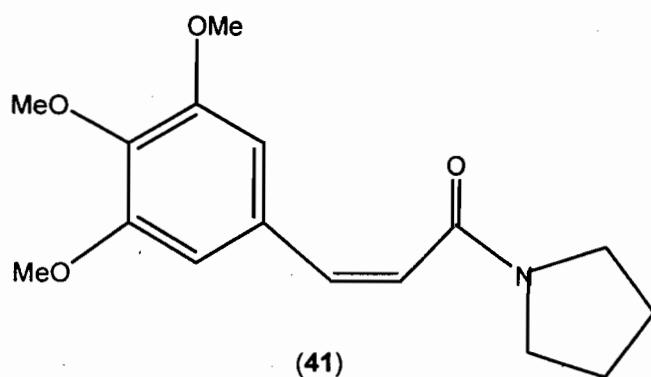
รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของชาพลุ (ต่อ)



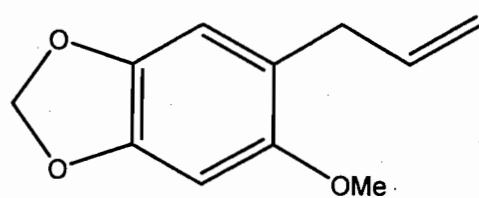
รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของชาพลุ (ต่อ)



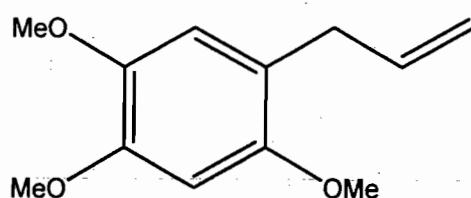
รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของชาพลู (ต่อ)



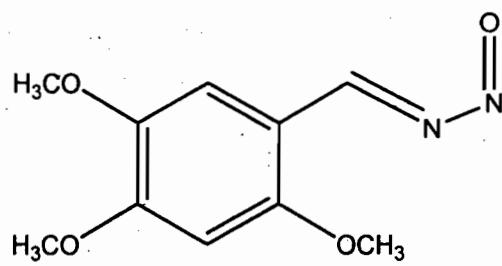
(41)



(42)

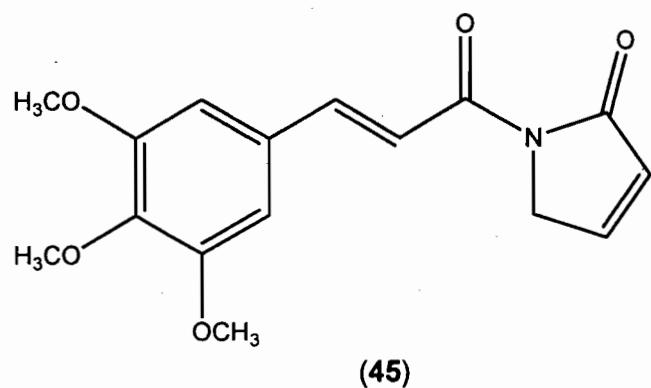


(43)

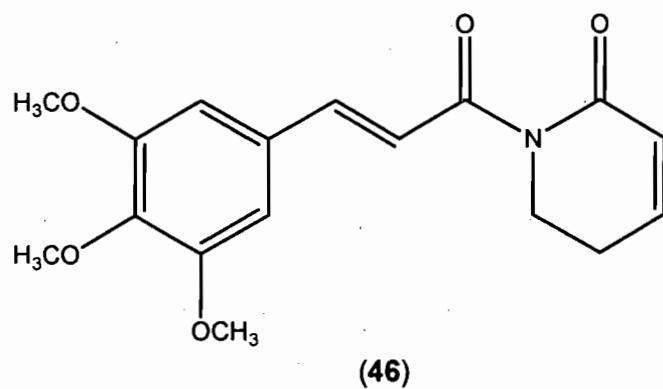


(44)

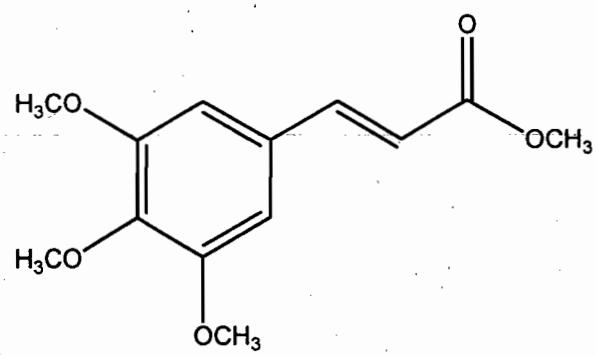
รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของชาพลู (ต่อ)



(45)



(46)



(47)

รูปที่ 2 องค์ประกอบเคมีของชาพลู (ต่อ)

บทที่ 3 วิธีการศึกษา (Methods)

3.1 การเก็บตัวอย่างพิชสมุนไพร

เก็บพิชตัวอย่างใน อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี นำมาตรวจสอบซึ่งอวิทยาศาสตร์โดยเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห้งในหอพรรณไม้ กรมสัตว์ป่าและพรรณพิช

3.2 เทคนิคทั่วไป

3.2.1 Analytical Thin-Layer Chromatography (TLC)

3.2.1.1 Normal phase Thin-Layer Chromatography

Technique	: One dimension, ascending
Adsorbent	: Silica gel 60 F ₂₅₄ (E. Merck) precoated plate (Aluminium sheet)
Layer thickness	: 0.2 mm
Distance	: 5 cm
Temperature	: room temperature (25-35°C)
Detection	: 1. Ultraviolet light at 254 and 365 nm

3.2.1.2 Normal phase Thin-Layer Chromatography

Technique	: One dimension, ascending
Adsorbent	: Silica gel 60 F ₂₅₄ (E. Merck) precoated plate (Glass plate)
Layer thickness	: 0.25 mm
Distance	: 5 cm
Temperature	: room temperature (25-35°C)
Detection	: 1. Ultraviolet light at 254 and 365 nm 2. Dragendorff's reagent

3.2.1.3 Reverse phase Thin-Layer Chromatography

Technique	: One dimension, ascending
Adsorbent	: RP ₁₈ F _{254S} (E. Merck) precoated plate (Glass plate)
Layer thickness	: 0.25 mm
Distance	: 5 cm
Temperature	: room temperature (25-35°C)
Detection	: Ultraviolet light at 254 and 365 nm

3.2.2 Column Chromatography

3.2.2.1 Column Chromatography

Adsorbent:	: Silica gel 60 (70-230 mesh); particle size 0.063-0.200 mm (E. Merck)
Sample loading	: ละลายตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำไป column
Detection	: นำส่วนสกัดที่แยกได้ (Fractions) ตรวจสอบด้วย TLC สังเกตผลด้วย การส่องUV light จากนั้นพ่นด้วย Dragendorff's reagent

3.2.2.2 Gel Filtration Chromatography

Gel filter	: Sephadex LH 20 (Pharmacia)
Packing method	: แข็ง Sephadex LH 20 ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมทึ่งไว้ 24 ชั่วโมง เทลงใน column
Sample loading	: ละลายตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำไป column
Detection	: นำส่วนสกัดที่แยกได้ (Fractions) ตรวจสอบด้วย TLC สังเกตผลด้วย การส่องUV light

3.2.3 Spectroscopy

3.2.3.1 Mass Spectra

High resolution electrospray ionization mass spectra (HRESI-MS) วัดด้วยเครื่องมือ Polaris Q mass spectrometer (มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) และ micrO-TOF-QII mass spectrometer (มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี)

3.2.3.2 Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance (^1H and ^{13}C -NMR Spectra

^1H NMR (500 MHz) และ ^{13}C NMR (125 MHz) spectra วัดด้วยเครื่องมือ INOVA-500 NMR spectrometer 500 spectrometer (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

Eserine hemisulfate, acetylcholinesterase (type V-S lyophilized), acetylthiocholine iodide (ACTI), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich (USA)), quercetin dihydrate, sodium nitroprusside, sulfanilamide, phosphoric acid and N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (Fluka (Germany))

3.3 วิธีเตรียมสารสกัดจากพืช

3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากข้าวพู่

เก็บส่วนใบมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งและอบที่อุณหภูมิประมาณ 40°C จนแห้ง นำส่วนของพืชที่อบแล้วไปบดย่อยขนาดให้ได้ขนาดพอเหมาะสม ได้น้ำหนักใบแห้ง 0.51 kg

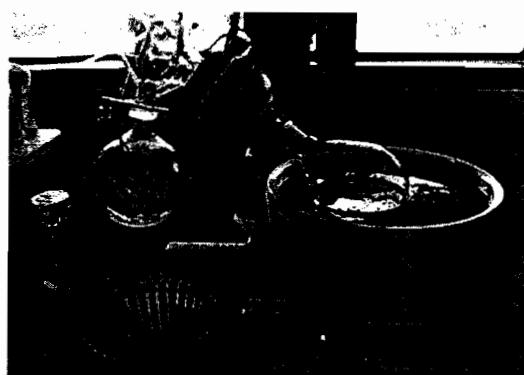


รูปที่ 3 ลักษณะของใบข้าวพู่

3.3.2 การสกัดพืชสมุนไพร

นำผงใบแห้ง 0.51 kg มาทำการสกัดโดยแซ่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ใน percolator โดยให้มีตัวทำละลายในปริมาณที่ท่วมสมุนไพร เป็นเวลา 2 วัน แล้วใช้สารสกัดออกและกรอง นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ไประเหยเอารีดตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง rotary

evaporator เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารสกัดทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน เปลี่ยนตัวทำละลายจาก hexane เป็น ethyl acetate ทำการสกัดและระเหยแห้งเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane จากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลายจาก ethyl acetate เป็น methanol ทำการสกัดและระเหยแห้งเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane และ ethyl acetate เก็บสารสกัดที่ได้ในที่แห้งและพันแสงแดดเพื่อเตรียมนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 4 การระเหยสารสกัดให้แห้ง

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ชั้งสารที่ต้องการทดสอบและสารมาตรฐาน quercetin 1 mg/ml ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เติมสารที่ต้องการทดสอบ 20 μl ลงใน 96-well plate จากนั้นใส่สารละลาย DPPH 180 μl เก็บในที่มีดีเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 530 nm โดยใช้ เครื่องมือ microplate reader คำนวณ % การต้านอนุมูลอิสระ (Rangkadilok et al., 2007)

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Nitric oxide

ชั้งสารที่ต้องการทดสอบและสารมาตรฐาน quercetin 1 mg/ml ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เติมสารที่ต้องการทดสอบ 20 μl ลงใน 96-well plate ไปเปตสารละลาย sodium nitroprusside 20 μl บ่มไว้ที่ 25°C เป็นเวลา 180 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Griess reagent 20 μl นำไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 nm โดยใช้ microplate reader คำนวณ % การต้านอนุมูลอิสระ (Rao, 1997; Kumaram et al., 2006)

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั่งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส

ขั้นสารสกัดทวยบหรือส่วนสกัดนำมาละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เติม acetylthiocholine iodide 25 μl ลงใน 96-well plate ไปเปตสารที่ต้องการทดสอบ 25 μl เติม buffer 140 μl เติมสารละลาย acetylcholinesterase 25 μl บ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที วัดอัตราการดูดกลืนแสง ที่ 405 nm โดยใช้ microplate reader คำนวณ % การยับยั่งเอนไซม์ไทรซีเนส (Ingkaninan et al., 2003)

3.5 การแยกสารบริสุทธิ์

3.5.1 การแยกส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดชั้น methanol

นำสารสกัดชั้น methanol 50 g มาแยกให้เป็นส่วนสกัดย่อย (fraction) ด้วย column chromatography โดยใช้ normal silica gel เป็น stationary phase เริ่มต้นการชะสารด้วยตัวทำละลาย dichloromethane จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของตัวทำละลาย ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2 อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้แยกสารสกัดชั้น methanol

ชนิดตัวทำละลาย	อัตราส่วน %
Dichloromethane	100
Dichloromethane:Methanol	95:5
Dichloromethane:Methanol	90:10
Dichloromethane:Methanol	85:15
Dichloromethane:Methanol	80:20
Dichloromethane:Methanol	75:25
Dichloromethane:Methanol	70:30
Dichloromethane:Methanol	65:25
Dichloromethane:Methanol	60:40
Dichloromethane:Methanol	50:50
Dichloromethane:Methanol	40:60
Dichloromethane:Methanol	20:80
Dichloromethane:Methanol	10:90
Methanol	100

นำสารที่จะออกมาระหว่างให้แห้งทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จากนั้นรวมสารที่มีรูปแบบการเคลื่อนที่ที่เหมือนกันเป็นส่วนสกัดย่อยเดียวกันด้วยการใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ mobile phase หลายระบบ ได้แก่ hexane:dichloromethane 30:70, dichloromethane:Methanol 90:10, 70:30 สังเกตรูปแบบการเคลื่อนที่ด้วยการส่อง UV 254 และ 365 nm

3.5.2 การแยกสารจากส่วนสกัด PS-1

นำส่วนสกัดย่อย P1 (3.25 g) มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วย มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยใช้ normal phase silica gel เป็น stationary phase โดยใช้ mobile phase เริ่มต้นเป็น dichloromethane จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของตัวทำละลาย ดังนี้

ตารางที่ 3 อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้แยกสารจากส่วนสกัด PS-1

ชนิดตัวทำละลาย	อัตราส่วน %
Dichloromethane	100
Dichloromethane:Methanol	90:10
Dichloromethane:Methanol	89:11
Dichloromethane:Methanol	88:12
Dichloromethane:Methanol	87:13
Dichloromethane:Methanol	86:14
Dichloromethane:Methanol	85:15
Dichloromethane:Methanol	84:16
Dichloromethane:Methanol	83:17
Dichloromethane:Methanol	82:18
Dichloromethane:Methanol	81:19
Dichloromethane:Methanol	80:20
Dichloromethane:Methanol	70:30

รวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกันโดย spot ส่วนสกัดย่อยต่างๆ บน TLC สังเกตผลจากการดูดกลืนแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 254 nm แล้วพ่นด้วย Dragendorff's reagent รวมสารที่มีรูปแบบการเคลื่อนที่บน TLC ที่เหมือนกันจะได้ส่วนสกัดย่อย 5 สกัด นำส่วนสกัด P 1-2 (0.12 mg) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ reverse phase silica gel เป็น C-18 reverse phase

silica gel อะสารด้วยสารละลายน้ำ 25% water ใน methanol ได้สาร PS-1 ปริมาณ 10 mg นำส่วนสกัดย่อย PS 1-3 (0.25 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และ methanol-water (75:25) เป็น mobile phase ได้สาร PS-2 ปริมาณ 20 mg จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย P1-3-4 และ P 1-4 (0.07 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และ methanol-water (75:25) เป็น mobile phase เช่นกันได้สาร PS 3 (4 mg) และ PS 4 (3 mg)

3.5.3 การแยกสารจากส่วนสกัด P2

นำส่วนสกัดย่อยที่ P2 (2.25 g) มาแยกด้วย column chromatography โดยใช้ normal phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ dichloromethane:methanol เป็น mobile phase (0:100-30:70) รวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกันโดย spot ส่วนสกัดย่อยต่างๆ บน TLC สังเกตผลจากการดูดกลืนแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 254 nm จากนั้นพ่นด้วย Dragendorff's reagent รวมสารที่มีรูปแบบการเคลื่อนที่บน TLC ที่เหมือนกันจะได้ส่วนสกัดย่อย 4 ส่วนสกัด นำส่วนสกัดย่อย P2-2 (0.08 g) มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วย C-18 reverse phase silica gel column chromatography อะสารด้วย methanol:water (70:30) ได้สาร PS-5 (5 mg) จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย P2-6 (0.02 g) มาแยกต่อให้ได้สารเดียวด้วย C-18 reverse phase silica gel column chromatography อะสารด้วย methanol:water (70:30) จะได้สารประกอบ PS 6 (3 mg)

3.5.4 การแยกสารจากส่วนสกัด P4

นำส่วนสกัดย่อยที่ P4 (1.27 g) มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยแยกด้วย gel filtration column chromatography โดยใช้ sephadex LH 20 เป็น stationary phase ส่วน mobile phase ใช้ methanol รวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกันโดย spot ส่วนสกัดย่อยต่างๆ บน TLC สังเกตผลจากการดูดกลืนแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 254 nm จะได้ส่วนสกัดย่อย 4 ส่วนสกัด นำส่วนสกัด P4-2 (0.02 g) มาแยกต่อด้วย HPLC โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ methanol-0.05 % formic acid (60:40) เป็น mobile phase จะได้สารประกอบ PS-7 (7 mg)

3.6 การหาค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์

สำหรับการหาค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ให้เตรียมสารความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นเจือจางต่ออีก 4-5 ความเข้มข้น ทำการทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด

บทที่ 4
ผลและการอภิปรายผล
(Results and Discussion)

4.1 ผลการสกัดใบโดยวิธีแซ่สกัด (Maceration)

สารสกัดทายาบชั้น Hexane, ethyl acetate และ methanol จากใบของข้าวพลูมีน้ำหนักดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 น้ำหนักของสารสกัดทายาบ

สารสกัดชั้น	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสารสกัด
Hexane	12.30	ขันหนึดสีน้ำตาล
Ethyl acetate	32.12	ขันหนึดสีเขียวเข้ม
Methanol	73.50	สีน้ำตาล

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัด

เมื่อนำสารสกัดทายาบแต่ละชั้นของใบข้าวพู่ที่แยกได้มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสพบว่าที่ความเข้มข้น 1 mg/ml สารสกัดชั้น methanol แสดง % ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 64.89 ± 3.84 และมี %. ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสเท่ากับ 50.44 ± 2.94 ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยทั้งหมดแสดงในตาราง 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัด

สารสกัดชั้น	% DPPH scavenging activity	% Acetylcholine esterase inhibitory activity
Hexane	20.56 ± 8.91	22.80 ± 3.45
Ethyl acetate	23.64 ± 4.00	24.42 ± 4.86
Methanol	64.89 ± 3.84	50.44 ± 2.94
L-ascorbic acid	96.97 ± 0.32	
Eserine	-	95.63 ± 0.32

4.3 ผลการแยกสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดใบขัน Methanol มาแยกให้เป็นส่วนสกัดย่อยด้วยเทคนิค column chromatography ด้วย silica gel และใช้ตัวทำละลายผสม dichloromethane:methanol เป็นตัวชี SAR จากนั้นนำไปศึกษารูปแบบการเคลื่อนที่บน TLC และรวมสารสกัดย่อยที่มีลักษณะเหมือนกันจะได้ส่วนสกัดย่อย 4 ส่วน สกัดย่อย น้ำหนักสารที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 น้ำหนักส่วนสกัดย่อย

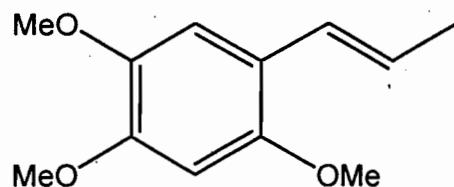
ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักสารที่ได้ (g)
P-1	3.25
P-2	2.25
P-3	0.72
P-4	1.27

4.4 ผลการแยกสารบริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำส่วนสกัดจากใบข้าพลูมาแยกสารจากด้วยเทคนิคทางโคมาร์ตกราฟิต่างๆ ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 7 ชนิด จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์สารเหล่านี้ด้วย เทคนิคทางスペคโทรเมตรี ได้แก่ แมสสเปคโทร มิเตอร์ (Mass spectrometr) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโทรมิเตอร์แบบ 1 มิติและ 2 มิติ (1D และ 2D NMR spectrometer)

4.4.1 การพิสูจน์เอกสารประกอบ PS-1

สารประกอบ PS-1 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ข้อมูล HRESIMS⁺ แสดง [M+H]⁺ ที่ *m/z* 209.1168 ตรงกับสูตรโมเลกุล C₁₂H₁₆O₃ จากข้อมูลของ ¹H NMR แสดง *trans* olefinic coupling protons ระหว่าง H-1 และ H-2 ที่ δ 6.10 (1H, dd, 15.93, 6.59) และ 6.60 (1H, dd, 15.93, 1.83) ppm ส่วนตำแหน่งที่ 3 พบว่าเป็นหมู่ methyl โดยพบที่ δ 1.81 (3H, dd, 6.59, 1.83) สอดคล้องกับค่า chemical shift ของ ¹³C NMR ซึ่งแสดงที่ δ 18.8 ppm ส่วนในวง aromatic แสดง para coupling protons ที่ δ 7.01 (1H, s) และ 6.64 (1H, s) ppm ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ได้แก่ H-2' และ H-5' จากข้อมูลจาก HMBC spectra ยืนยันว่าหมู่ methoxy แทนที่บนตำแหน่ง C-3', C-4' และ C-6' สูตรโครงสร้างนี้เป็น α-asarone (7) (Likhitwitayawuid et al., 1988)



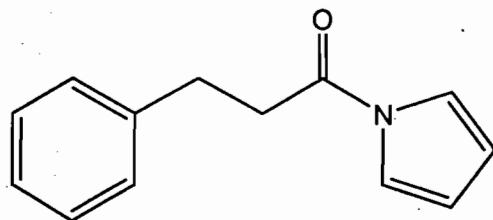
(7)

ตารางที่ 7 The ¹H and ¹³C NMR data of compound PS-1 in acetone-d₆.

Position	¹ H δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	¹³ C δ (ppm)
1	6.10 (1H, dd, 15.93, 6.59)	126.1
2	6.60 (1H, dd, 15.93, 1.83)	123.8
1'	-	119.4
2'	7.01 (1H, s)	111.6
3'	-	150.4
4'	-	151.8
5'	6.64 (1H, s)	99.4
6'	-	144.5
3-CH ₃	1.81 (3H, dd, 6.59, 1.83)	18.8
3'-OCH ₃	3.80 (3H, s)	56.3
4'-OCH ₃	3.79 (3H, s)	56.6
6'-OCH ₃	3.75 (3H, s)	56.9

4.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-2

สารประกอบ PS-2 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ข้อมูล HRESIMS⁺ แสดง $[M+H]^+$ ที่ m/z 200.1079 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{13}H_{13}NO$ จากข้อมูลของ 1H NMR แสดงชุดของ monosubstituted aromatic ring protons ที่ δ 7.30 (2H, t, 6.59, 7.57), 7.27 (2H, t, 7.57, 7.08) และ 7.18 (1H, t, 1.55, 1.66, 7.08) ppm และชุดของ pyrrole protons ที่ δ 7.41 (2H, overlapped) และ 6.25 (2H, overlapped) ซึ่งเป็นตำแหน่งของ H-2 กับ H-5 และ H-3 กับ H-4 ตามลำดับ จากข้อมูลค่า chemical shift ของ ^{13}C NMR พบร่วมมีหมู่ methylene 2 หมู่ที่ δ 30.8 และ 36.4 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของ C-3' และ C-2' ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ carbonyl carbon ที่ δ 170.6 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของ C-1' ตำแหน่ง carbons และ protons ทั้งหมดยืนยันด้วย HSQC และ HMBC spectra ดังนั้นสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-2 ได้ว่าเป็นสาร 3-phenylpropanoyl pyrrole (1) (Likhitwitayawuid and Ruangrungsi, 1987)



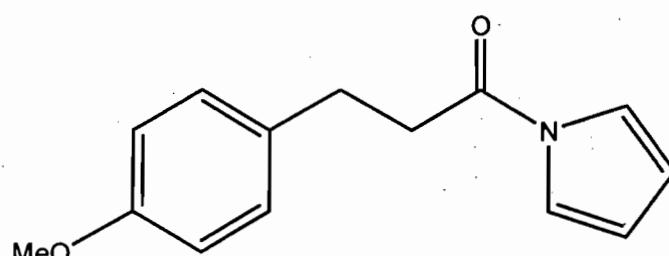
(1)

ตารางที่ 8 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-2 in acetone- d_6

Position	^1H δ (ppm), J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	7.41 (1H, overlapped)	119.8
3	6.25 (1H, overlapped)	113.3
4	6.25 (1H, overlapped)	113.3
5	7.41 (1H, overlapped)	119.8
1'	-	170.6
2'	3.27 (2H, t, 7.32, 7.81)	36.4
3'	3.27 (2H, t, 7.32, 7.81)	30.8
4'		141.6
5'	7.30 (1H, t, 6.59, 7.57)	129.3
6'	7.27 (1H, t, 7.57, 7.08))	129.2
7'	7.18 (1H, t, 1.55, 1.66, 7.08)	126.9
8'	7.27 (1H, t, 7.57, 7.08)	129.2
9'	7.30 (1H, t, 6.59, 7.57)	129.3

4.4.3 การพิสูจน์เอกสารสารประกอบ PS-3

สารประกอบ PS-3 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ข้อมูล HRESIMS⁺ แสดง $[M+H]^+$ ที่ m/z 229.1130 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{15}NO_2$ จากข้อมูลของ 1H NMR แสดงชุดของ disubstituted aromatic ring protons ที่ δ 7.30 (2H, d, 9.07) และ 6.83 (2H, d, 9.07) ppm แสดงถึงตำแหน่งของ H-5' กับ H-9' และ H-6' กับ H-8' พบรูดของ pyrrole protons ที่ δ 7.40 (2H, overlapped) และ 6.24 (2H, overlapped) ซึ่งเป็นตำแหน่งของ H-2 กับ H-5 และ H-3 กับ H-4 ตามลำดับ ส่วนข้อมูลของ ^{13}C NMR พบว่าเป็นมีหมู่ methylene 2 หมู่ที่ δ 30.0 และ 36.4 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของ C-3' และ C-2' ตามลำดับ และยังพบ carbonyl carbon ที่ δ 170.5 ppm ซึ่งเป็นตำแหน่งของ C-1' จากข้อมูลสัญญาณ 1H และ ^{13}C NMR ที่ δ 3.74 (3H, s) และ 55.1 ppm แสดงถึงการแทนที่ของหมู่ methoxy บน C-7' ในวง aromatic ตำแหน่ง carbons และ protons ทั้งหมดยืนยันด้วย HSQC และ HMBC spectra สูตรโครงสร้างนี้เป็น 3-(4'-methoxyphenyl)propanoyl pyrrole (28) (Luger et al., 2002)

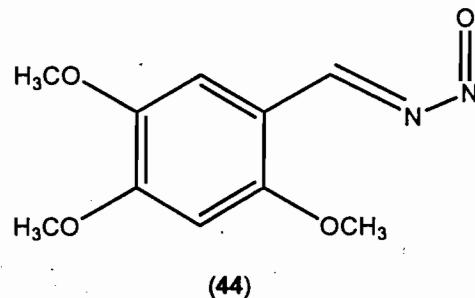


ตารางที่ 9 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-3 in acetone- d_6

Position	$^1\text{H} \delta$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C} \delta$ (ppm)
2	7.40 (1H, overlapped)	119.5
3	6.24 (1H, overlapped)	113.0
4	6.24 (1H, overlapped)	113.0
5	7.40 (1H, overlapped)	119.5
1'	-	170.5
2'	3.22 (1H, t, 6.40, 7.80)	36.4
3'	2.96 (1H, t, 7.32, 7.81)	30.0
4'		133.1
5'	7.30 (1H, d, 9.07)	129.9
6'	6.83 (1H, d, 9.07)	114.2
7'	-	158.8
8'	6.83 (1H, d, 9.07))	114.2
9'	7.30 (1H, d, 9.07)	129.9
7'-OCH ₃	3.74 (3H, s)	55.1

4.4.4 การพิสูจน์เอกสารประกอบ PS-4

สารประกอบ PS-4 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ข้อมูล HRESIMS⁺ แสดง [M+H]⁺ ที่ *m/z* 224.0797 ตรงกับสูตรโมเลกุล C₁₀H₁₂N₂O₄ จากข้อมูลของ ¹H และ ¹³C NMR พบรค่า δ 10.25 (1H, *s*) และ 187.2 ppm แสดงถึงการมีหมู่ดึงอิเล็กตรอนต่ออยู่ ซึ่งได้แก่หมู่ nitrosoimino นอกจากนั้นพบรูปแบบสัญญาณของ para substituted protons ที่ δ 6.81 (1H, *s*) และ 7.21 (1H, *s*) ppm และยังพบสัญญาณของหมู่ methoxy 3 ชุดที่ δ 3.95 (3H, *s*), 3.94 (3H, *s*) และ 3.79 (3H, *s*) ppm สอดคล้องกับค่า chemical shift ของ ¹³C NMR ซึ่งแสดงที่ δ 56.8, 56.5 และ 56.4 ppm จากข้อมูล HMBC หมู่ methoxy เหล่านี้แทนที่ในวง aromatic ตำแหน่ง C-2, C-4 และ C-5 ตามลำดับ สูตรโครงสร้างนี้เป็นสาร 1-nitrosoimino-2,4,5-trimethoxybenzene (44) (Sim et al., 2009)

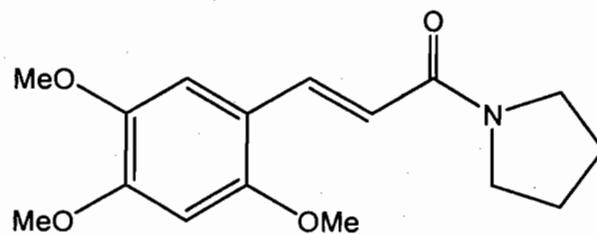


ตารางที่ 10 The ¹H and ¹³C NMR data of compound PS-4 in acetone-d₆

Position	¹ H δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	¹³ C δ (ppm)
1		117.9
2		159.6
3	6.81 (1H, <i>s</i>)	97.8
4	-	157.3
5		144.7
6	7.21 (1H, <i>s</i>)	109.8
1-CHN	10.25 (1H, <i>s</i>)	187.2
2-OCH ₃	3.95 (3H, <i>s</i>)	56.8
4-OCH ₃	3.94 (3H, <i>s</i>)	56.5
5-OCH ₃	3.79 (3H, <i>s</i>)	56.4

4.4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-5

สารประกอบ PS-5 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ข้อมูล HRESIMS⁺ แสดง [M+H]⁺ ที่ *m/z* 294.1583 ตรงกับสูตรโมเลกุล C₁₆H₂₁NO₄ จากข้อมูลของ ¹H NMR แสดง *trans* olefinic coupling protons ระหว่าง H-2' และ H-3' ที่ δ 6.88 (1H, d, 15.38) และ 7.46 (1H, d, 15.38) ppm พบรดของ pyrrolidine protons ที่ δ 3.44 (1H, t, 6.83, 6.83), 1.84 (1H, quin, 0.71, 6.83, 7.08, 13.4), 1.97 (1H, quin, 0.71, 6.83, 7.08, 13.4) และ 3.64 (1H, t, 6.83, 6.83) ซึ่งเป็นตำแหน่งของ H-2, H-3, H-4 และ H-5 ตามลำดับ ส่วนในวง aromatic แสดง para coupling type protons ที่ δ 6.97 (2H, s) ppm ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ได้แก่ H-6' และ H-9' พบรดของหมู่ methoxy 3 ชุดที่ δ 3.85 (6H, s) และ 3.73 (3H, s) สอดคล้องกับค่า chemical shift ของ ¹³C NMR ซึ่งแสดงที่ δ 56.4 และ 60.5 ppm จากข้อมูลจาก HMBC spectra ยืนยันว่าหมู่ methoxy แทนที่บนตำแหน่ง C-5', C-7' และ C-8' สูตรโครงสร้างนี้เป็นสาร 2',4',5' -trimethoxycinnamoyl pyrrolidine (24) (Tuntiwachwuttikul et al., 2006)



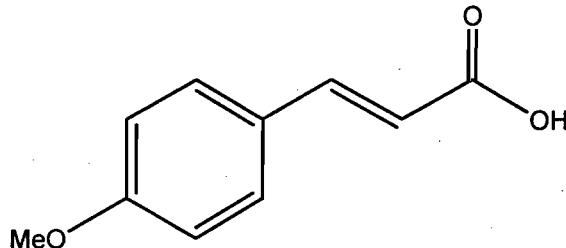
(24)

ตารางที่ 11 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-5 in acetone- d_6

Position	^1H δ (ppm), \jmath (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2	3.44 (1H, t, 6.83, 6.83)	46.4
3	1.84 (1H, quin, 0.71, 6.83, 7.08, 13.4)	24.8
4	1.97 (1H, quin, 0.71, 6.83, 7.08, 13.4)	26.6
5	3.64 (1H, t, 6.83, 6.83)	46.9
1'	-	164.8
2'	6.88 (1H, d, 15.38)	119.7
3'	7.46 (1H, d, 15.38)	141.7
4'	-	131.9
5'	-	154.4
6'	6.97 (1H, s)	106.3
7'	-	154.4
8'	-	140.5
9'	6.97 (1H, s)	106.3
5'-OCH ₃	3.85 (3H, s)	56.4
7'-OCH ₃	3.73 (3H, s)	56.4
8'-OCH ₃	3.85 (3H, s)	60.5

4.4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-6

สารประกอบ PS-6 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ข้อมูล HRESIMS⁺ แสดง $[M+H]^+$ ที่ m/z 179.0692 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{10}H_{10}O_3$ จากข้อมูลของ 1H NMR แสดง *trans* olefinic coupling protons ระหว่าง H-2 และ H-3 ที่ δ 6.30 (1H, d, 15.87) และ 7.57 (1H, d, 15.87) ppm พบรดสัญญาณของ disubstituted protons ที่ δ 6.88 (2H, overlapped) และ 7.52 (2H, overlapped) ppm ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ได้แก่ H-5 กับ H-9 และ H-6 กับ H-8 นอกจากนั้นยังพบสัญญาณ 1H และ ^{13}C NMR ที่ δ 3.91 (3H, s) และ 56.0 ppm แสดงถึงการมีหมู่ methoxy ในโมเลกุลและแทนที่ในวง aromatic ตำแหน่ง C-7 และพบสัญญาณ carboxylic carbon C-1 ที่ δ_C 167.8 ppm สูตรโครงสร้างนี้เป็นสาร ρ -methoxycinnamic acid (45) (Kim et al., 2012)



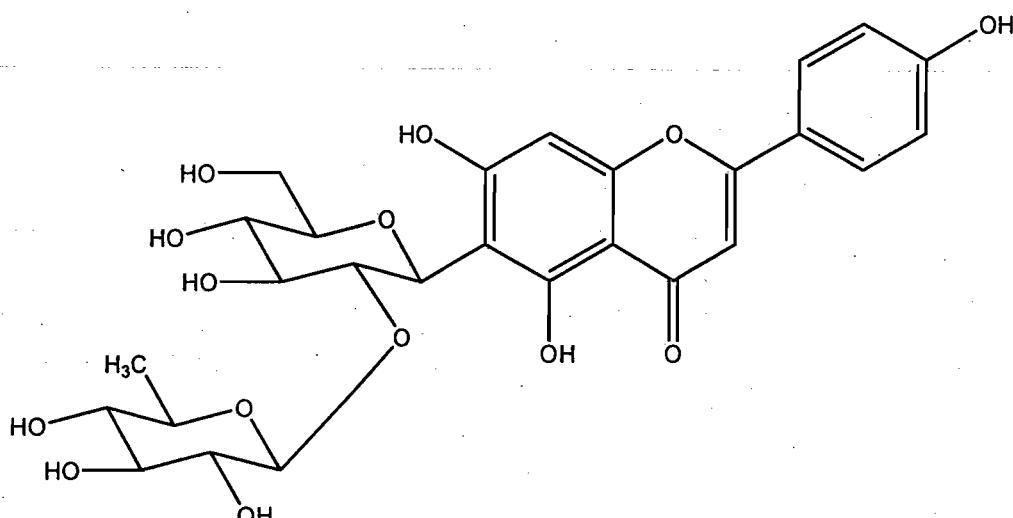
(48)

ตารางที่ 12 The 1H and ^{13}C NMR data of compound PS-6 in acetone- d_6

Position	$^1H \delta$ (ppm), J (Hz)	$^{13}C \delta$ (ppm)
1		167.8
2	6.30 (1H, d, 15.87)	115.7
3	7.57 (1H, d, 15.87)	145.1
4		160.1
5	6.88 (1H, overlapped)	116.3
6	7.52 (1H, overlapped)	130.5
7		148.1
8	7.52 (1H, overlapped)	130.5
9	6.88 (1H, overlapped)	116.3
7-OCH ₃	3.91 (3H, s)	56.0

4.4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ PS-7

สารประกอบ PS-7 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ข้อมูล HRESIMS⁺ แสดง $[M+H]^+$ ที่ m/z 579.1707 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{30}O_{14}$ จากข้อมูลของ 1H NMR แสดง singlet proton H-3 ที่ δ 6.60 (1H, s) และ H-8 ที่ δ 66.28 (1H, s) ส่วน ABA B' coupling type protons ที่ δ 7.98 (2H, d, 8.54) และ 6.93 (2H, d, 8.54) ppm ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ได้แก่ H-2', H-6' และ H-3'; H-5' สูตรโครงสร้างนี้เป็นส่วนของ aglycone ที่เป็น apigenin ซึ่งตำแหน่ง 6-hydroxy ถูกแทนที่ไป พนสัญญาณของน้ำตาล 2 ชุด ชุดที่ 1 แสดงค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 5.01 (H-1'), 3.62 (H-2'), 4.25 (H-3'), 3.50 (H-4'), 3.47 (H-5'), 3.79 และ 3.95 (H-6') ppm แสดงถึงการมี glucose ในสูตรโครงสร้าง ส่วนสัญญาณอีกชุดเป็นของน้ำตาล rhamnose โดยแสดงค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 5.09 (H-1''), 3.84 (H-2''), 3.38 (H-3''), 3.13 (H-4''), 2.43 (H-5''), และ 0.63 (CH_3 -6'') ppm จากการศึกษา HMBC spectrum ยืนยันตำแหน่งที่น้ำตาล glucose เกาะที่ตำแหน่ง C-6 ของ apigenin โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-1'' (δ_H 5.01 ppm) กับ C-5 (δ_C 157.9 ppm) และ C-7 (δ_C 164.2 ppm) ส่วนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาล rhamnose เกาะที่ตำแหน่ง 2 ของ glucose โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-2'' (δ_H 3.62 ppm) กับ C-1'' (δ_C 102.5 ppm) ตำแหน่ง carbons และ protons ที่เหลือทั้งหมดยืนยันด้วย HSQC และ HMBC spectra ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยแยกสารชนิดนี้ได้ ดังนั้นสารประกอบ PS-7 จึงเป็น isovitexin 2''-O- α -rhamnoside (46) (Prinz et al., 2007).



(49)

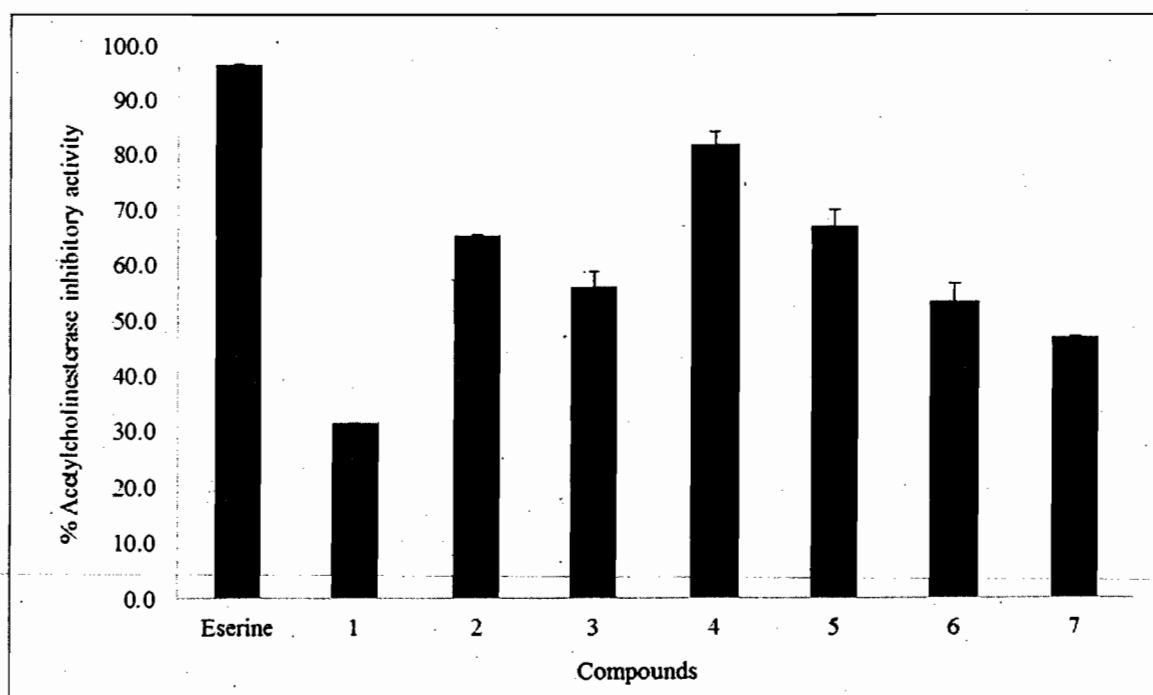
ตารางที่ 13 The ^1H and ^{13}C NMR data of compound PS-7 in methanol- d_4

Position	^1H δ (ppm), J (Hz)	^{13}C δ (ppm)
2		166.7
3	6.60 (1H, s)	103.6
4		184.1
5		157.9
6		106.0
7		164.2
8	6.28 (1H, s)	99.8
9		162.7
10		105.7
1'		123.5
2'	7.98 (1H, d, 8.54)	130.1
3'	6.93 (1H, d, 8.54)	117.0
4'		162.7
5'	6.93 (1H, d, 8.54)	117.0
6'	7.98 (1H, d, 8.54)	130.1
1''	5.01 (1H, d, 10.01)	73.7
2''	3.62 (1H, t, 4.15, 10.01)	81.6
3''	4.25 (1H, m)	78.1
4''	3.50 (1H, m)	71.9
5''	3.47 (1H, m)	82.8
6'' α	3.95 (1H, dd, 1.70, 12.16)	63.0
6'' β	3.79 (1H, dd, 5.21, 12.16)	
1'''	5.09 (1H, d, 1.22)	102.5
2'''	3.84 (1H, dd, 1.22, 1.71)	72.4
3'''	3.38 (1H, dd, 3.17, 9.52)	72.2
4'''	3.13 (1H, m)	73.5
5'''	2.43 (1H, m)	69.9
6'''CH ₃	0.63 (3H, d, 6.10)	18.0

4.5 ผลการทดสอบและการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารบริสุทธิ์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารจากใบทัง 7 ชนิดพบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของดีที่สุดคือ สารประกอบ PS-4 รองลงมาได้แก่ สาร PS-5 และ PS-2 ตามลำดับ ส่วนสารประกอบ PS-1 และ PS-7 มีฤทธิ์ต่ำเนื่องจากแสดงฤทธิ์ยับยั้งต่ำกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบหาค่า IC_{50} ดังแสดงในรูปที่ 5 ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงในตารางที่ 14 และ 15

รูปที่ 5 กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสาร PS-1-PS-7 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$



ตารางที่ 14 ผลการศึกษา % ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนอสเทอเรสของสารบริสุทธิ์

Compounds	Acetylcholinesterase inhibitory activity (%)				
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	31.58 \pm 0.00	-	-	-	-
2	65.52 \pm 0.00	40.74 \pm 1.60	32.69 \pm 0.00	28.21 \pm 1.11	-
3	56.20 \pm 2.60	24.14 \pm 0.00	15.52 \pm 5.17	5.56 \pm 0.00	-
4	82.13 \pm 2.21	57.72 \pm 5.10	47.22 \pm 2.78	42.59 \pm 4.24	-
5	67.15 \pm 3.02	54.11 \pm 3.02	24.69 \pm 2.83	20.99 \pm 4.66	-
6	53.61 \pm 3.13	45.06 \pm 1.07	18.52 \pm 1.60	11.11 \pm 0.00	-
7	47.22 \pm 0.00	-	-	-	-
Eserine	96.55 \pm 0.00	93.52 \pm 1.60	69.44 \pm 4.81	50.93 \pm 3.21	48.15 \pm 6.42

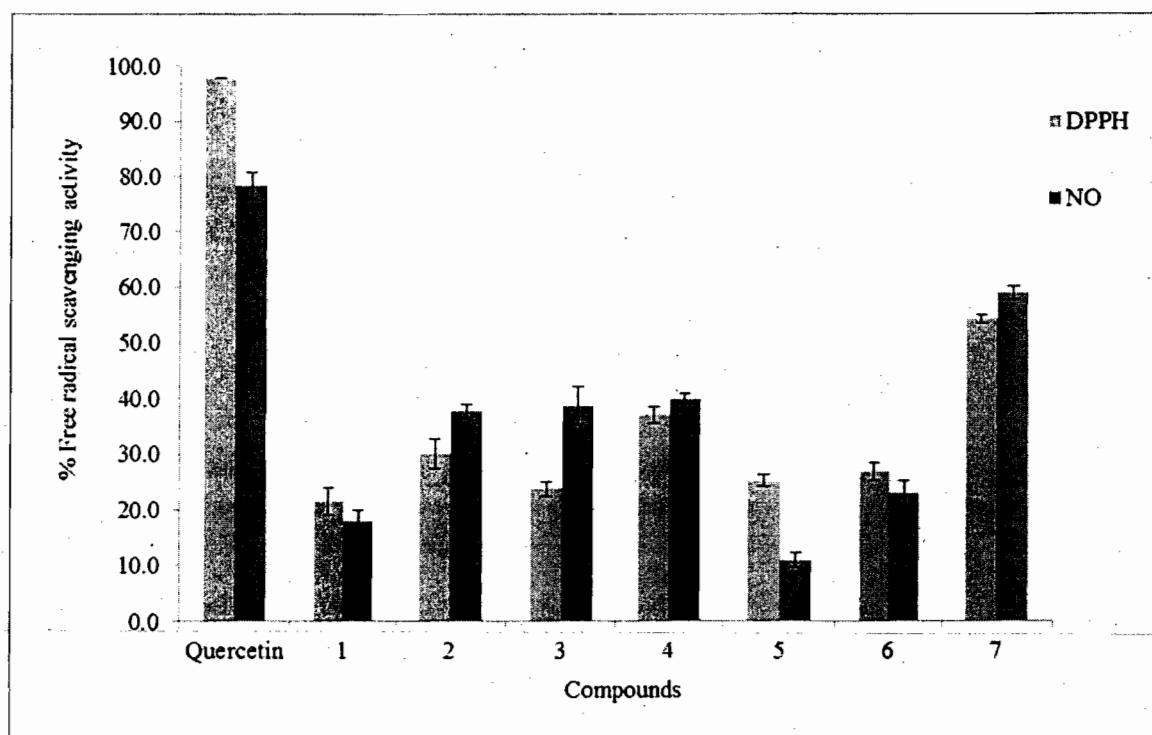
ตารางที่ 15 ผลการหาค่า IC_{50} ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนอสเทอเรสของสารบริสุทธิ์

Compounds	Acetylcholinesterase inhibitory activity	
	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IC_{50} (μM)
1	n.d.	n.d.
2	15.37 \pm 1.52	77.24
3	111.09 \pm 22.63	485.11
4	0.85 \pm 0.25	3.80
5	9.94 \pm 1.22	34.17
6	47.25 \pm 10.70	265.44
7	n.d.	n.d.
Eserine	0.03 \pm 0.01	0.09

4.6 ผลการทดสอบและการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์

จากผลการศึกษาพบว่าสารกลุ่ม aromatic alkene PS-1 และ alkaloids ทั้งหมดที่แยกได้ (PS-2-PS-6) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ยับยั้งต่ำกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบหาค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงในรูปที่ 6 ส่วน PS-7 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ NO ได้ดีที่สุดที่ IC_{50} 107.35 และ 97.96 μM ดังแสดงในตารางที่ 16 และ 17

รูปที่ 6 กราฟแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร PS-1-PS-7 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

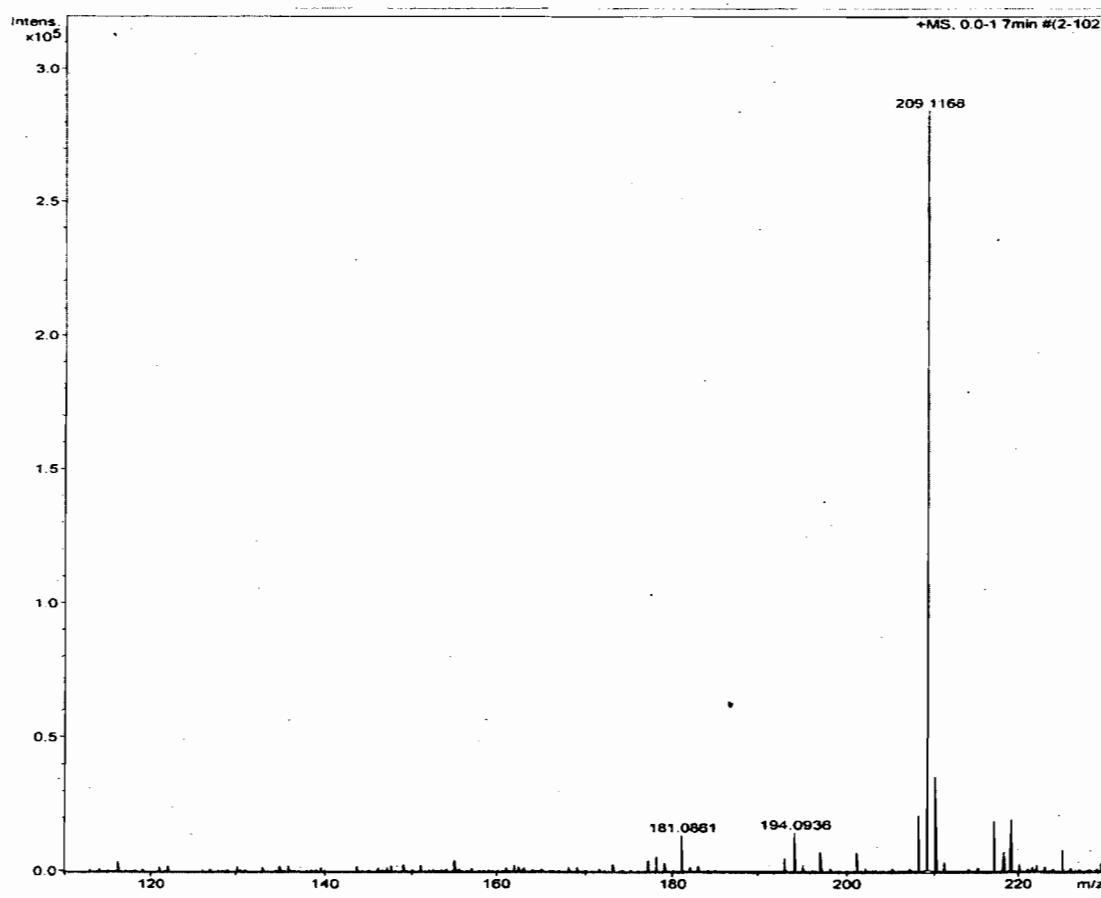


ตารางที่ 16 ผลการศึกษา IC_{50} ในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร PS-7

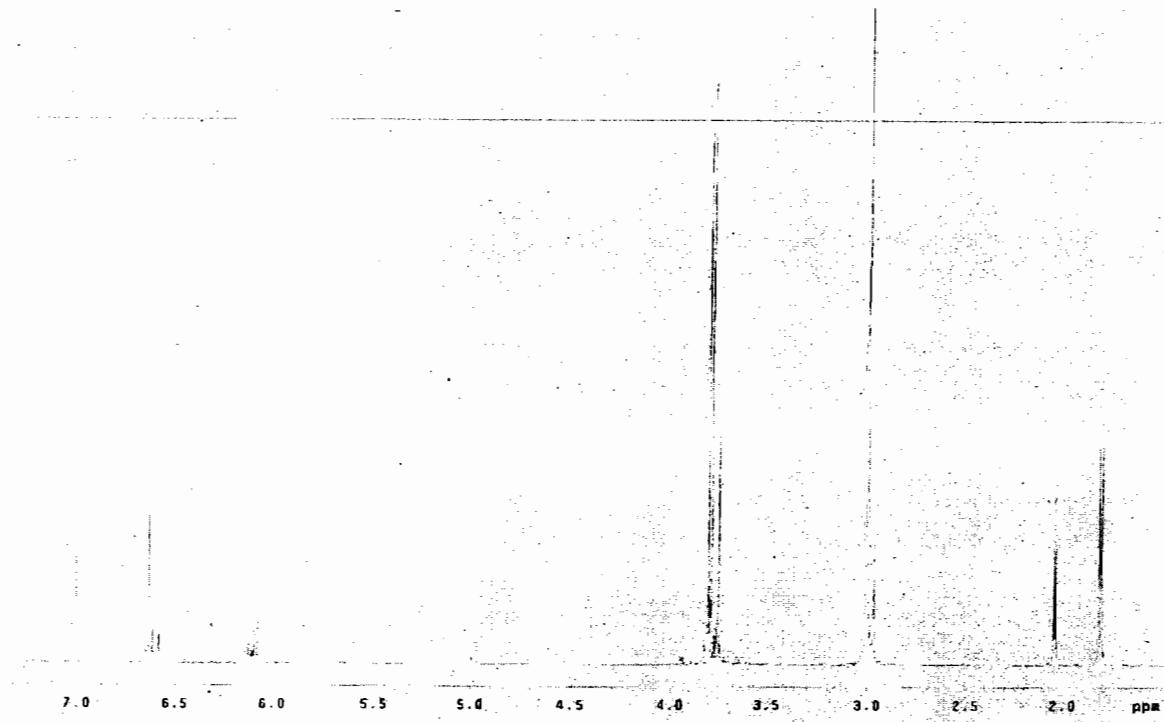
สารประกอบ	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	% DPPH scavenging activity	IC_{50} (μM)
		(Mean \pm SD)	
PS-7	0.1	22.08 \pm 2.04	107.35
	1	25.87 \pm 0.90	
	10	40.33 \pm 1.66	
	100	54.31 \pm 1.01	
quercetin	0.1	17.12 \pm 3.10	3.68
	1	37.54 \pm 2.97	
	10	96.49 \pm 0.01	
	100	97.85 \pm 0.00	

ตารางที่ 17 ผลการศึกษา IC_{50} ในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ NO ของสาร PS-7

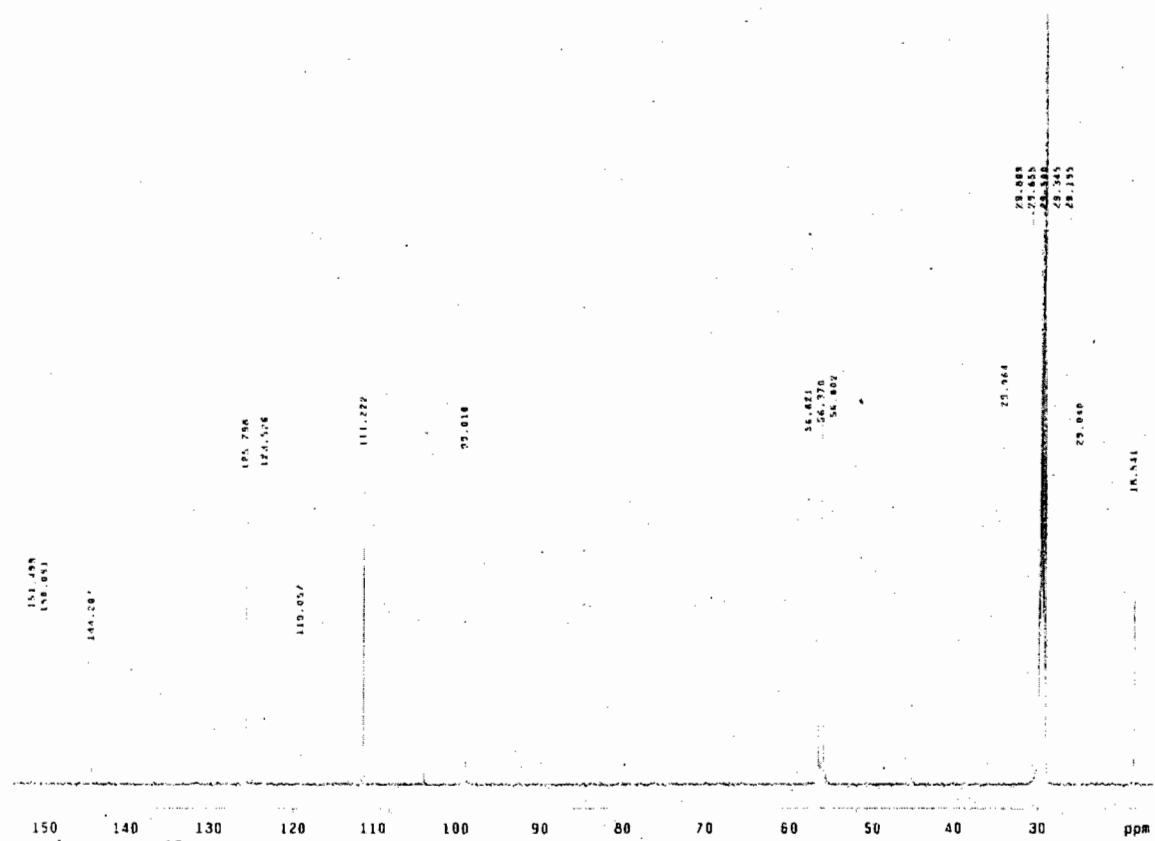
สารประกอบ	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	% NO scavenging activity	IC_{50} (μM)
		(Mean \pm SD)	
PS-7	0.1	24.94 \pm 0.38	97.96
	1	26.49 \pm 0.00	
	10	34.44 \pm 0.66	
	100	59.10 \pm 1.20	
quercetin	0.1	42.38 + 0.00	4.02
	1	43.18 + 0.00	
	10	53.94 + 0.55	
	100	78.33 + 2.50	



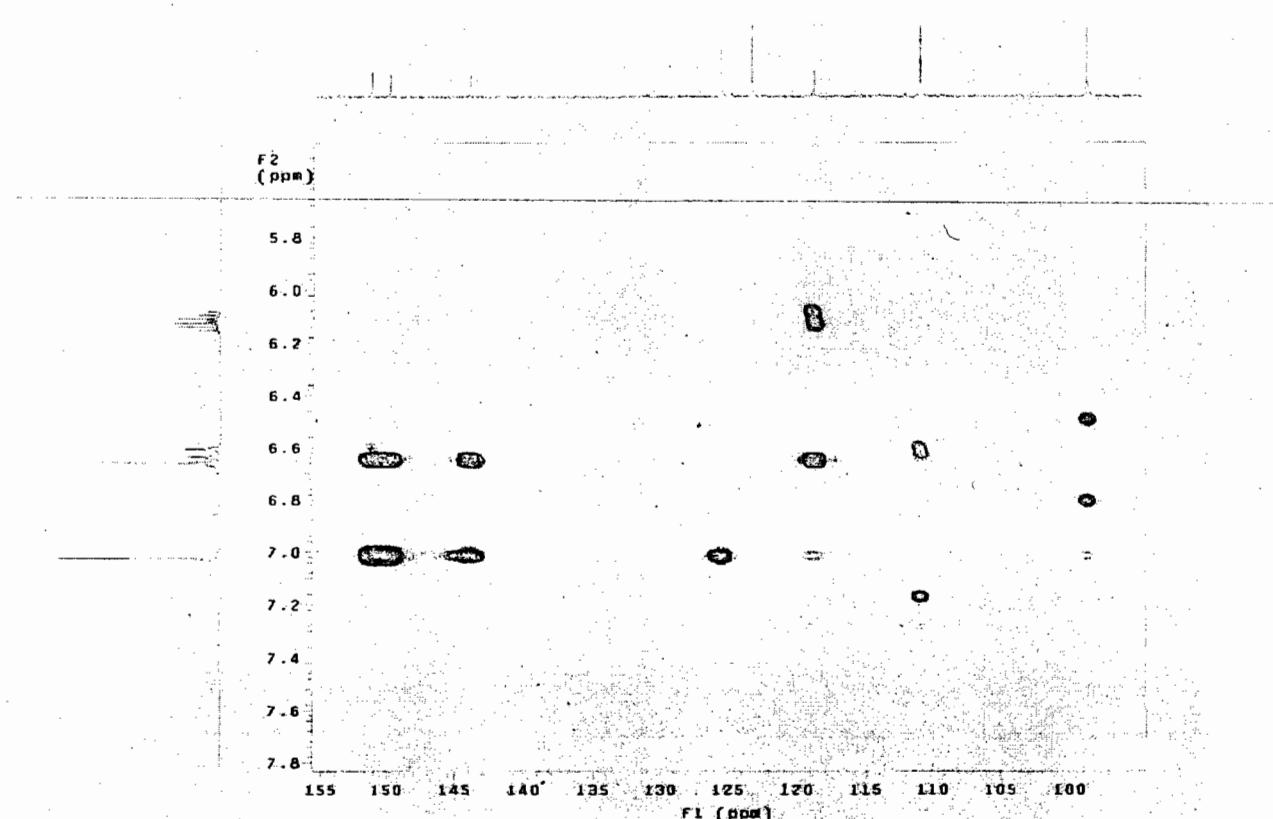
รูปที่ 7 The HREIMS mass spectrum of compound PS-1



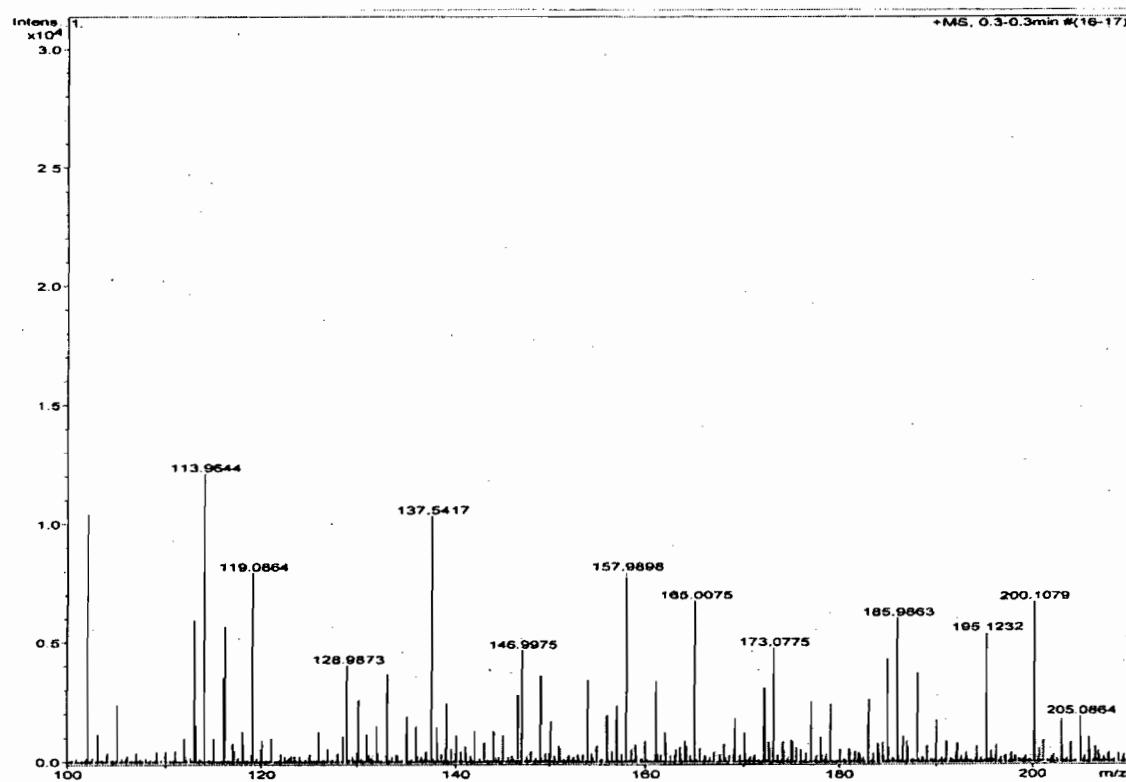
รูปที่ 8 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-1 (acetone- d_6)



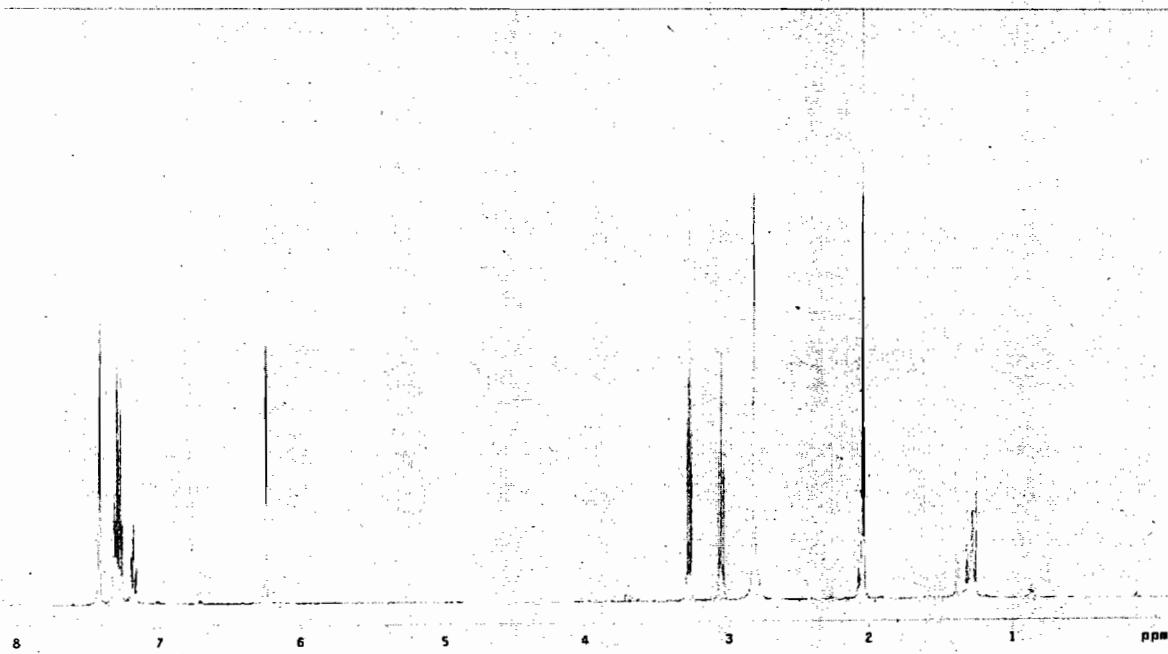
รูปที่ 9 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-1 (acetone- d_6)



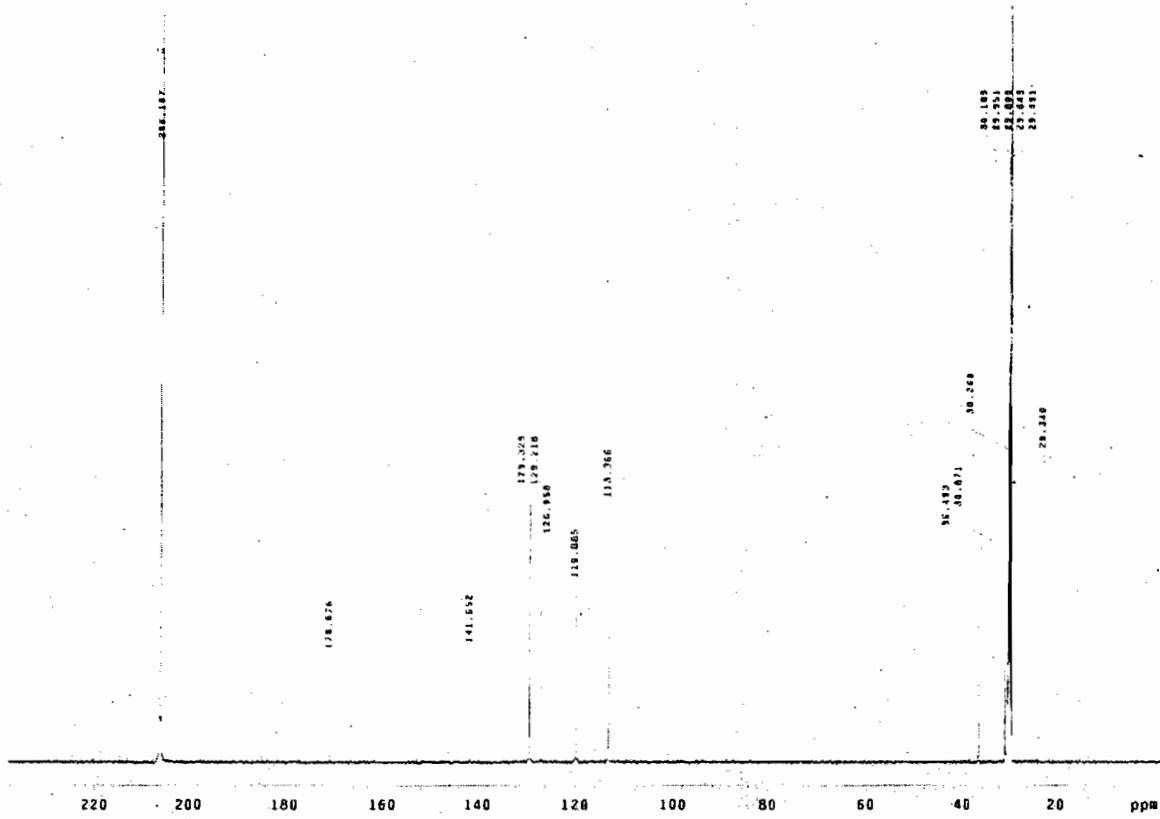
รูปที่ 10 The HMBC correlation of compound PS-1 (acetone- d_6)



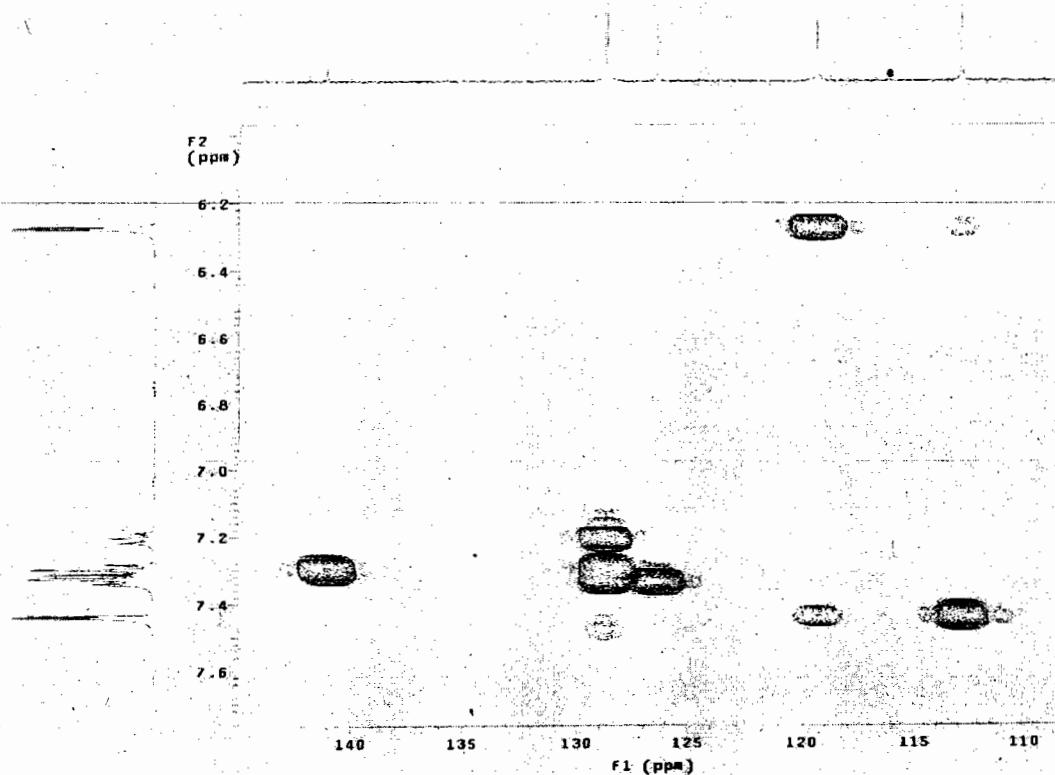
รูปที่ 11 The HREIMS mass spectrum of compound PS-2



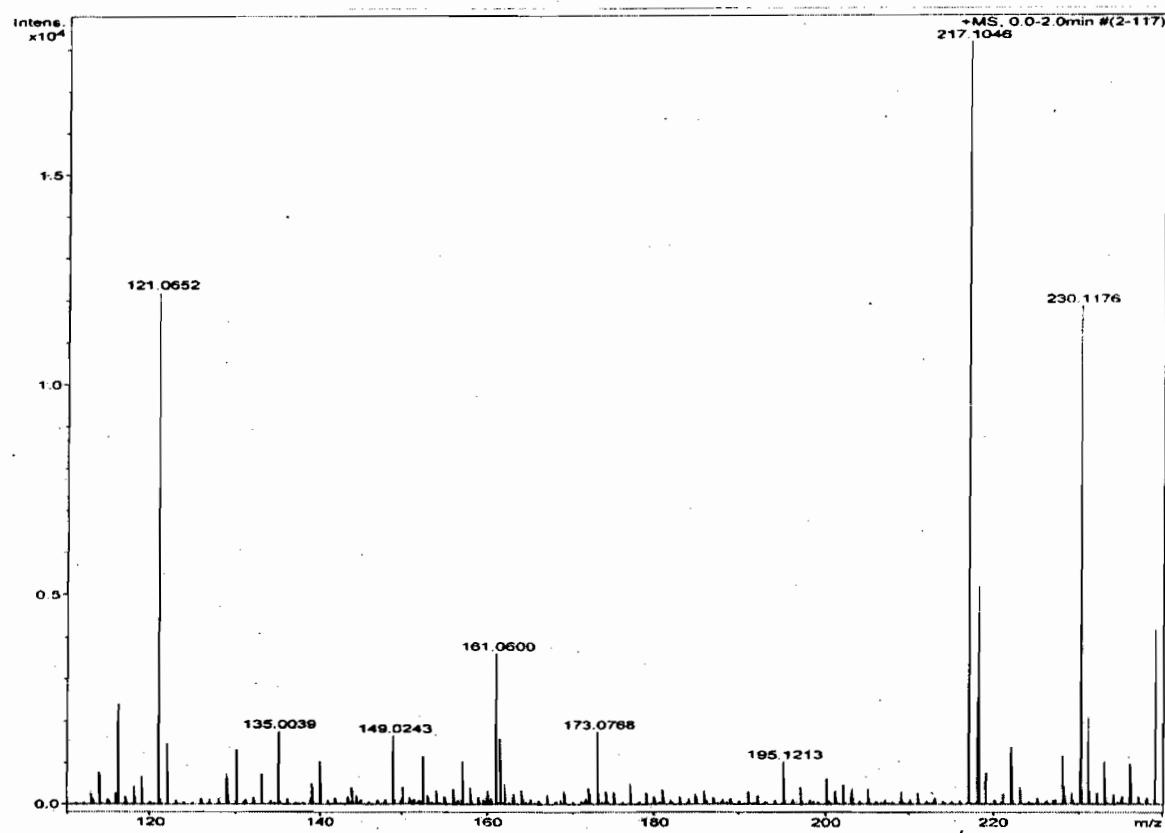
รูปที่ 12 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-2 (acetone- d_6)



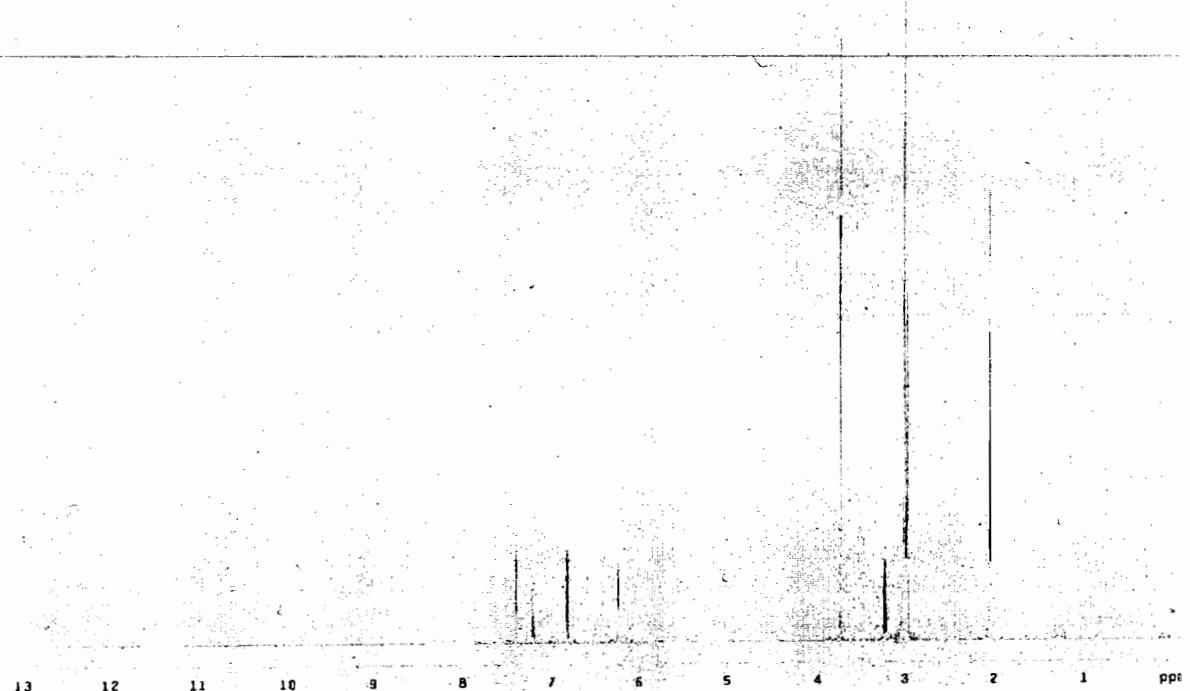
รูปที่ 13 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-2 (acetone- d_6)



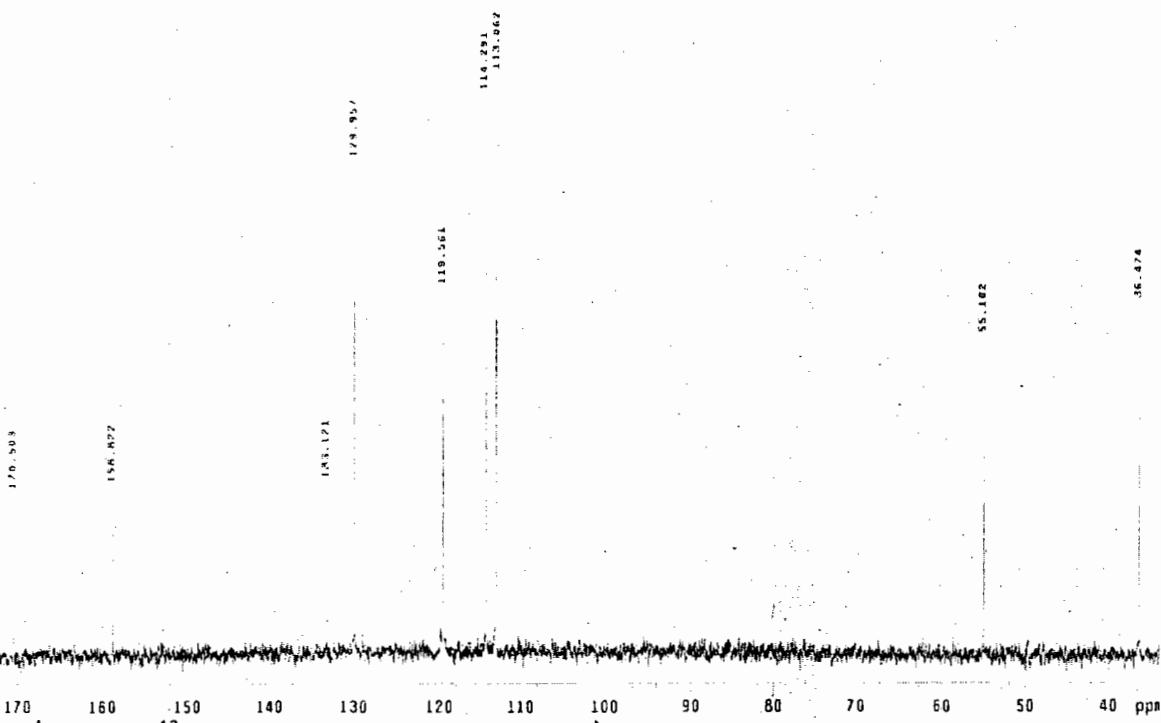
รูปที่ 14 The HMBC correlation of compound PS-2 (acetone- d_6)



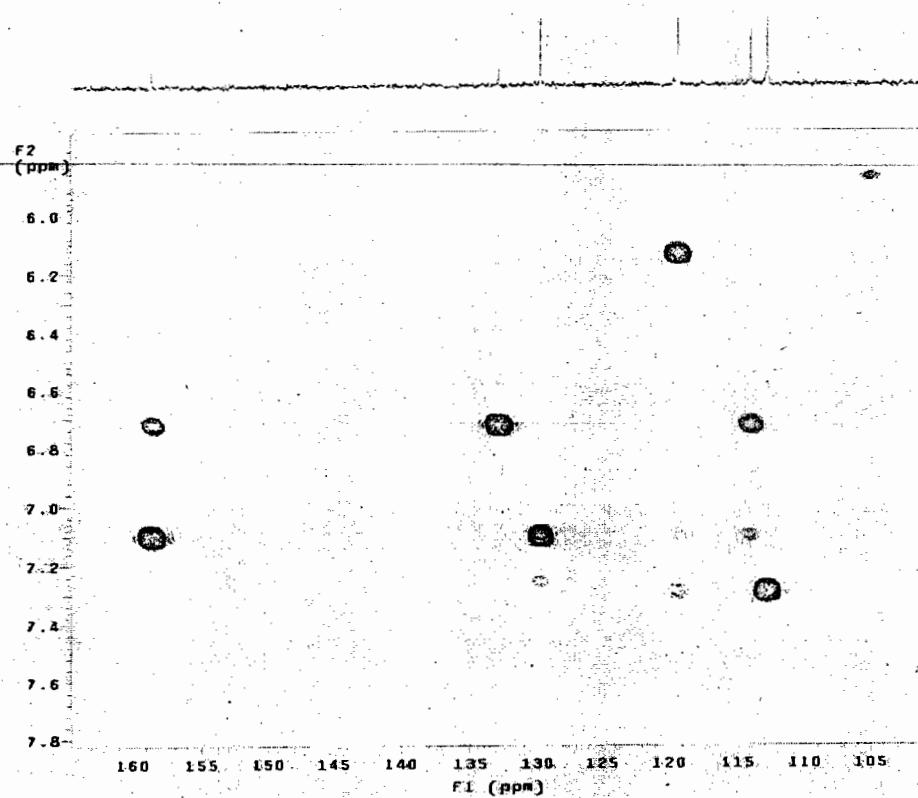
รูปที่ 15 The HREIMS mass spectrum of compound PS-3



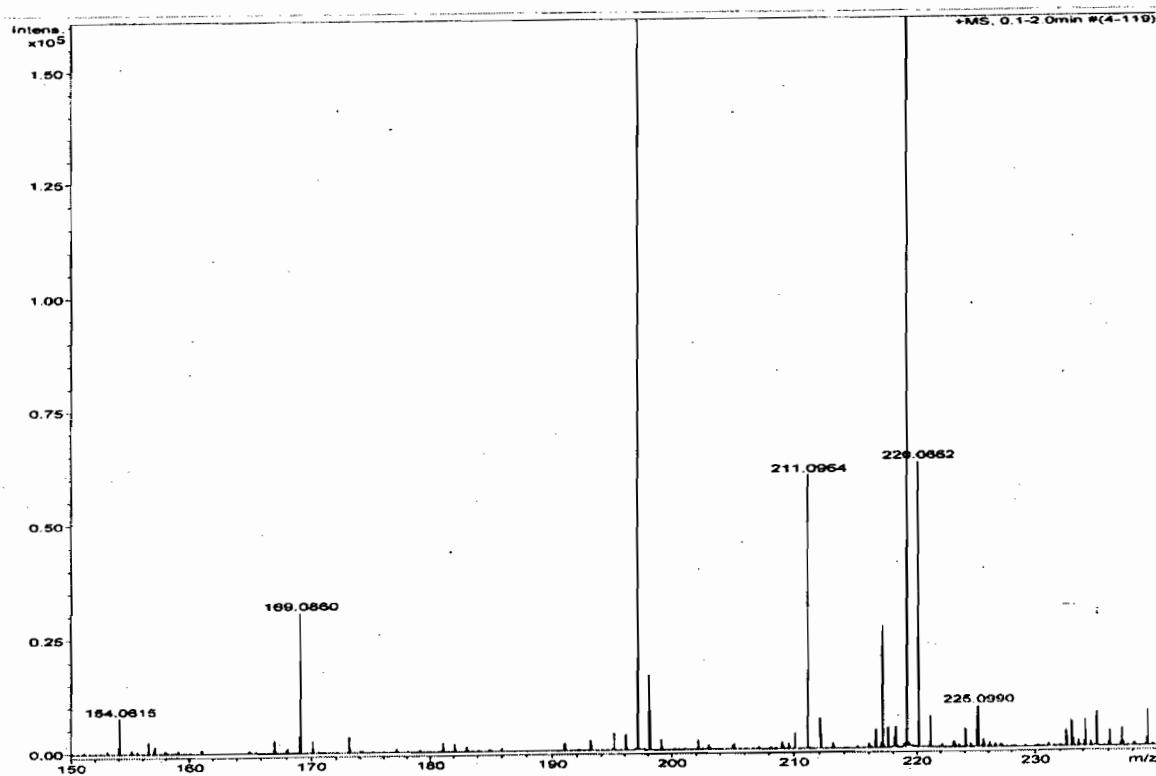
รูปที่ 16 The ${}^1\text{H}$ NMR (500 MHz) of compound PS-3 (acetone- d_6)



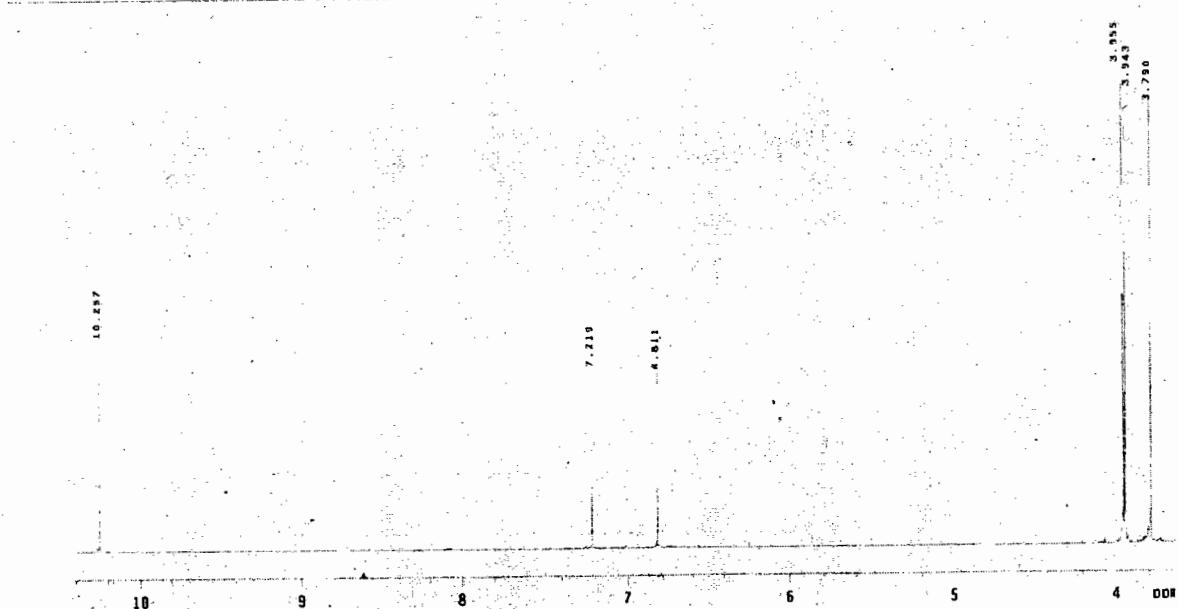
รูปที่ 17 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-3 (acetone- d_6)



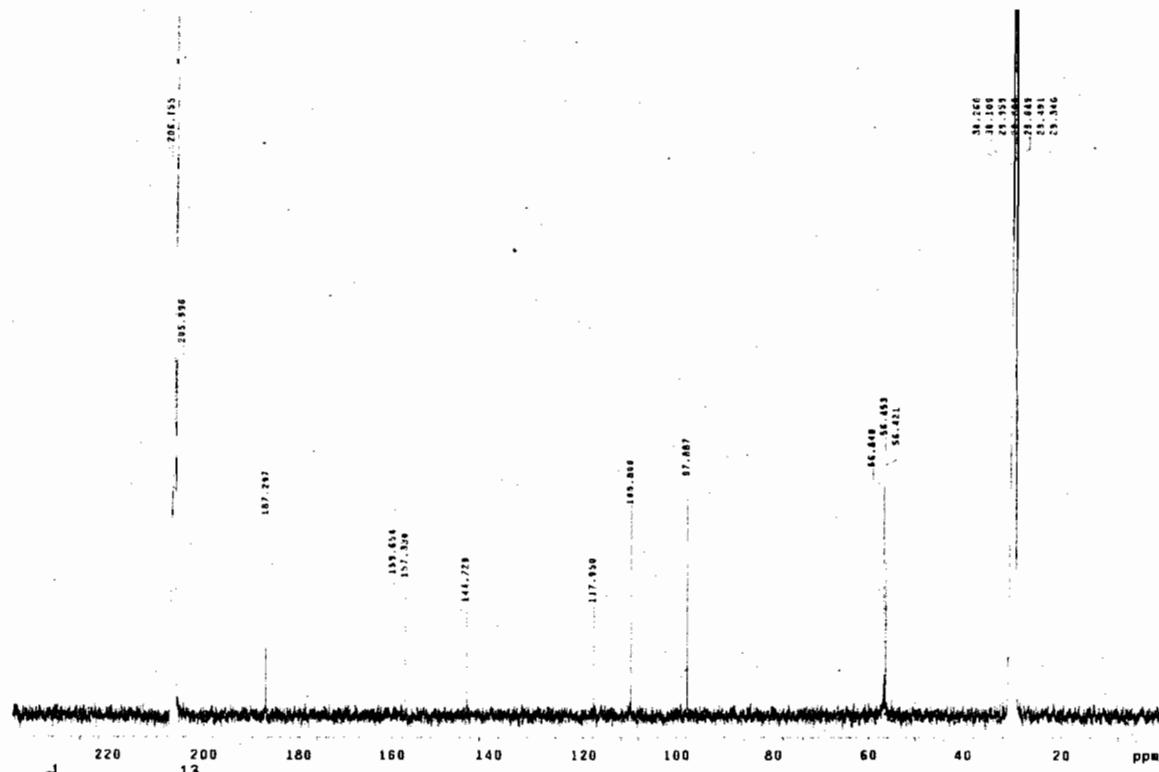
รูปที่ 18 The HMBC correlation of compound PS-3 (acetone- d_6)



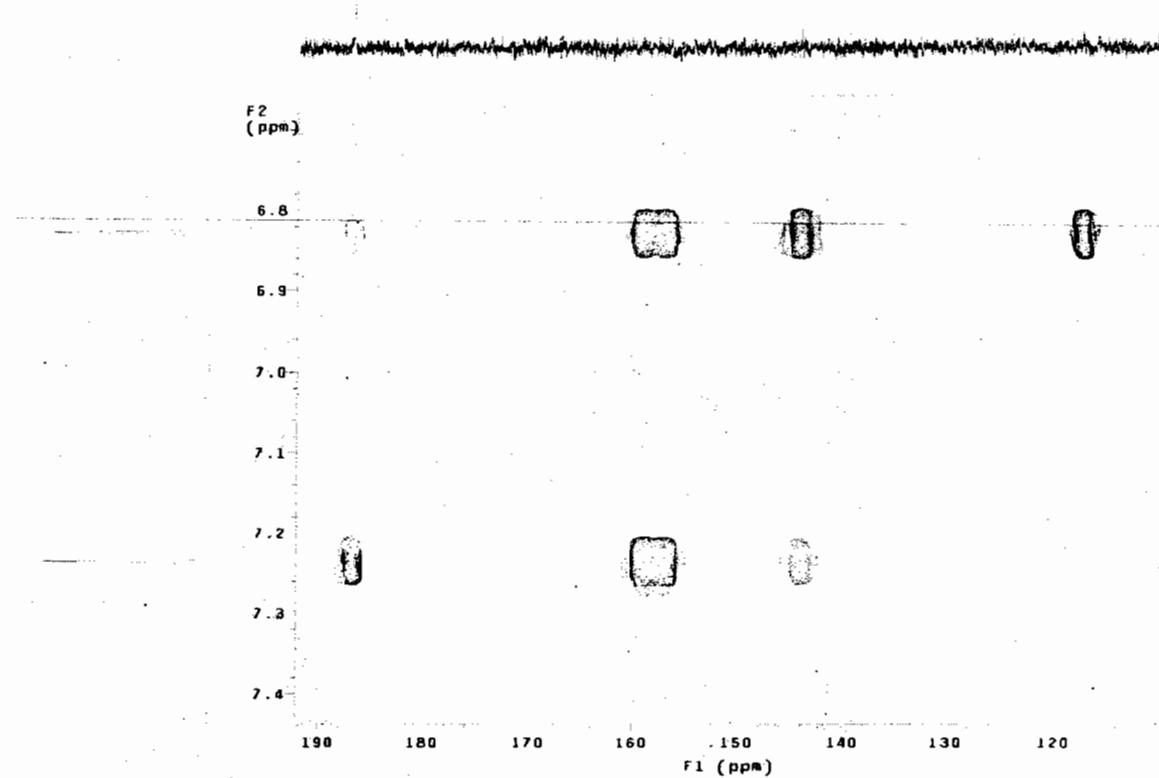
รูปที่ 19 The HREIMS mass spectrum of compound PS-4



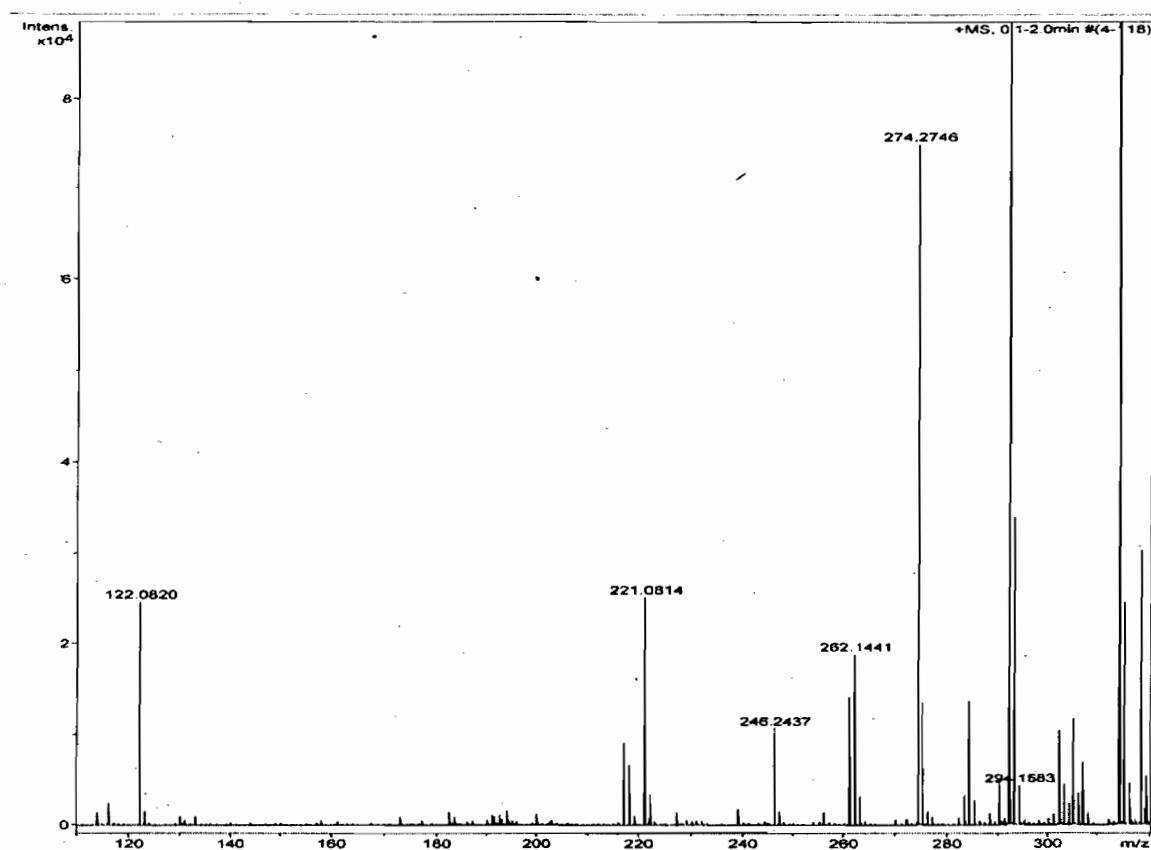
รูปที่ 20 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-4 (acetone- d_6)



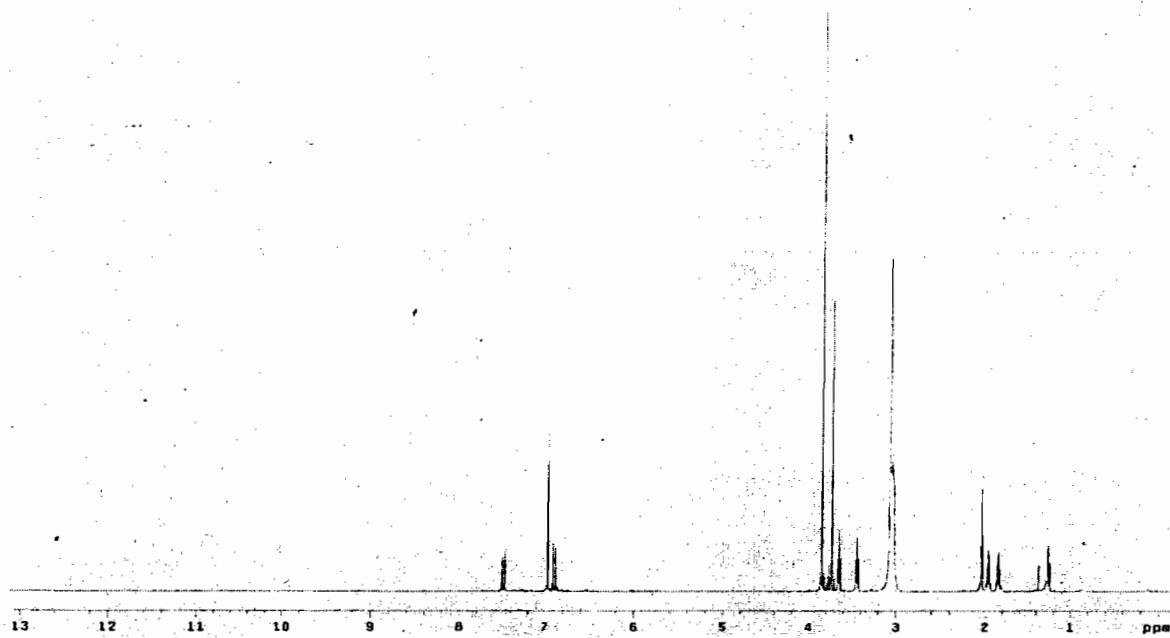
รูปที่ 21 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-4 (acetone- d_6)



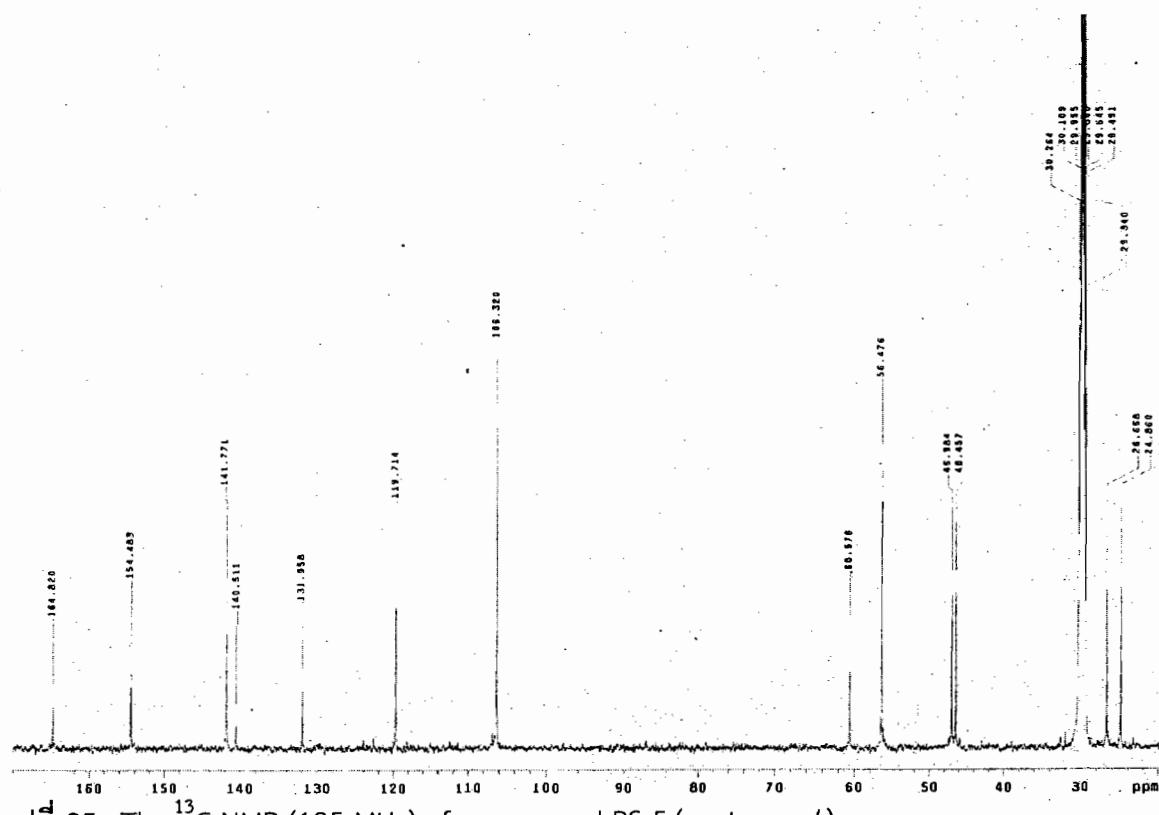
รูปที่ 22 The HMBC correlation of compound PS-4 (acetone- d_6)



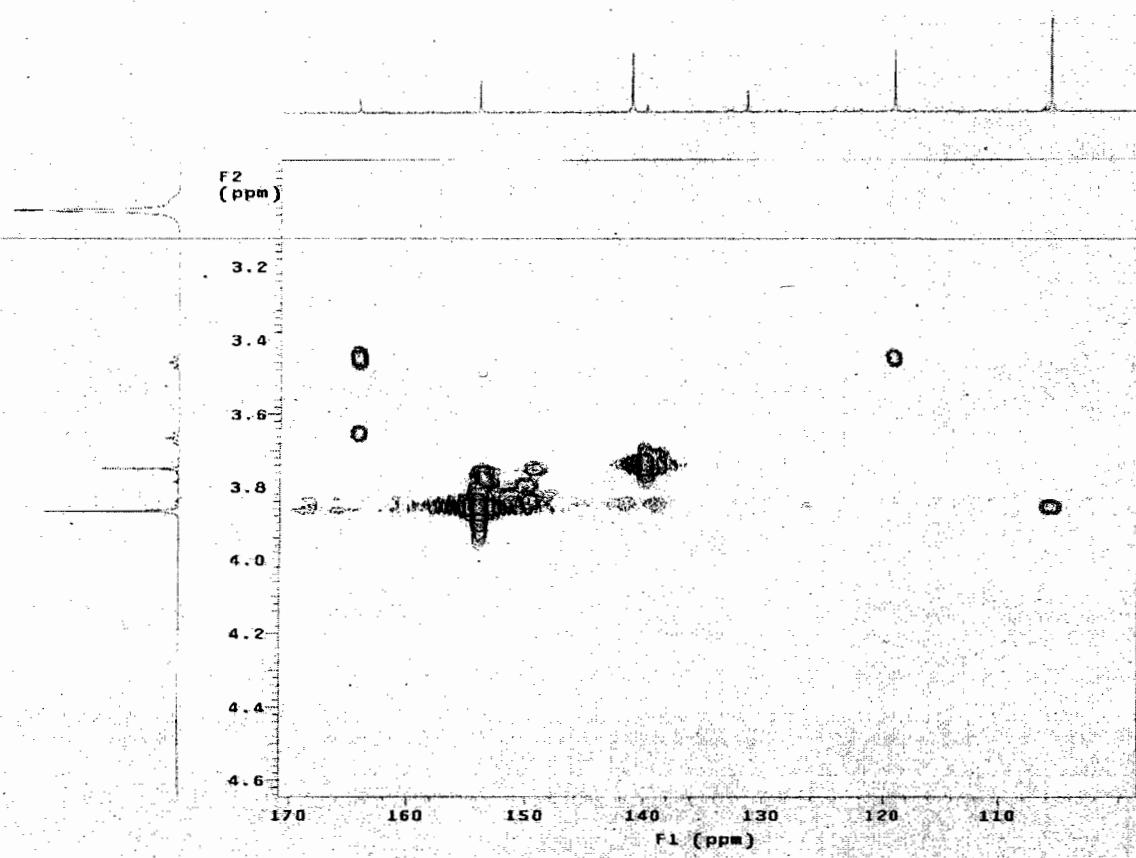
รูปที่ 23 The HREIMS mass spectrum of compound PS-5



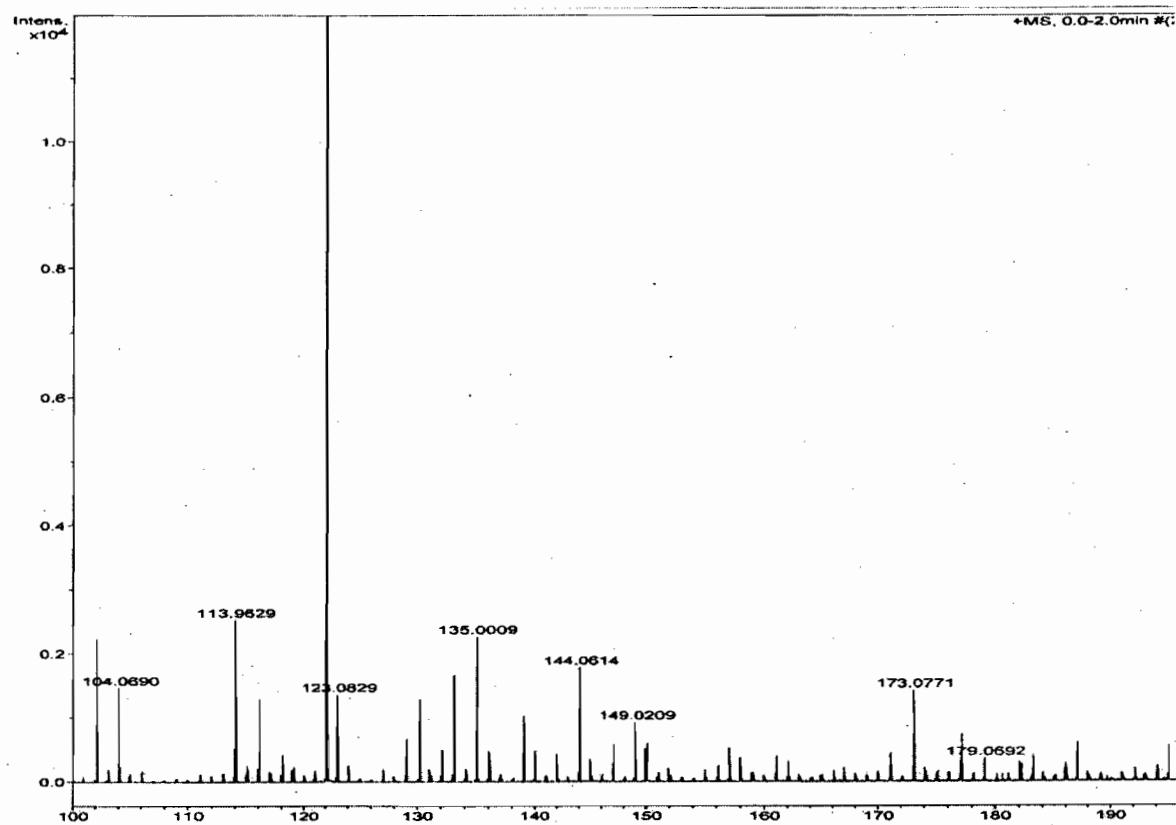
รูปที่ 24 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-5 (acetone- d_6)



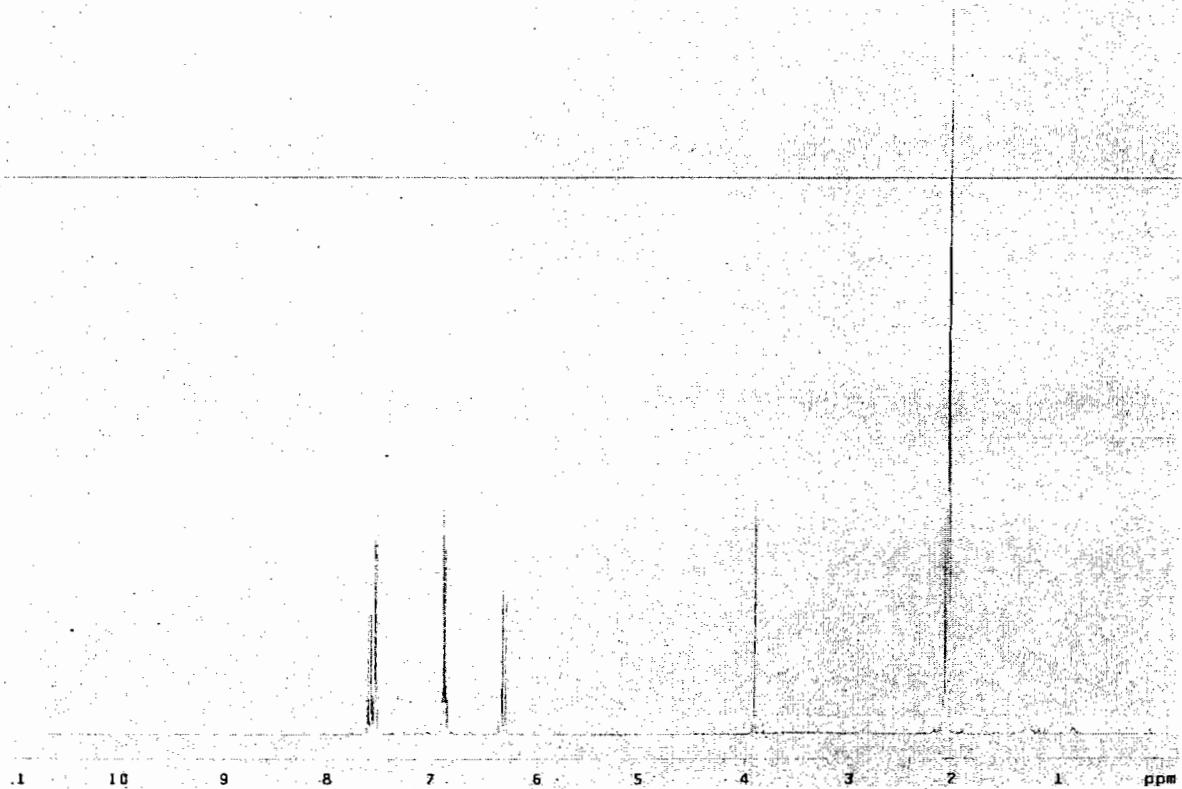
รูปที่ 25 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-5 (acetone- d_6)



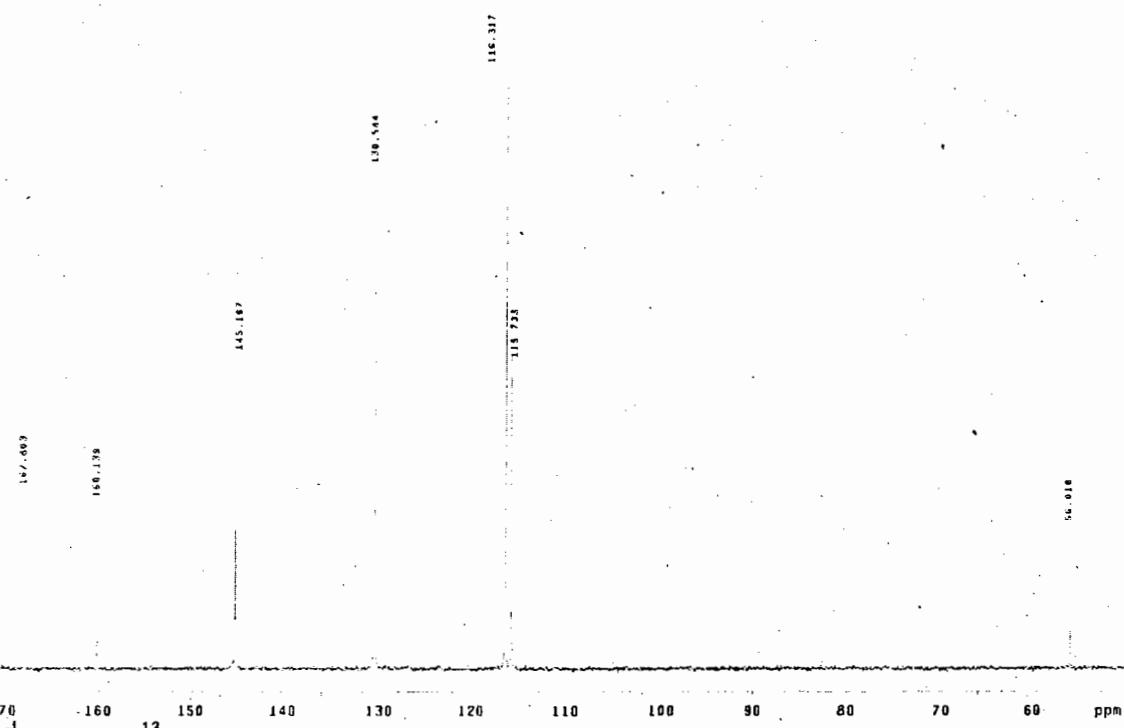
รูปที่ 26 The HMBC correlation of compound PS-5 (acetone- d_6)



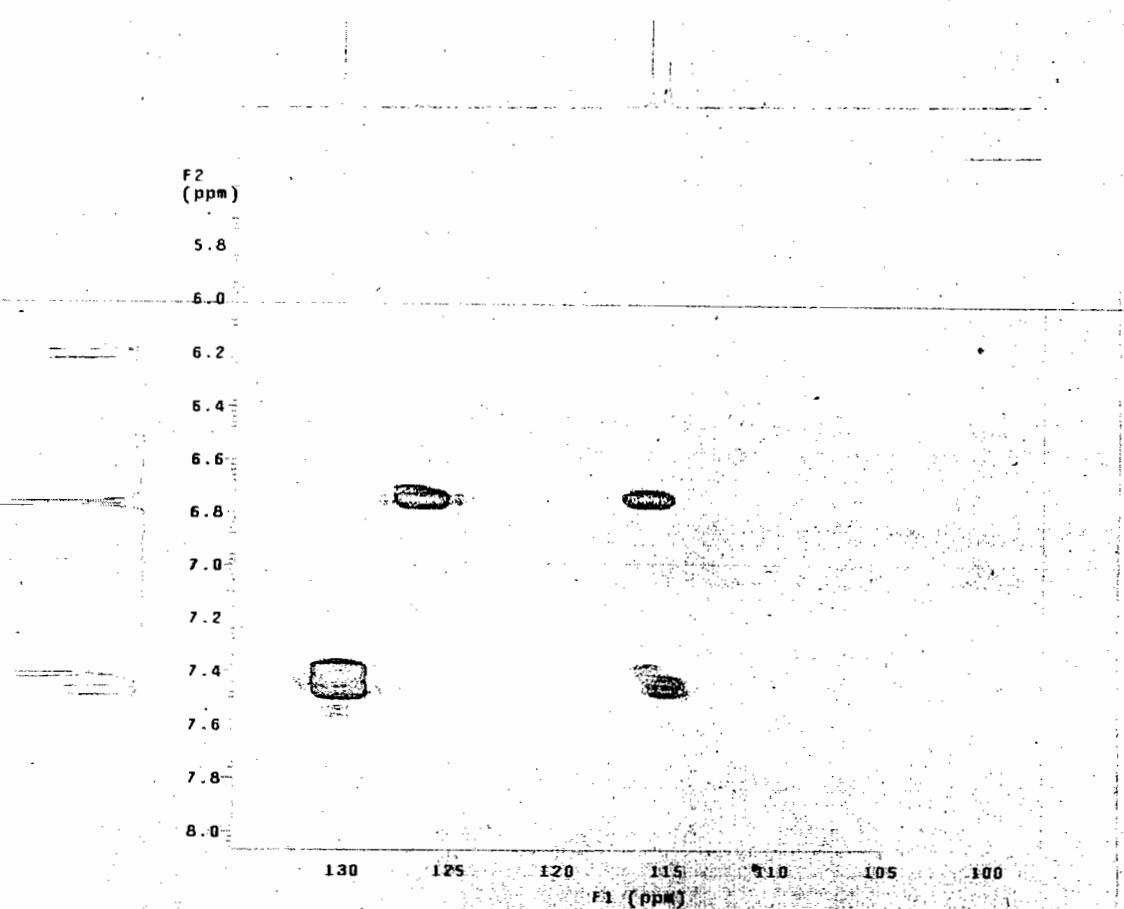
รูปที่ 27 The HREIMS mass spectrum of compound PS-6



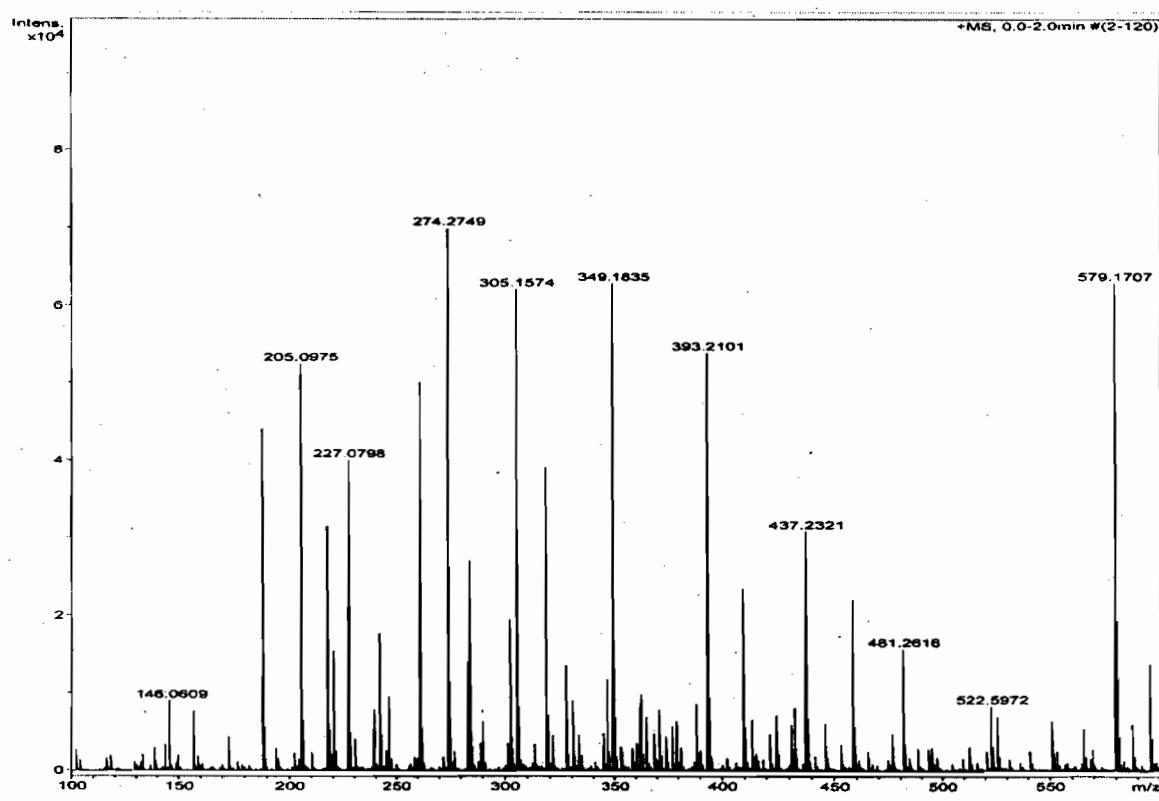
รูปที่ 28 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-6 (acetone- d_6)



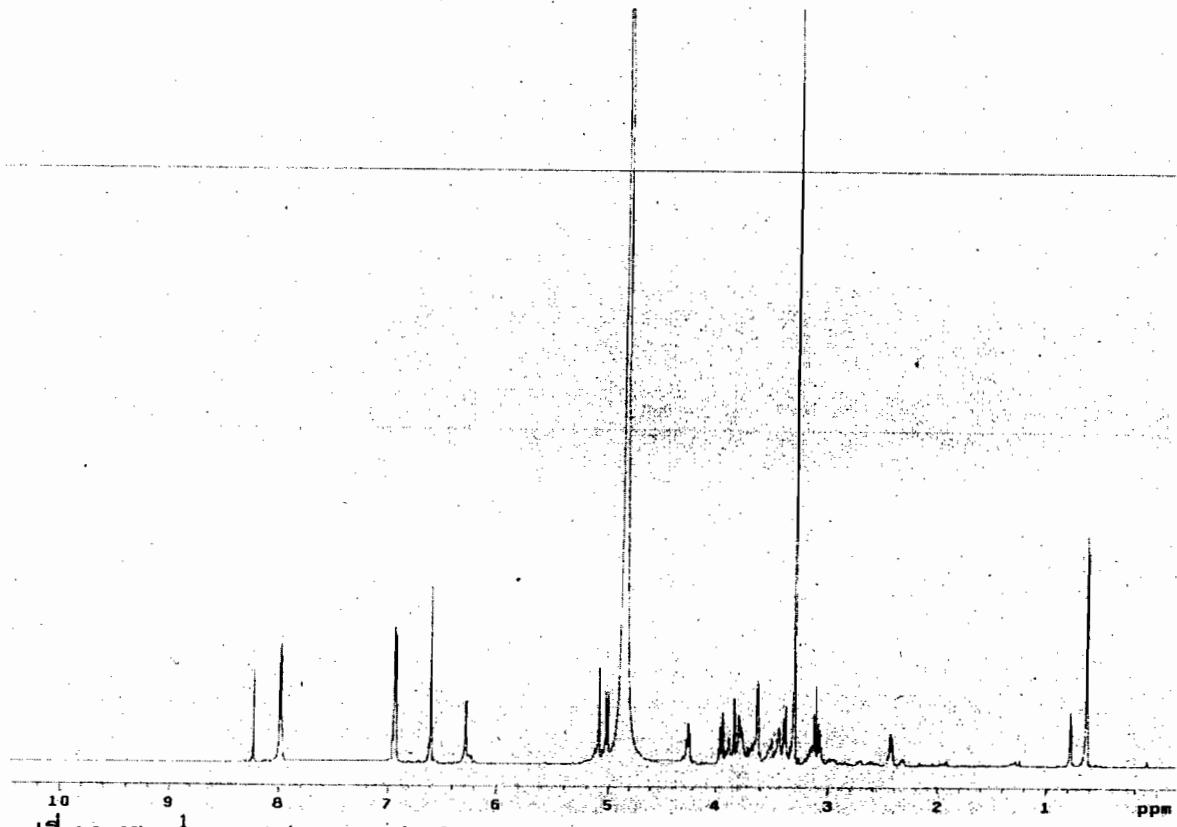
รูปที่ 29 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-6 (acetone- d_6)



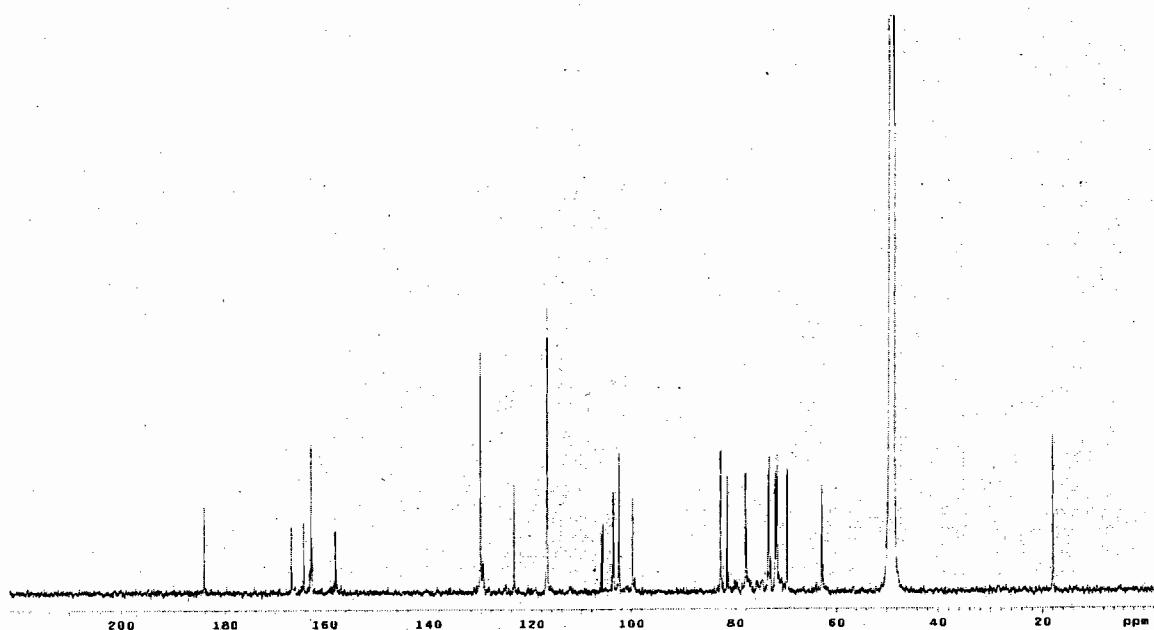
รูปที่ 30 The HMBC correlation of compound PS-6 (acetone- d_6)



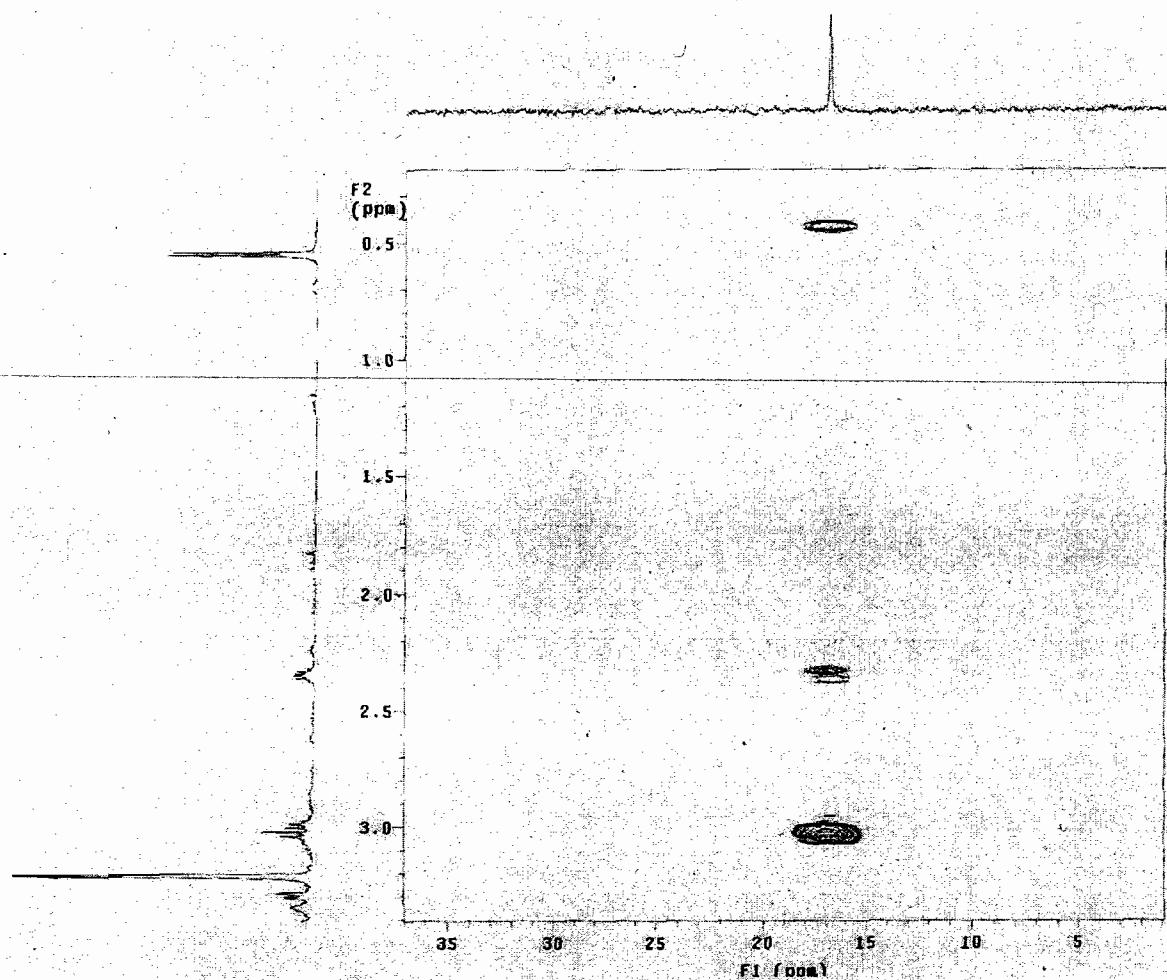
รูปที่ 31 The HREIMS mass spectrum of compound PS-7



รูปที่ 32 The ^1H NMR (500 MHz) of compound PS-7 (methanol- d_4)



รูปที่ 33 The ^{13}C NMR (125 MHz) of compound PS-7 (methanol- d_4)



รูปที่ 34 The HMBC correlation of compound PS-7 (methanol- d_4)

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา (Conclusion)

จากการนำใบของข้าพลู *P. sarmentosum* มาทำแยกสารจากนั้นศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยการใช้วิธีการทางสเปคโทรสโคปี และนำสารเหล่านั้นทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและฤทธิ์ต้านอนุมูล สารที่แยกได้ประกอบด้วยกลุ่มสาร aromatic alkenes, alkaloids และ flavonoid ได้แก่ α -asarone, 3-phenylpropanoyl pyrrole, 3-(4'-methoxyphenyl)propanoyl pyrrole, 1-nitrosoimino-2,4,5-trimethoxybenzene, 2'4'5'-trimethoxycinnamoyl pyrrolidine, *p*-methoxycinnamic acid และ isovitexin 2"-O- α -rhamnoside

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสของสารบริสุทธิ์จากข้าพลู พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นี้ได้ดีที่สุดคือ 1-nitrosoimino-2,4,5-trimethoxy benzene ที่ IC_{50} 3.80 μM

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ NO ของสารบริสุทธิ์จากข้าพลู พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ NO ได้ดีที่สุดคือ isovitexin 2"-O- α -rhamnoside ที่ IC_{50} 107.35 และ 97.96 μM ตามลำดับ

บรรณานุกรม
(Reference)

- เกษร นันทจิต, ขวัญชนก อารีย์วงศ์, จันทนี ถนอมศักดิ์เจริญ, จากรัตน์ ประชญ์วีระกุล. 2548. ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
ชุติตima ลี้มมทวาภิรัต. 2550. การรักษาโรคอัลไซเมอร์. วารสารไทยไภษัชยนิพนธ์, 1: 12-31.
นันทวน บุณยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2542. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน 3. บริษัทประชาชน จำกัด. กรุงเทพ.
นุตติยา วีระวัฒนชัย, ระวิวรรณ แก้วออมวงศ์. 2550. รายงานงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่องการติดต่อของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสจากพืชสมุนไพรในวงศ์พริกไทย.
ปัทมา ว่าพัฒวงศ์, ปราโมทย์ ประสาทกุล. 2548. ประชากรไทยในอนาคต.
<http://www.ipsr.mahidol.ac.th/IPSR/AnnualConference/Conferencell/Article/Article02.htm>
สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2550. ฐานข้อมูลผู้สูงอายุไทย. โรงพิมพ์ ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพ.
สุทธิพันธ์ จิตพิมลมakash. 2538. ภาวะสมองเสื่อม. วารสารศูนย์การศึกษาต่อเนื่องมหาวิทยาลัยขอนแก่น, 3: 12-13.
โอลกา วัชระคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พี. เอส. พรินท์. กรุงเทพ.
Alzheimer's association. 2009. Alzheimer's disease Facts and Figures. Alzheimer's and Dementia, 5: 234-270.
Ariffin, S. H. Z., Omar Wan, H. H W., Ariffin, Z. Z., Safian, M. F., Senafi, S., Wahab, R. M. A. 2009. Intrinsic anticarcinogenic effects of *Piper sarmentosum* ethanolic extract on a human hepatoma cell line. Cancer Cell International, 9: 6-14.
Amran, A. A., Zakaria, Z., Othman, F., Das, S., Al-Mekhlafi, H. M., Nordin, N. A. 2011. Changes in the vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 and c-reactive protein following administration of aqueous extract of *Piper sarmentosum* on experimental rabbits fed with cholesterol diet. Lipids in Health and Disease, 10: 2-9.
Bokesch, H. R., Gardella, R. S., Rabe, D. C., Bottaro, D. P., Linehan, W. M., McMahon, J. B., McKee, T. C. 2011. A new hypoxia inducible factor-2 inhibitory pyrrolinone alkaloid from roots and stems of *Piper sarmentosum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 59: 1178-1179.

- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N. 2005. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*, 92: 491-497.
- Ee, G. C. L., Lim, C. M., Lim, C. K., Rahmani, M., Shaari, K., Bong, C. F. J. 2009. Alkaloids from *Piper sarmentosum* and *Piper nigrum*. *Natural Product Research*, 23: 1416-1423.
- Estail, M. A., Suhaimi, F. H., Das, S., Fadzilah, F. M., Alhabshi, S. M., Shuid, A. N., Soelaiman I. N. 2011. *Piper sarmentosum* enhances fracture healing in ovariectomized osteoporotic rats: a radiological study. *Clinics (Sao Paulo)*, 66: 865-872.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W. 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 261-264.
- Kim, S. U., Kim, Y. S., Kim, D. K., Yang, J. W. 2012. Transition metal-free, NaOtBu-O₂-mediated one-pot cascade oxidation of allylic alcohols to α,β -unsaturated carboxylic acids. *Green Chemistry*, 14: 2996-2998.
- Kumaran, A., Joel karunakaran, R. J. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97:109-114.
- Likhitwitayawuid, K., Ruangrungsi, N., Lange, G. L., Decicco, C. P. 1987. Studies on Thai medicinal plants. Part V. Structural elucidation and synthesis of new components isolated from *Piper sarmentosum* (Piperaceae). *Tetrahedron*, 43: 3689-3693.
-
1988. α -asarone and asaronaldehyde in *Piper sarmentosum*. *Journal of the Sciences Society of Thailand*, 14: 77-79.
- Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., Shalaby, I. A., Ramirez, A., Nason, D., White, W. F. 2004. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 486: 9-17.
- Longo, F. M., Massa, S. M. 2004. Neuroprotective strategies in Alzheimer's disease. *NeuroRx*, 1: 117-27.

- Luger, P., Weber, M., Dung, N. X., Luu, V. T., Rang, D. D., Tuong, D. T., Ngo, P. H. 2002. The crystal structure of 3-(4'-methoxyphenyl)propanoyl pyrrole of *Piper lolot* C. DC. from Vietnam. *Crystal Research and Technology*, 37: 627-633.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14: 289-300.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., Perry, R. 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?. *Trends in Neurosciences*, 22: 273-280.
- Peungvicha, P., Thirawarapan, S. S., Temsiririrkkul, R., Watanabe, H., Kumar Prasain, J., Kadota, S. 1998. Hypoglycemic effect of the water extract of *Piper sarmentosum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 60: 27-32.
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- Prinz, S., Ringi, A., Huefner, A., Pemp, E., Kopp, B. 2007. 4 "-Acetylvitexin-2 "-O-rhamnoside, isoorientin, orientin, and 8-methoxykaempferol-3-O-glucoside as markers for the differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae). *Chemistry & Biodiversity*, 4: 2920-2931.
- Rao, M. N. A. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49: 105-107.
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J. 2007. Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 328-336.
- Rathmann K. L., Conner C. S. 2007. Alzheimer disease : clinical features, pathogenesis, and treatment. *The Annals of Pharmacotherapy*, 41: 1499-1504.
- Remington, R. A. 2009. Efficacy of a vitamin/nutriceutical formulation for moderate-stage to later-stage Alzheimer's disease: a placebo-controlled pilot study. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*, 24: 27-33.
- Ridtitid, W., Rattanaprom, W., Thaina, P., Chitrakarn, S., Sunghanich, M. 1998. Neuromuscular blocking activity of methanolic extract of *Piper sarmentosum* leaves in the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. *Journal of Ethnopharmacology*, 61: 135-142.

- Rukachaisirikul, T., Siriwattanakit, P., Sukcharoenphol, K., Wongvein, C., Ruttanaweang, P., Wongwattanavuch, P., Suksamrarn, A. 2004. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. Journal of Ethnopharmacology, 93: 173-176.
- Sabbagh, M. N., Farlowb, M. R., Relkinc, N., Beachd, T. G. 2006. Do cholinergic therapies have disease-modifying effects in Alzheimer's disease?. Alzheimer's and Dementia, 2: 118-125.
- Sim, K-M., Mak, C-N., Ho, L-P. 2009. A new amide alkaloid from the leaves of *Piper sarmentosum*. Journal of Asian Natural Products Research, 11: 757-760.
- Stoehr, J. R., Xiao, P. G., Bauer, R. 1999. Isobutylamides and a new (methylbutyl)amide from *Piper sarmentosum*. Planta Medica, 65: 175-177.
- Subramaniam, V., Adenan, M. I., Ahmad, A. R., Sahdan, R. 2003. Natural Antioxidants: *Piper sarmentosum* (Kadok) and *Morinda elliptica* (Mengkudu). Malaysian Journal of Nutrition, 9: 41-51.
- Tuntiwachwuttikul, P., Phansa, P., Pootaeng-on, Y., Taylor, W. C. 2006. Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*. Chemical & pharmaceutical bulletin, 54: 149-151.
- Ziemianin, A., Ronco, C., Dolé, R., Jean, L., Renard, P. Y., Lange, C. M. 2012. Screening of new huperzines-inhibitors of acetylcholinesterases by electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 70: 1-5.

ภาคผนวก

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

1. Acetylcholinesterase inhibitory activity of compounds from *Piper sarmentosum* roxb.

Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD- ACS ICSCT Symposium, March 4-5, 2014.

ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่วางแผน กิจกรรมที่ดำเนินการ ผลที่ได้รับ

กิจกรรมตามแผน	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. วางแผนการดำเนินงาน	1. วางแผนการดำเนินงาน	1.ได้แผนการดำเนินงาน
2.ศึกษาเอกสารทางวิชาการและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อเลือกวิธีวิจัย	2.ศึกษาเอกสารทางวิชาการและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อเลือกวิธีวิจัย	2.ได้วิธีวิจัยที่เหมาะสม
3. เก็บสมุนไพร เตรียมและการสักดสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย	3. เก็บสมุนไพร เตรียมและการสักดสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย	3. ได้สารสักดหยาบ
4. นำสารสักดหยาบไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	4. นำสารสักดหยาบไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	4. ได้สารสักดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ
5. แยกสารสักดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นส่วนสักดย่อย	5. แยกสารสักดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นส่วนสักดย่อย	5. ได้สารสักดย่อยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
6. แยกสารบริสุทธิ์จากสารสักดย่อย	6. แยกสารบริสุทธิ์จากสารสักดย่อย	6. ได้สารบริสุทธิ์
7. วิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องมือทางสเปคโตรสโคปี	7. วิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องมือทางสเปคโตรสโคปี	7. ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์
8. นำสารบริสุทธิ์ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ	8. นำสารบริสุทธิ์ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ	8. ได้สารบริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ
9. รวมรวมและวิเคราะห์ผลการทดลอง	9. รวมรวมและวิเคราะห์ผลการทดลอง	9. ได้ผลการทดลองและผลการวิเคราะห์ข้อมูล
10. จัดทำรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์	10. จัดทำรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์และผลงานวิชาการ	10. ได้รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์และเผยแพร่ผลงานวิชาการ

สรุปการใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. งบประมาณที่ได้รับจัดสรร ค่าสาธารณูปโภคและค่าตอบแทน

งบประมาณ	จำนวน (บาท)	ค่าสาธารณูปโภคและ ค่าตอบแทน	จำนวน (บาท)
งบประมาณที่ได้รับจัดสรร	666,600.00	ค่าสาธารณูปโภค	60,600.00
		ค่าตอบแทน	7,525.00
		รวม	68,125.00
		คงเหลืองบประมาณที่ ได้รับจริง	598,475.00

2. งบประมาณที่ได้รับจริงและค่าใช้จ่าย

งบประมาณ	จำนวน (บาท)	ค่าใช้จ่าย	จำนวน (บาท)
งบประมาณที่ได้รับจริง	598,475.00	หมวดค่าใช้สอย	352,204.00
		หมวดค่าวัสดุ	246,225.84
		รวม	598,429.84
		คงเหลือเงินคืน	45.16



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานเลขานุการ คณะเภสัชศาสตร์ โทร. 3605, 3609

ที่ ศธ 0529.11/ ๑๗๐๖।

วันที่ 25 พฤศจิกายน 2553

เรื่อง ขออนุมัติยืมเงินทุกรอบจ่ายโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2554

คงค้าง	17913
เดือนที่รับ	กันยายน 2553
เวลา	10:00 น.

เรียน อธิการบดี

ตามที่ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ได้อนุมัติงบประมาณในการดำเนินงาน โครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2554 เรื่อง สารที่มีฤทธิ์ขับยั่งเอนไขม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระจากช้าพถูจำนวน 336,600 บาท (-สามแสนสามหมื่นหกพันหกร้อยบาทถ้วน-) โดยมี ผศ.ดร.ระวีวรรณ แก้วอมดวงค์ สังกัดคณะเภสัชศาสตร์ รับผิดชอบเป็นผู้อำนวยการ โครงการวิจัย นั้น

ในการนี้ คณะเภสัชศาสตร์ ได้รับขออนุมัติยืมเงินทุกรอบจ่าย จำนวน 30% จากงบประมาณที่ได้รับจัดสรร จำนวนเงิน 100,980 บาท (-หนึ่งแสนเก้าร้อยแปดสิบบาทถ้วน) จากเงินรายได้มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี สำหรับเป็นค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน โครงการวิจัยดังกล่าว รายละเอียดเอกสารที่ส่งมาด้วย ที่แน่นใจว่าจะสามารถนำเงินไปใช้จ่ายได้ในนาม เงินทุกรอบจ่ายดังนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ

ที่อยู่บ้านเลขที่ ๑๘๙ ถนนราษฎร์ฯ แขวงหนองคันทร์
เขตหนองคันทร์ กรุงเทพฯ ๑๐๔๐๐
โทรศัพท์ ๐๒- ๑๒๓๔๕๖๔ - ๑๐๔๙๘๐
ต่อ ๑๒๓๔๕๖๔ โทรสาร ๐๒- ๑๒๓๔๕๖๔

๑๐ ๑๐.๑๑.๒๕๕๓

ลงนาม: ผู้จัดการ
(ผศ.ดร.ระวีวรรณ แก้วอมดวงค์)

ที่

คณบดี: ดร.สังฆ์ ธรรมรงค์
หน้าที่: ผู้จัดการ
หลักการ: ภาคบังคับ - ภาคผนวก
หมายเหตุ:

รักษาราชการแทนคณบดีคณะเภสัชศาสตร์

เรียน อธิการบดี

ตรวจสอบแล้ว ไม่มีหนังสือหาระ และ
ยังไม่รับแจ้งการจัดสรรเงินโครงการวิจัย
ประจำปีงบประมาณ 2554 จากกองแผนงาน
ดังนั้น ขออนุมัติยืมเงินรายได้มหาวิทยาลัย
เป็นเงิน 100,980.- บาท (หนึ่งแสนเก้าร้อย-
แปดสิบบาทถ้วน)

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

02/11/53
10/11/53

ลงนาม: ผู้จัดการ
(ผศ.ดร.ระวีวรรณ แก้วอมดวงค์)

ลงนาม: ผู้จัดการ

ลงนาม: ผู้จัดการ

ลงนาม: ผู้จัดการ



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานเลขานุการ คณะเภสัชศาสตร์ โทร 3605, 3609

ที่ ศธ 0529.11/ ๒๕๗๗

วันที่ ๗ มีนาคม ๒๕๕๔

เรื่อง ขออนุมัติยืมเงินท่องจ่ายโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔

เรียน คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ตามที่ ข้าพเจ้าได้รับการสนับสนุนงบประมาณ หมวดเงินอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๔ จำนวน ๓๓๖,๖๐๐.- บาท (- สามแสนหกหมื่นบาทถ้วน-) ในการดำเนินงาน โครงการวิจัย เรื่อง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระจากชาพลู แล้วนั้น

ในการนี้ข้าพเจ้าได้รับขออนุมัติยืมเงินท่องจ่าย งวดที่ ๑ จำนวนเงิน ๖๗,๓๒๐ บาท (- หกหมื่นเจ็ดพันสามร้อยยี่สิบบาทถ้วน) จากหมวดเงินอุดหนุนทั่วไป คณะเภสัชศาสตร์ สำหรับเป็นค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน โครงการวิจัยดังกล่าว รายละเอียดเอกสารที่ส่งมาด้วย

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ

อุดหนุนทั่วไปคณะเภสัชศาสตร์	นางสาวระวิวรรณ แก้วอมคงวงศ์
หมวดรายจ่าย ทุนการศึกษา (๙๙๑)	(ห้ามลบ)
ขออนุมัติที่เบิกจ่าย ๖๐-๐๐๖-๐๐๑/๕๔ ๑.๓.๙๕	หัวหน้าโครงการวิจัย
ขออนุมัติเบิกจ่าย ๑๘๗๘๕	๐/๔๖๓/๘๖๐/๗๐

ระวิวรรณ แก้วอมคงวงศ์
(นางสาวระวิวรรณ แก้วอมคงวงศ์)

หัวหน้าโครงการวิจัย

๐/๔๖๓/๘๖๐/๗๐

(นางสาวจารยา อินทรหนองไฝ)

เรียน คณบดี

หัวหน้ากลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม

เพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ เงินยืมท่องจ่ายเงินอุดหนุนทั่วไป โครงการวิจัย ปีงบประมาณ ๒๕๕๔ เรื่อง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระจากชาพลู งวดที่ ๑ จำนวน ๖๗,๓๒๐.- บาท (- หกหมื่นเจ็ดพันสามร้อยยี่สิบบาทถ้วน-) ดังรายละเอียดเอกสารที่แนบมาพร้อมนี้

๑๐ มี.ค. ๕๔

(นางสาวชญญาบุช ช่วงชิง)

นักวิชาการเงินและบัญชี ชำนาญการพิเศษ

อุ๊งมี.ค.

๑๐ มี.ค.

๑๑/๓/๕๔

(ผศ.ดร.ชุดินันท์ ประสิทธิ์ภูริปวิชชา)

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานเลขานุการ คณะเภสัชศาสตร์ โทร 3605, 3609

ที่ ศธ 0529.11/ ๗๓๙๐

วันที่ ๒๗ กรกฎาคม ๒๕๕๔

เรื่อง ขออนุมัติยืมเงินทุกรายจ่ายโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔ งวดที่ ๒

เรียน คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ตามที่ ข้าพเจ้าได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงาน โครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔ เรื่อง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระจากช้าพลู จำนวน 336,600 บาท (-สานแสนาสามหมื่นหกพันกรรไทรบาทถ้วน-) โดยได้รับอนุมัติเงินงวดที่ ๒ จำนวน 168,300 บาท (หนึ่งแสนหกหมื่นแปดพันสามร้อยบาทถ้วน) แล้วนั้น

ในการนี้ข้าพเจ้าได้รับอนุมัติยืมเงินทุกรายจ่าย งวดที่ ๒ โดยหักค่าสาธารณูปโภคค่าฯ จำนวนเงิน 15,300 บาท ค่าสาธารณูปโภคมหาวิทยาลัยฯ จำนวน 15,300 บาท ค่าตอบแทนนักวิจัยจำนวน 3,825 บาท คงเหลือรับจริง จำนวนเงิน 133,875 บาท (หนึ่งแสนสามหมื่นสามพันแปดครึ่งบาทถ้วน) จากหมวดเงินอุดหนุนทั่วไป คณะเภสัชศาสตร์ สำหรับเป็นค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน โครงการวิจัยดังกล่าว รายละเอียดเอกสารที่ส่งมาด้วย

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ

คณะเภสัชศาสตร์

หน่วยงาน..... โรงพยาบาล จ.ราชบุรี

บัญชีหัก扣款 ล.เดบต์ ๐๑๖-๐๐๔/๙๔ ๐.๑๙.๘๘

ขออนุมัติเบิกจ่าย ล.เดบต์.....

นายวรวิทย์ ใจกลาง
(ผศ.ดร.รัตน์ ใจกลางวงศ์)

หัวหน้าโครงการ

นางสาวชลลัคดา พิชญาจิตติพงษ์

เรียน คณบดี

รักษาราชการแทนหัวหน้ากลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม
เพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติการยืมเงิน

โครงการวิจัย งวดที่ ๒ เรื่อง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์

อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระจากช้าพลู

จำนวน 133,875.(หนึ่งแสนสามหมื่นสามพันแปดครึ่ง-

บาทถ้วน)ดังเอกสารและสัญญาที่แนบมาพร้อมนี้

อนุมัติ

ลงนาม

๒๙/๖/๕๗

(ผศ.ดร.ชุตินันท์ ประเสริฐธิรบุรี)

กลับเด็กคณะเภสัชศาสตร์

นางสาวเกศ

(นางสาวเกศ บุศราลี)

นักวิชาการเงินและบัญชี

วิจัย



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานเลขานุการ คณะเภสัชศาสตร์ โทร 3605, 3609

ที่ศธ 0529.11/ ๒๓๖๙

วันที่ 20 มีนาคม 2555

เรื่อง ขออนุมัติยืมเงินท่องจ่ายโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2555

เรียน คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ตามที่ ข้าพเจ้าได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2555 เรื่อง สารที่มีฤทธิ์ขับยั่งเอน ไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและด้านอนามูลอิสระจากชาพลู จำนวน 330,000 บาท (-สามแสนสามหมื่นบาทถ้วน-) นั้น

ในการนี้ข้าพเจ้าได้รับอนุมัติยืมเงินท่องจ่าย งวดที่ 1 จำนวนเงิน 159,800 บาท (-หนึ่งแสนห้าหมื่นเก้าพันแปดร้อยบาทถ้วน) จากหมวดเงินอุดหนุนทั่วไปคณะเภสัชศาสตร์ สำหรับเป็นค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานโครงการวิจัยดังกล่าว รายละเอียดเอกสารที่ส่งมาด้วย

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ

ธัญญา (เดชมนคง)
(นางสาวรุ่งรัตน์ แก้วอนดวง)

หัวหน้าโครงการ

อุดหนุนทั่วไปคณะเภสัชศาสตร์
หมวดรายจ่าย ทุนการศึกษา ๑๐๘๑
ขออนุมัติหลักการ ลำดับที่ ๖๐-๗๐
ขออนุมัติเบิกจ่าย ลำดับที่

๖-๐๙/๕๕ ๐.๓.๒๙

ธัญญา
(นางสาวกฤสุมา จิตแสง)

หัวหน้ากลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม

เรียน คณบดี

เพื่อโปรดพิจารณาการขออนุมัติยืมเงินท่องจ่ายโครงการวิจัยสารที่มีฤทธิ์ขับยั่งเอน ไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและด้านอนามูลอิสระจากชาพลู ปี 2555 งวดที่ 1 จำนวน 159,800.- บาท (-หนึ่งแสนห้าหมื่นเก้าพันแปดร้อยบาทถ้วน-) จากบัญชีเงินอุดหนุนทั่วไปคณะเภสัชศาสตร์ ดังเอกสารที่แนบพร้อมนี้

ธัญญา
๒๑/๓/๕๕

(ผศ.ดร.ธุคิจวงศ์ ประคิพธีกรริปรีชา)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ธัญญา
๒๐/๓/๕๕
(นางสาวธัญญา ช่วงชิง)

นักวิชาการเงินและบัญชี ชำนาญการพิเศษ

วิจัย



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานเลขานุการ คณะเภสัชศาสตร์ โทร 3605, 3609

ที่ ศธ 0529.11/ ๕๙๔๒

วันที่ ๑๘ กรกฎาคม ๒๕๕๕

เรื่อง ขออนุมัติยืมเงินครองจำย โครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕ งวดที่ ๒

เรียน คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ตามที่ ข้าพเจ้าได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕ เรื่อง สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระจากชาพสู จำนวน ๓๓๐,๐๐๐ บาท (-สามแสนสามหมื่นบาทถ้วน-) โดยได้รับอนุมัติเงินงวดที่ ๒ จำนวน ๑๗๐,๒๐๐ บาท (หนึ่งแสนเจ็ดหมื่นสองร้อยบาทถ้วน) แล้วนั้น

ในการนี้ข้าพเจ้าได้รับขออนุมัติยืมเงินครองจำยงวดที่ ๒ โดยหักค่าสาธารณูปโภคค่าเดินทาง จำนวน ๑๕,๐๐๐ บาท ค่าสาธารณูปโภคมหาวิทยาลัยฯ จำนวน ๑๕,๐๐๐ บาท ค่าตอบแทนนักวิจัยจำนวน ๓,๗๐๐ บาท คงเหลือรับจริง จำนวนเงิน ๑๓๖,๕๐๐ บาท (หนึ่งแสนสามหมื่นหกพันห้าร้อยบาทถ้วน) จากหมวดเงินอุดหนุนทั่วไป คณะเภสัชศาสตร์ สำหรับเป็นค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานโครงการวิจัยดังกล่าว รายละเอียดเอกสารที่ส่งมาด้วย

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุมัติ

คณะเภสัชศาสตร์

หมวดรายจ่าย อุดหนุนทั่วไป (วิจัย) งวดที่ ๒
ขออนุมัติหลักการ ลำดับที่ ๖๐-๗๐๖-๐๐๓/๕๕ อ.ว.ก.
ขออนุมัติเบิกจ่าย ลำดับที่ ๖๐-๗๐๖-

เรียน คณบดี

เพื่อโปรดพิจารณาการขออนุมัติยืมเงินโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๕ “สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและต้านอนุมูลอิสระจากชาพสู” งวดที่ ๒ จำนวน ๑๓๖,๕๐๐.-บาท (-หนึ่งแสนสามหมื่นหกพันห้าร้อยบาทถ้วน-) ดังเอกสารแนบทรรายนี้

(นางสาวชุณยุกานุช ช่วงชิง)

นักวิชาการเงินและบัญชี ชำนาญการพิเศษ

รุจิรา พันธุ์วงศ์
(นางสาวรุจิรา พันธุ์วงศ์)

หัวหน้าโครงการ

(นางสาวพรพรรณ อกนิษฐากิชาติ)

หัวหน้ากลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม

อนุมัติ
ดำเนินการตามระเบียบต่อไป

(ผศ.ดร. ชุตินันท์ ประสิตกิจปรีชา)

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

๒๖/๗/๕๕

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ นางสาวรำวีวน
Miss Rawiwun
นามสกุล แก้วอมดาววงศ์
Kaewamatawong
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 349900361 88 3
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสารและไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อำเภอวารินชำราบ
จังหวัดอุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 045-353600, 353670
โทรสาร 045-288384
E-mail address: rawiwun@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ ปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2546	เอก	วท.ด.	เภสัชเคมีและ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2540	โท	ก.ม.	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2537	ตรี	ก.บ.	เภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยรังสิต	ไทย

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (แตกต่างจากเดิม)

Taxonomy of Thai medicinal plants

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศไทย โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละหัวข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1 The screening of free radical scavenging, antioxidative and tyrosinase inhibitory activities of Ubonratchathani medicinal plants

7.2.2 การสกัดแยกและศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร flavonoids ในสมุนไพรพื้นบ้านจังหวัดอุบลราชธานี วงศ์ Leguminosae

7.2.3 การจำแนกชนิด การสกัด แยกสารบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของพืชสมุนไพร *Curcuma cf. comosa* Roxb.

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

7.3.1 Likhitwidayawuid, K., Kaewamatawong, R., Ruangrungsi. 2005. Mono- and biflavonoids from *Ochna integerrima*. Biochemical Systematics and Ecology., 33: 527-536.

แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

7.3.2 ระวีวรรณ แก้วอมวงศ์และทรงพร จึงมั่นคง. 2549. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPHและปริมาณสารฟินอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. วารสารวิชาการม.อบ., 8: 76-88.
แหล่งทุน: เงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

7.3.3 Kaewamatawong, R., Likhitwidayawuid, K., Ruangrungsi, N. 2007. Chemical constituents of *Polyalthia parviflora*. Journal of Natural Medicines., 61: 349-350.
แหล่งทุน: กระทรวงศึกษาธิการ

7.3.4 Kaewamatawong, R., Kitajima, M., Kogure, N., Takayama, H. 2008. Flavonols from *Bauhinia malabarica*. Journal of Natural Medicines. 62: 364-365.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

7.3.5 Kaewamatawong, R., Boonchoog, P., Theerawatanasuk, N. 2009. Diarylheptanoids from *Curcuma comosa*. Phytochemistry Letters. 2: 19-21.
แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

7.3.6 Werawatanachai, N, Kaewamatawong, R. 2010. Chemical constituents from *Parinari amamense*. Biochemical Systematics and Ecology,
แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

7.3.7 นุตติยา วีระรัตนชัย และ ระวีวรรณ แก้วอมวงศ์. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนของพลาโนนอยด์จากกระดังงาจีน (Free Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibitory activities of flavonoids from *Artabotrys hexapetalus*). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 มกราคม – มีนาคม 2555.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

7.3.8 Jamnian Somanawat, Nusorn Talangsri, Saijai Deepolngam, Rawiwun Kaewamatawong. 2012. Flavonoid and Megastigmane Glycosides from *Artabotrys hexapetalus* Leaves. Biochemical Systematics and Ecology. 44: 124-127.
แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) น.ส. นุตติยา นามสกุล วีระวันชัย
(ภาษาอังกฤษ) Miss Nuttiya Werawattanachai
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 349900018 13 5
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 7 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสารและอีเมลล์ (e-mail)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สำนักวารินชำราบ
จังหวัดอุบลราชธานี 34190
โทรศัพท์ 045-353600, 353670
โทรสาร 045-288384
E-mail address: nuttiya_w@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ การศึกษา	ระดับ ปริญญา	ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ
2550	เอก	วท.ด.	เภสัชศาสตร์ชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2538	โท	วท.ม.	เภสัชวิทยา	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2535	ตรี	พย.บ.	พยาบาลศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย

6. สาขาวิชานักวิจัย (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ:

ประเทศไทย

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศไทย โดยระบุสถานภาพ
ในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละหัว
ข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย:

การตรวจกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase จากพืชสมุนไพรในวงศ์ Piperaceae

Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors from Medicinal Plants Genus Piperaceae

เงินทุนรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

7.3.1. Suttipana N., Prasitpuriprecha C., Werawattanachai N., and Intaranongpai J. The Uses of Medicinal Plants in Ubon Rajathanee. Journal of Ubonrajathanee University. 6(2) 2004: 118-138.

แหล่งทุน: เงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

7.3.2. Bhatarabenjaporn S., Werawattanachai N., and Suttipana N. Knowledge of Drug Utilization of People Using Services in Drug Stores of Ubon Rajathanee Province. Journal of Ubonrajathanee University. 6(2) 2004: 118-138.

แหล่งทุน: เงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

7.3.3 Werawattanachai N., Towiwat P., Unchern S., and Maher TJ.

Neuropharmacological profile of tetrahydrofuran in mice. Life Sciences. 80(18) 2007: 1656-1663.

แหล่งทุน: กระทรวงศึกษาธิการ

7.3.4 Werawattanachai, N, Kaewaamatawong, R. 2010. Chemical constituents from Parinari anamense. Biochemical Systematics and Ecology,

แหล่งทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

7.3.5 นุตติยา วีระวันชัย และ ระวีวรรณ แก้วอมดาวร์. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซีนазของฟลาโวนอยด์จากกระดังเจ็น (Free Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibitory activities of flavonoids from *Artobotrys hexapetalus*). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 มกราคม – มีนาคม 2555.

แหล่งทุน: งบประมาณแผ่นดิน

