รายงานการวิจัย

"สารสำคัญและการประกันคุณภาพอาหารเสริมจากกระชายดำ"

Active Constituents and Quality Assessment of Food Supplements from *Kaempferia parviflora*

ประจำปีงบประมาณ 2552

หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

คณะผู้วิจัย:

รศ.ดร. สันติ ทิพยางค์ (หัวหน้าโครงการ)

ผศ.ดร. วรินทร ชวศิริ

ผศ.ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

อ.ดร. พัฒทรา สวัสดี

ผศ.ดร. ไพฑูรย์ รัชตะสาคร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
1.บทนำ	
1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	2
1.3 วัตถุประสงค์	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. เนื้อเรื่อง	4
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & method)	4
2.1.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัด	4
2.1.2 การสังเคราะห์ไนโตรฟลาโวน อะมิโนฟลาโวน และเอไมด์ฟลาโวน	4
2.1.2.1 การสังเคราะห์ไนโตรฟลาโวน (สาร 1-2s)	4
2.1.2.2 การสังเคราะห์อะมิโนฟลาโวน (สาร 3-4s)	6
2.1.2.3 การสังเคราะห์เอไมด์ฟลาโวน (สาร 5-6s)	6
2.1.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส	
2.1.4. การเตรียมสารสำหรับการทดสอบ	7
2.1.4.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	7
2.1.4.2 การเตรียมเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	8
2.1.4.3 การเตรียมเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส	8
2.1.4.4 การเตรียมสารละลาย substrate	8
2.1.4.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ด้วยวิธี microplate[12]	8
2.1.5 การประเมินคุณภาพกระชายดำผง ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry)	9

2.1.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณสาร 6 และ 7 จากสิ่งสกัดกระชายดำผง ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) 9
2.1.6 การเตรียมกระชายดำผง โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) 10
2.2 ผลการวิจัย 10
3. วิจารณ์ผลการทดลอง 13
4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้ 14
ภาคผนวก

บทคัดย่อ

ฟลาโวนอยด์ 10 ชนิด ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ (KD) เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ด้วยวิธี microplate assay พบว่า สาร **7** (5,7-dimethoxy-flavone) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสค่อนข้างสูง เท่ากับ 84.6% ส่วนสาร **6** (5,7,4′-trimethoxy-flavone) มีฤทธิ์ยับยั้งเพียง 46.2% นอกจากนี้ยังได้สังเคราะห์สารอนุพันธุ์ของฟลาโวน 6 ชนิด(**1-6s**)คือ 3′-nitroflavone (**1s**), 4′-nitroflavone (**2s**), 3′-aminoflavone (**3s**), 4′-aminoflavone (**4s**), 3′-acetamidoflavone (**5s**) และ 4′-acetamidoflavone (**6s**) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสของสารสังเคราะห์เหล่านี้ พบว่า ปริมาณการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ของสาร **1s** จะให้เปอร์เซนต์การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสสูงสุด เท่ากับ 72.58 % ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส พบว่าสาร **5s** จะให้เปอร์เซนต์การยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสสูงสุด เท่ากับ 69.45% ในการแปรรูปกระชายดำผง นำกระชายดำแห้งมาบดให้เป็นผงแล้วสกัดด้วยสารละลายเมทานอลในน้ำ 0% 1% 5% และ 50% จากนั้นระเหยเอาเมทานอลออกภายใต้สุญญากาศ ทำให้เป็นผงโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าในสิ่งสกัดที่ได้พบเฉพาะสาร**7**เท่านั้นโดยได้ปริมาณเท่ากับ0 69.3 98.4 และ 245.3มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่างตามลำดับ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการสกัดด้วยเมทานอลในน้ำ50% จะให้ปริมาณสาร **7** มากกว่าแต่จะดูดความชื้นเมื่อวางทิ้งไว้

Abstract

Ten (**1–10**) of isolated flavonoids from the rhizomes extract of *Kaempferia parviflora* (Krachaidum; KD) were examined for butyrylcholinesterase inhibition activity using microplate assay. Compounds **7** (5,7-dimethoxyflavone) and **6** (5,7,4′-trimethoxyflavone) showed 84.60 and 46.2% inhibition at dose level of 0.1 mg/mL, respectively. Furthermore, 3′-nitroflavone (**1s**), 4′-nitroflavone (**2s**), 3′-aminoflavone (**3s**), 4′-aminoflavone (**4s**), 3′-acetamidoflavone (**5s**) and 4′-acetamidoflavone (**6s**) were synthesized. Compound **1s** showed the highest acetylcholinesterase inhibition 72.58%, while compound **5s** showed the highest butyrylcholinesterase inhibition 69.45% at dose level of 0.1 mg/mL.

For KD freeze-dried powder, the air-dried rhizomes of KD were powdered and extracted with 0%,1%, 5% and 50% of MeOH in water and removed the MeOH under vacuuo . These extracts were then converted into powder form by freeze drying.

The GC method was validated to quantification of flavonoids (**6** and **7**) in KD freeze-dried powder. Only flavonoid **7** was found in these extracts. The yields were 0, 69.3, 98.4 and 245.3 mg/g , respectively. In addition, the freeze-dried powder from 50% MeOH in water extract was hygroscopic.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน จากแผนงานวิจัย "นวัตกรรมเพื่อยกระดับคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหารสู่โครงสร้างเศรษฐกิจยุคใหม่" ประจำปีงบประมาณ 2552 ประเภทผลงานวิจัยเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยี ที่ให้การสนับสนุนด้านทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส	11
2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสของอนุพันธ์ฟลาโวนสังเคราะห์ (สาร **1-6s**)	12

สารบัญรูป

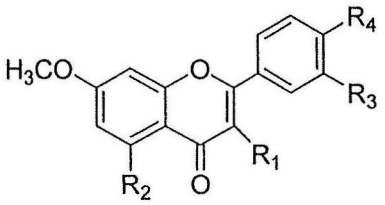
รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างของฟลาโวนที่แยกได้ (**1-10**)	11
2 โครงสร้างของอนุพันธ์ฟลาโวนสังเคราะห์ (สาร **1-6s**)	12
3 การสกัดกระชายดำผง ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง(freeze-dry) ด้วยสารละลายเมทานอลในน้ำ 0%(ก) 1%(ข) 5%(ค) และ 50%(ง)	13
ก-1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (สาร **1-10**) โดยเครื่อง GC	16
ก-2 โครมาโทแกรมของสิ่งสกัดจากกระชายดำผงที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล-น้ำ (1:99)) เพื่อวิเคราะห์สาร **6** และ **7** โดยเครื่อง GC	17
ก-3 โครมาโทแกรมของสิ่งสกัดจากกระชายดำผงที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล-น้ำ (5:95)) เพื่อวิเคราะห์สาร **6** และ **7** โดยเครื่อง GC	18
ก-4 โครมาโทแกรมของสิ่งสกัดจากกระชายดำผงที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล-น้ำ (50:50)) เพื่อวิเคราะห์สาร **6** และ **7** โดยเครื่อง GC	19

1. บทนำ

1.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทยมีพืชที่เรียกว่ากระชายอยู่ 3 ชนิด คือ กระชายเหลือง กระชายแดงและกระชายดำ กระชายเหลืองและกระชายแดง เป็นพืชจำพวกเดียวกัน แต่เป็นพืชต่างชนิดกันและมีฤทธิ์ทางยาต่างกันเล็กน้อย โดยกระชายแดงจะมีกาบใบสีแดงเข้มกว่ากระชายเหลือง ส่วนกระชายดำเป็นพืชวงศ์ Zingiberaceae เช่นกันแต่อยู่ในสกุลเดียวกับเปราะหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora*

กระชายดำ เป็นพืชล้มลุกมีเหง้าใต้ดิน เนื้อในเหง้าอาจเป็นสีม่วงหม่นหรือสีดำ มีกลิ่นฉุนและแรง เป็นพืชสมุนไพร โดยเหง้าใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อ จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงทางวิชาการที่ผ่านมาของกระชายดำ[1,2,3] พบว่า องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารเหล่านี้ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า 5,7-dimethoxyflavone มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflamatory activity) เทียบได้กับยามาตรฐานหลายชนิด เช่น แอสไพริน ไฮโดรคอร์ติโซน สาร 5,7,4′-trimethoxyflavone และ 5,7,3′,4′-tetramethoxyflavone แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium falciparum* ที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย และยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์อื่นๆ แสดงฤทธ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* และ Mycobacterium ได้ด้วย แต่สารเหล่านี้ไม่พบว่ามีสารใดทำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ[4] นอกจากนี้ ยังพบว่า สารสกัดเอทานอลของกระชายดำมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดแดงใหญ่ และการหดเกร็งของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูขาว[5] และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของคน



Compound	R_1	R_2	R_3	R_4
1	OCH_3	OH	H	H
2	H	OH	H	H
3	OCH_3	OH	H	OCH_3
4	H	OH	H	OCH_3
5	OCH_3	OH	OCH_3	OCH_3

จากผลการทดสอบเบื้องต้น พบว่า สิ่งสกัดของเหง้ากระชายดำ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ โดยฤทธิ์ดังกล่าวนี้ยังไม่เคยมีผู้ใดเคยทำการศึกษามาก่อน ดังนั้น การ ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเหง้ากระชายดำ เป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ง่ายในประเทศไทย และเป็นที่นิยมบริโภคกันของคนไทย นอกจากนั้นการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในผลิตภัณฑ์และอาหารเสริมจากกระชายดำ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีคุณภาพและทำให้ผลิตภัณฑ์ของไทยมีมาตรฐานสากล

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งอุดมไปด้วยพืชพันธุ์นานาชนิด บางชนิดเป็นสมุนไพร สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคหรือใช้เป็นอาหารเสริมได้ จากการศึกษาเบื้องต้นของหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเบื้องต้นกับสิ่งสกัดสมุนไพร 50 ชนิด ด้วยวิธี TLC assay[6,7] พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรหลายชนิดแสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจ รวมทั้งสิ่งสกัดจากเหง้ากระชายดำ *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker จึงได้เลือกสิ่งสกัดสมุนไพรจากกระชายดำ ศึกษาหาสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่พบบ่อยในกลุ่มโรคผิดปกติของสมอง " dementia" ที่มีการถดถอยหน้าที่ของสมอง ไม่สามารถจดจำเหตุการณ์ที่ผ่านมาได้ ความจำเสื่อม มีปฏิกิริยาตอบสนองแปลกๆ หรือไม่สามารถควบคุมอารมณ์ตนเองได้ มักพบในกลุ่มคนสูงอายุ คนที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ จะมีการสูญเสียพื้นที่ของสมองในส่วนของการควบคุมความคิด ความจำและการเรียบเรียงภาษาพูด และไม่สามารถปฏิบัติงานได้ตามปกติ

สถิติที่แพทย์ได้จากการตรวจรักษาโรคอัลไซเมอร์ แสดงให้เห็นว่า 1 ใน 20 ของคนที่มีอายุ 75-84 ปี จะป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ และ 1 ใน 5 ของคนที่มีอายุเกิน 85 ปี ก็จะเป็นโรคชนิดนี้เช่นกัน ส่วนคนที่อยู่ในวัย 40-70 ปี สถิติการเป็น คือ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศตวรรษก่อนหน้านี้ประชากรโลกน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์มีอายุเกิน 65 ปี ณ วันนี้ประชากร 7 เปอร์เซ็นต์ มีอายุเกิน 65 ปี และอีก 50 ปี 15-20 เปอร์เซ็นต์ของประชากรโลกจะมีอายุเกิน 65 ปี นั่นหมายความว่า ในอนาคตโลกจะถูกโรคอัลไซเมอร์คุกคามหนัก เพราะจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคนี้จะมีมากขึ้นทุกปี และภาระในการเฝ้าดูแลรักษาโดยแพทย์ และญาติก็จะต้องมีมากขึ้นด้วย ด้วยเหตุนี้แพทย์ทั่วโลกจึงให้ความสนใจศึกษาและวิจัยโรคอัลไซเมอร์เป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะในประเด็นป้องกันหรือรักษา ปัจจุบันยังไม่มียาที่รักษาให้หายขาดแต่มียาซึ่งอาจช่วยควบคุมอาการต่างๆ ให้น้อยลงได้ชั่วคราว แต่โรคก็จะดำเนินต่อไปเรื่อยๆ เมื่อถึงระยะที่เป็นมากๆ ยาก็จะไม่ได้ผล

สาเหตุของโรคอัลไซเมอร์มีสมมติฐานว่าสามารถเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุด้วยกัน แต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยสาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งก็คือ ผู้ป่วยอัลไซเมอร์จะมีปริมาณเซลล์สมองลดลงและสารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) ลดลงด้วย สารสื่อประสาทนี้เป็นตัวเชื่อมโยงคำสั่งต่างๆ ของเซลล์สมองที่ควบคุมด้านความจำ ความคิดอ่านและพฤติกรรมต่างๆ เมื่อ ACh ลดลง จึงทำให้เกิดอาการต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ ปัจจุบันมียาที่ช่วยเพิ่มปริมาณของ Ach ในสมองโดยออกฤทธิ์ต้าน Acetylcho-linesterase (AChE) ที่ย่อยสลาย ACh คือ AChE inhibitors เช่น tacrine, rivastigmine และ galantamine[8,9] ยาเหล่านี้จึงช่วยให้ผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีอาการดีขึ้นได้ และชะลอการทรุดลงของโรคถ้าได้ใช้ในระยะเริ่มแรก แต่จะไม่ทำให้โรคหายขาด

เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส หรือ (acetylcholine acetylhydrolase (EC 3.1.1.7) มีความจำเพาะเจาะจงต่ออะเซทิลโคลีน และเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสหรือ (acylcholine acylhydrolase (EC 3.1.1.8) หรือ

psudocholinesterase ที่มีความจำเพาะต่อบิวทิริลโคลีน (butyrylcholine) หน้าที่หลักของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส คือ ไฮโดรไลซ์อะเซทิลโคลีนอย่างรวดเร็วที่ cholinenergic synapses ส่วนหน้าที่ของบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากไม่พบสารตั้งต้นจำเพาะจากธรรมชาติ (specific natural substrate) ของเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ถึงแม้ว่าเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสจะไฮโดรไลซ์อะเซทิลโคลีนได้เช่นกัน มีความเชื่อว่าเอนไซม์บิวทิวริลโคลีนเอสเตอเรสทำหน้าที่เป็น scavenging enzyme ในการทำลายพิษของสารประกอบจากธรรมชาติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์บิวทิวริลโคลีนเอสเตอเรสมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส แต่จะแตกต่างกันในเรื่องของ substrate inhibition กล่าวคือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยสารตั้งต้นที่มากเกินพอ จะเกิดกับเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสเท่านั้น มีการอธิบายถึงการตอบสนองที่แตกต่างกันของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิวริลโคลีนเอสเตอเรสต่อ substrate ที่มากเกินพอ Rosenberry (1975) เสนอว่า rate-limiting step ของกระบวนการเร่ง คือขั้นตอนการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่จับกันอย่างเหมาะสม (induce fit complex) และกลไกของ substrate inhibition อาจสืบเนื่องมาจากการรบกวนที่ขั้นตอนนี้ นอกจากนี้เชื่อว่าการ deacetylate ของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสถูกทำให้ช้าลงจากการที่มีอะเซทิลโคลีนตัวที่สองไปจับกับ anionic site ของ acyl enzyme[10]

ในประเทศไทยถึงแม้ว่า จำนวนผู้ป่วยยังมีไม่มากนัก เมื่อเทียบกับประชากรในโลกตะวันตก แต่ก็นับว่าเป็นปัญหาสำคัญอันหนึ่ง ที่ควรจะหาทางป้องกันไว้ มีสมุนไพรไทยหลายชนิดที่การแพทย์อายุรเวทเชื่อว่า มีสรรพคุณในการกระตุ้นความคิดและฟื้นฟูความจำ เช่น น้ำมันจากเมล็ดกระทงลาย ใบบัวบก ขมิ้นชันและว่านน้ำ[11] นอกจากนี้ ยังมีผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติได้ทดสอบฤทธิ์ต้าน AChE กับสมุนไพรไทยหลายชนิด[11] พบว่า สารสกัดจากรากบอระเพ็ดข้าว (*Stephania suberosa* Formann.) และ จากรากพุดจีบ (*Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. Ex Roem. & Schult.) ให้ผลการทดสอบที่ดีมาก (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้น จะเห็นได้ว่า สมุนไพรไทยหลายชนิดมีศักยภาพในการป้องกันหรือรักษาโรคนี้ได้

1.3 วัตถุประสงค์

13.1 สังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น

13.2 ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสของสารสังเคราะห์และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ากระชายดำ

13.3 ศึกษาแนวทางประยุกต์สารสำคัญและ/หรือสิ่งสกัดที่ได้จากกระชายดำในอุตสาหกรรม อาหารและเครื่องดื่ม

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสของสารบริสุทธ์จากเหง้ากระชายดำและสารอนุพันธ์ฟลาโวนสังเคราะห์ รวมถึงการวิเคราะห์หา

ปริมาณสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์กระชายดำผงแปรรูป ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

1.5 วิธีดำเนินการวิจัยโดย สรุปทฤษฎี และ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

- การสกัดและแยกสารสำคัญจากกระชายดำ

1.5.1 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสของสารบริสุทธ์จากกระชายดำและสารอนุพันธ์ฟลาโวนสังเคราะห์

1.5.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์กระชายดำผงที่แปรรูป ด้วยการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ข้อมูลสารสำคัญจากกระชายดำและการประยุกต์ใช้

1.6.2 เผยแพร่ผลงานเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ให้กับกลุ่มอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอาหารเสริมจากกระชายดำ

2. เนื้อเรื่อง

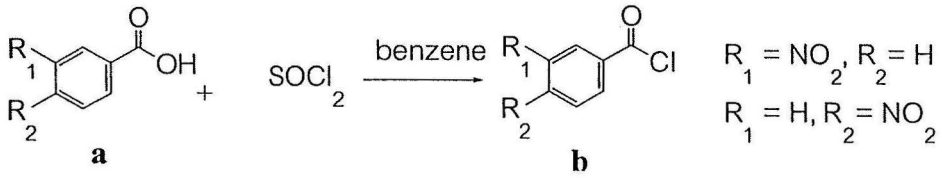
2.1 วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & method)

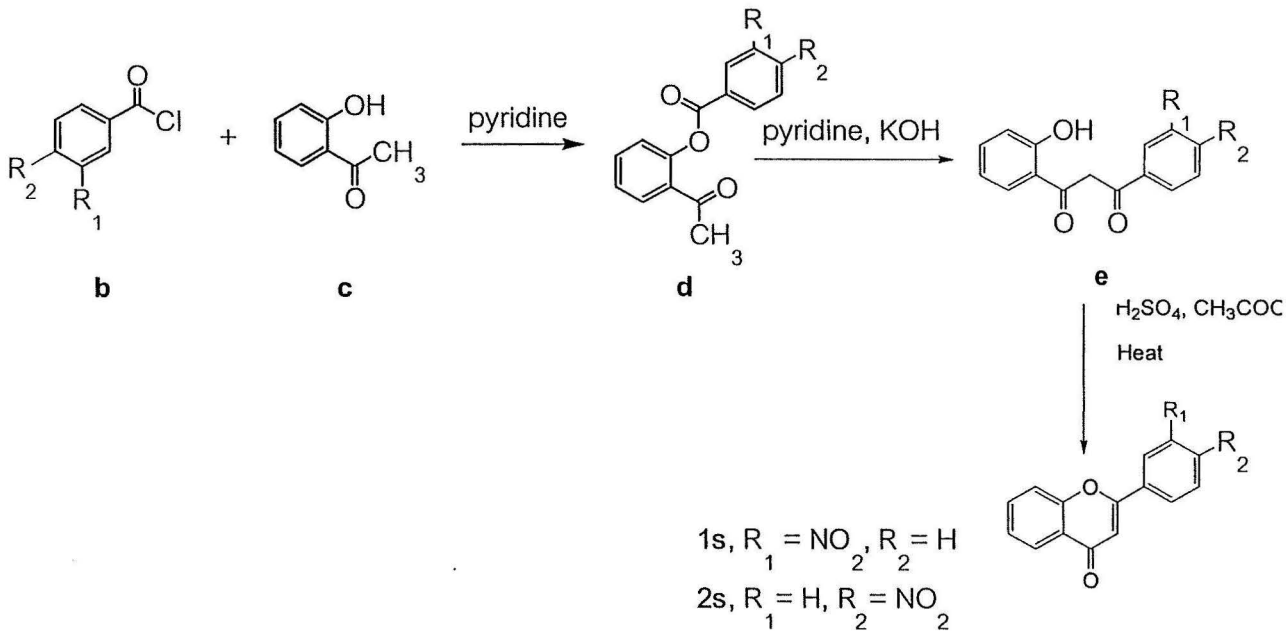
2.1.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัด

แยกสารบริสุทธิ์ในสิ่งสกัดเฮกเซน (สาร **1-3**) และไดคลอโรมีเทน (สาร **4-10**) ได้สารฟลาโวนอยด์ประเภทฟลาโวนที่มีปริมาณมากพอ 10 ชนิด ที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส

2.1.2 การสังเคราะห์ไนโตรฟลาโวน อะมิโนฟลาโวน และเอไมด์ฟลาโวน

2.1.2.1 การสังเคราะห์ไนโตรฟลาโวน (สาร 1-2s)





การสังเคราะห์มี 3 ขั้นตอน

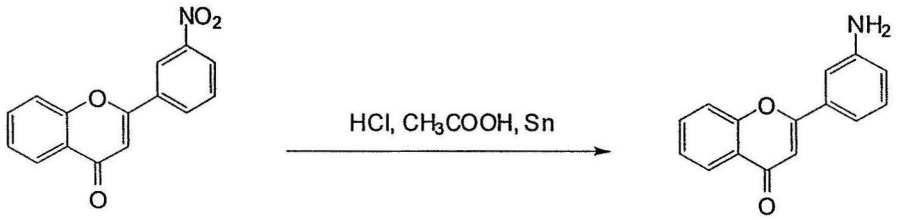
โดยเริ่มจากการเตรียม nitro-benzyl chloride (**b**) โดยนำ nitrobenzoic acid 29.9 mmol ในตัวทำละลายเบนซีน มาเติม $SOCl_2$ 89.9 mmol คนและรีฟลักซ์เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออก

ขั้นตอนที่1 (ปฏิกิริยาesterification) นำ *o*-hydroxyacetophenone(**C**) 10.88 mmol มาเติม pyridine ลงไป 9 ml และตามด้วย **(b)** 11.97 mmol ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน (ขั้นตอนนี้จะเกิดความร้อนต้องแช่ในอ่างน้ำแข็ง) คนเป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นเทผลิตภัณฑ์ที่ได้ลงไปใน1M HCl แล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc 3ครั้ง แล้วระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำไปตกผลึกด้วย EtOAc กับ hexane จะได้สาร nitro-benzoic acid 2-acetyl-phenyl ester (**d**)

ขั้นตอนที่ 2 (ปฏิกิริยา acyl rearrangement) นำผลิตภัณฑ์ (**d**) ที่ได้จากขั้นตอนแรกมา 3.51 mmol แล้วเติม KOH 6.59 mmol ตามด้วย pyridine 7 ml แล้วคนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา30 นาที แล้วนำมาสกัดด้วย EtOAc 3ครั้ง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำไปตกผลึกด้วย 95%EtOH จะได้สาร 1-(2-hydroxy-phenyl)-3-(nitro-phenyl)-propane-1,3-dione (**e**)

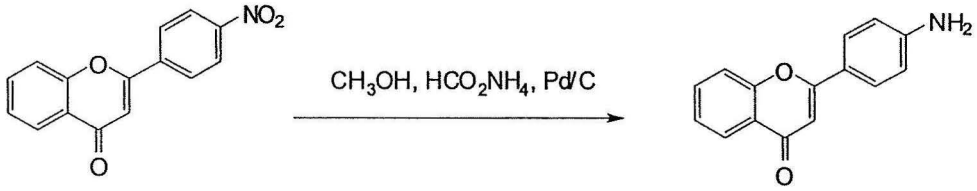
ขั้นตอนที่ 3 (ปฏิกริยา cyclization) นำผลิตภัณฑ์(**e**)ที่ได้จากขั้นตอน 2 มา 1.75 mmol แล้วเติม glacial acetic acid 2 **ml** และ H_2SO_4 1 หยด คนและให้ความร้อนภายใต้สภาวะรีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาสกัดด้วย EtOAc 3ครั้ง ระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำไปตกผลึกด้วย 95%EtOH จะได้สาร 3′-nitroflavone (**1s**) และ 4′-nitroflavone (**2s**) ตามลำดับ

2.1.2.2 การสังเคราะห์อะมิโนฟลาโวน (สาร 3-4s)



3s

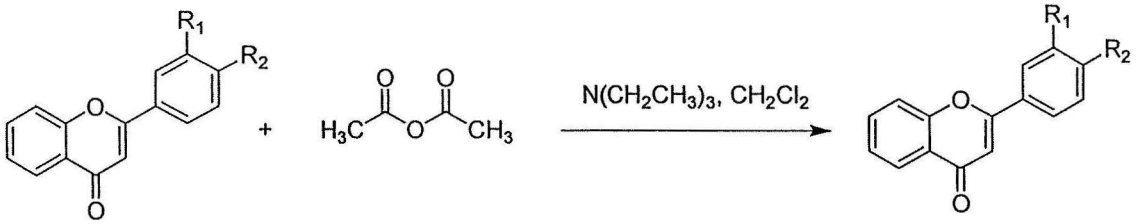
ขั้นตอนที่ 1 (ปฏิกิริยา reduction of nitro group) นำ nitroflavone 0.748 mmol มาเติม HOAc 4.8 ml และ conc. HCl 0.8 ml จากนั้นค่อยๆ เติม Sn 3.74 mmol คนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดด้วย CH_2Cl_2 ระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำไปตกผลึกด้วย CH_2Cl_2 จะได้สาร 3′-aminoflavone (**3s**)



4s

ขั้นตอนที่ 2 นำ nitroflavone มา 0.37 mmol เติม Pd/C(10%) 0.1 g จากนั้นเติม NH_4HCO_2 7.4 mmol และ MeOH 12 ml คนเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่นและสกัดด้วย EtOAc นำชั้น organic มาทำให้แห้งด้วย anhydrous Na_2SO_4 และระเหยตัวทำละลายออกจะได้สาร 4′-aminoflavone (**4s**)

2.1.2.3 การสังเคราะห์เอไมด์ฟลาโวน (สาร 5-6s)



3s, $R_1 = NH_2$, $R_2 = H$

4s, $R_1 = H$, $R_2 = NH_2$

5s, $R_1 = -NH(CO)CH_3$, $R_2 = H$

6s, $R_1 = H$, $R_2 = -NH(CO)CH_3$

นำ aminoflavone (**3S** และ **4S**) อย่างละ 0,21 mmolมาทำปฏิกิริยา acylation โดยการเติม Ac_2O 0.42 mmol และ triethylamine 0.15 mmol จากนั้นเติม CH_2Cl_2 10 ml คนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (**3S**) และ 24ชั่วโมง (**4S**) จากนั้นสกัดด้วย CH_2Cl_2 ระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำไปตกผลึกด้วย EtOAc จะได้สาร 3′-acetamidoflavone (**5s**) และ 4′-acetamidoflavone (**6s**) ตามลำดับ

2.1.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส

เนื่องจากเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่มีผลต่อโรคอัลไซเมอร์ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ดังนั้นจึงนำสารที่แยกได้จากกระชายดำ 10 ชนิด และสารสังเคราะห์ 6 ชนิด มาทดสอบกับเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส เพื่อหาค่า% การยับยั้ง ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสที่ทดสอบ คือ อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (AChE) และบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส (BuChE) โดยใช้วิธีทดสอบแบบ microplate assay ตามวิธีของ Ellman's method

2.1.4. การเตรียมสารสำหรับการทดสอบ

2.1.4.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

- สารละลายบัฟเฟอร์ A (ความเข้มข้น *Tris*-HCl 50 มิลลิโมลาร์, pH = 8)

ชั่ง *T*ris-HCl 788 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 M โดยใช้ pH meterแล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

-สารละลายบัฟเฟอร์ B (ความเข้มข้น *Tris*-HCl 50 มิลลิโมลาร์, pH = 8 และมีความเข้มข้นของ bovine serum albumin 0.1%)

ชั่ง *Tris*-HCl 394 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติม bovine serum albumin ลงไป 0.05 มิลลิกรัม (เพื่อช่วยให้เอนไซม์มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น) จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 M โดยใช้ pH meter แล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

2.1.4.2 การเตรียมเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส

- การเตรียม stock solution (ความเข้มข้น 97 U/มิลลิลิตร)

จากฉลาก เอนไซม์ 1 มิลลิกรัม จะมีเอนไซม์ 349 U
น้ำหนักเอนไซม์ = 1.5 มิลลิกรัม
จะได้ว่า เอนไซม์ 1 มิลลิกรัม จะมีเอนไซม์ 349 U
ถ้า เอนไซม์ 1.5 มิลลิกรัม จะมีเอนไซม์ (349 x 1.5)/1 = 523.5 U
ต้องการ เอนไซม์ 97 U อยู่ในสารละลาย 1 มิลลิลิตร
ดังนั้น เอนไซม์ 523.5 จะอยู่ในสารละลาย (1 x 523.5)/97 = 5.4 มิลลิลิตร

ละลายเอนไซม์ 1.5 มิลลิกรัม ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A 5.4 มิลลิลิตร และนำไปเก็บรักษาไว้ในขวดแก้วมีฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 2 เดือน

- การเตรียมสารละลายเอนไซม์ (ความเข้มข้น 0.25 U/มิลลิลิตร)
เตรียมจาก stock solution ความเข้มข้น 97 U/มิลลิลิตร ดังนี้

ปิเปตสารละลายเอนไซม์จาก stock solution จำนวน 26 µl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ก่อนนำมาใช้งาน และก่อนทำการฉีดพ่นสารละลายเอนไซม์ต้องนำสารละลายมาตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องเสียก่อน

2.1.4.3 การเตรียมเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส

- การเตรียม stock solution (ความเข้มข้น 100 U/มิลลิลิตร)
จากฉลาก เอนไซม์ 1 มิลลิกรัม จะมีเอนไซม์ 500 U

ละลายเอนไซม์ 500 U ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย stock solution ความเข้มข้น 100 U/มิลลิลิตร

- การเตรียมสารละลายเอนไซม์ (ความเข้มข้น 0.25 U/มิลลิลิตร)
เตรียมจาก stock solution ความเข้มข้น 100 U/มิลลิลิตร ดังนี้

ปิเปตสารละลายเอนไซม์จาก stock solution จำนวน 25 µl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ B จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ก่อนนำมาใช้งาน และก่อนทำการฉีดพนสารละลายเอนไซม์ต้องนำสารละลายมาตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องเสียก่อน

2.1.4.4 การเตรียมสารละลาย substrate

-การเตรียมสารละลาย ATCl (ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์) โดยนำ ATCl 43.38 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาบบัฟเฟอร์ A 10 มิลลิลิตร

-การเตรียมสารละลาย DTNB (ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์) โดยนำ DTNB 23.78 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาบบัฟเฟอร์ A 20 มิลลิลิตร

2.1.4.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ด้วยวิธี microplate[12]

จากการพัฒนาทางสเปกโทรโฟโตเมทริก ทำให้สามารถวัดค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ด้วยวิธี microplate ซึ่งมีวิธีการทดสอบ ดังนี้

1. เติม DTNB เข้มข้น3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร125 µl, ATCl เข้มข้น15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 µl, buffer A 50 µl และสารละลายตัวอย่างที่ละลายในเอทานอล10% ซึ่งถูกเจือจาง

ด้วยบัฟเฟอร์ A ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 25 µl ลงในหลุมของ microplate

2. จากนั้นเติมเอนไซม์ acetylthiocholine (ATCl) หรือ butyrylthiocholine (BTCl) 25 µl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทุกๆ 5 วินาที เป็นเวลา 2 นาที

3. คำนวณหา enzyme activity และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยเทียบกับหลุมที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

2.1.5 การประเมินคุณภาพกระชายดำผง ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry)

2.1.5.1 การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสาร 6 และ 7 จากกระชายดำผง ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry)

เลือกใช้เทคนิค gas chromatography สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสาร **6** และ **7** โดยเลือกใช้ภาวะในการทดลอง ดังนี้

เครื่อง GC ของ Varian รุ่น CP-3800

GC condition

Column: CP-sil 8 (30m × diameter 0.25 มิลลิโมลาร์)

Carrier gas: Nitrogen

Flow rate: 2.2 มิลลิลิตร/min

Injection volume: 1 µL

Splitless mode inlet section temp: 270 °C

Detector section temp: 280 °C

Detector: flame ionized detection (FID)

A five-step temperature gradient:

Step 1: Held initial temperature at 255 °C for 2 min

Step 2: Increase to 260 °C at 1 °C/min and hold for 15 min

Step 3: Increase to 268 °C at 5 °C/min

Step 4: Increase to 269 °C at 0.5°C/min and hold for 3 min

Step 5: Increase to 270 °C at 0.5°C/min and hold for 5 min

Internal standard: pinostrobin

2.1.6 การเตรียมกระชายดำผง โดยวิธีการทำให้แห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry)

วิธีที่ 1 สกัดด้วยน้ำ

1. นำผลิตภัณฑ์จากกระชายดำผง (เป็นผลิตภัณฑ์ชาชงบรรจุซองสำเร็จรูป จาก อ.นาแห้ว จังหวัดเลย) ต้มกับน้ำ

2. นำส่วนที่สกัดได้ไปทำให้แห้งแบบแช่แข็ง

วิธีที่ 2 สกัดด้วย เมทานอล-น้ำ (1:99)

1. นำผลิตภัณฑ์จากกระชายดำผง (ชาชง อ.นาแห้ว) ต้มด้วยเมทานอล-น้ำ (1:99)

2. นำส่วนที่สกัดได้ไประเหยเมทานอลให้หมด เหลือเฉพาะน้ำ แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่แข็งเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกระชายดำผง โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยต้องการให้มีปริมาณสาร **6** และ **7** ในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ได้จากกระชายดำ

วิธีที่ 3 สกัดด้วย เมทานอล-น้ำ (5:95)

1. นำผลิตภัณฑ์จากกระชายดำผง (ชาชง อ.นาแห้ว) ต้มด้วยเมทานอล-น้ำ (5:95)

2. นำส่วนที่สกัดได้ไประเหยเมทานอลให้หมด เหลือเฉพาะน้ำ แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่แข็งเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกระชายดำผง โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยต้องการให้มีปริมาณสาร **6** และ **7** ในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ได้จากกระชายดำ

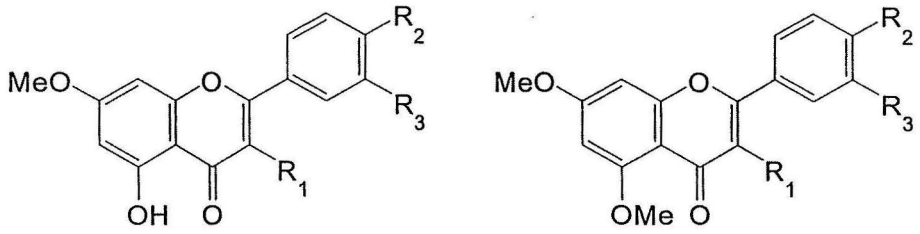
วิธีที่ 4 สกัดด้วย เมทานอล-น้ำ (50:50)

1. นำผลิตภัณฑ์จากกระชายดำผง (ชาชง อ.นาแห้ว) ต้มด้วยเมทานอล-น้ำ (50:50)

2. นำส่วนที่สกัดได้ไประเหยเมทานอลให้หมด เหลือเฉพาะน้ำ แล้วนำไปทำให้แห้งแบบแช่แข็งเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกระชายดำผง โดยวิธีการทำให้แห้งแบบแช่แข็ง โดยต้องการให้มีปริมาณสาร **6** และ **7** ในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อนำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ได้จากกระชายดำ

2.2 ผลการวิจัย

1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ด้วยวิธี microplate ของสารที่แยกได้จากกระชายดำ (**1-10**) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร **7** (84.6%) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสสูงสุดใกล้กับสารมาตราฐาน (galanthamine) ตามด้วย สาร **6** (46.2%), **10** (22.8%), **8** (17.9%) และ **9** (16.5%) ตามลำดับ ดังตารางที่ 1



1, R_1 = OMe; R_2 = R_3 = H
2, R_1 = R_2 = R_3 = H
3, R_1 = R_2 = OMe; R_3 = H
4, R_1 = R_2 = R_3 =OMe
10, R_1 = R_3 = H; R_2 = OMe

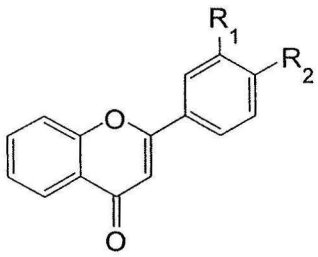
5, R_1 = OMe; R_2 = R_3 = H
6, R_1 = R_3 = H; R_2 =OMe
7, R_1 = R_2 = R_3 = H
8, R_1 = R_2 = OMe; R_3 = H
9, R_1 = R_2 = R_3 = OMe

รูปที่ 1 โครงสร้างของฟลาโวนที่แยกได้ (**1-10**)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส

สาร	การยับยั้ง (%)	
	เอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส	บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	47.1	46.2
7	42.6	84.6
8	25.9	17.9
9	26.2	16.5
10	19.0	22.8
Galanthamine	94.0	95.5

2. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของฟลาโวน สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของฟลาโวนในกลุ่มไนโตรฟลาโวน (สาร **1-2s**) อะมิโนฟลาโวน (สาร **3-4s**) และเอไมด์ฟลาโวน (สาร **5-6s**)



1s, R_1 = -NO_2
2s, R_2 = -NO_2
3s, R_1 = -NH_2
4s, R_2 = -NH_2
5s, R_1 = -NH(CO)CH_3
6s, R_2 = -NH(CO)CH_3

รูปที่ 2 โครงสร้างของอนุพันธ์ฟลาโวนสังเคราะห์ (สาร **1-6s**)

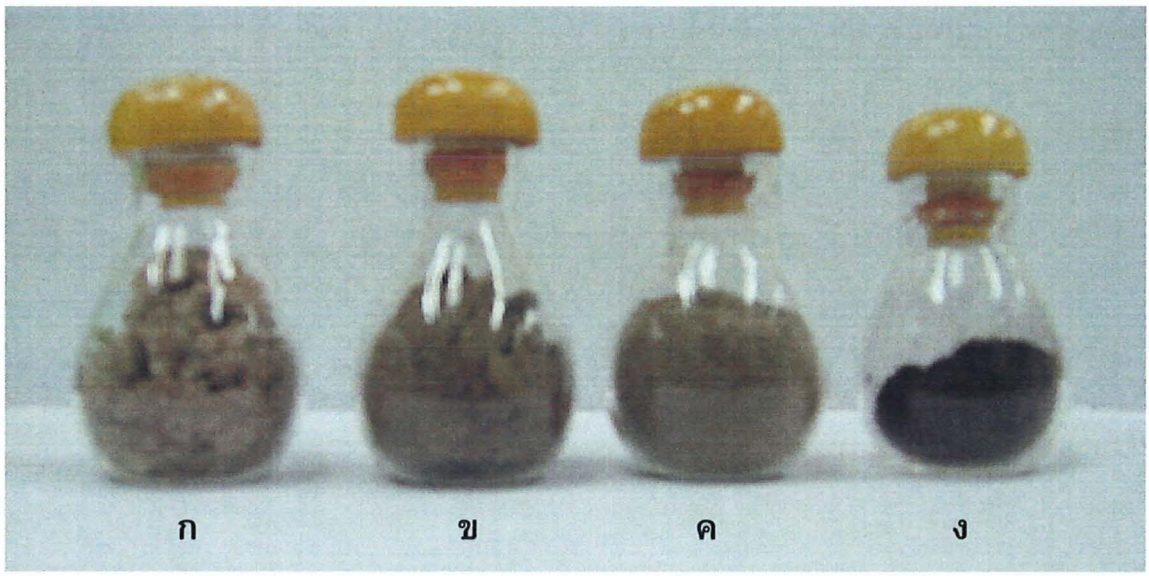
3. จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ของสารที่สังเคราะห์ได้ (**1-6s**) พบว่า ค่า% การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาร **1s** (3′-nitroflavone) จะให้ % การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสสูงสุด เท่ากับ 72.58% ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส พบว่าสาร **5s** (3′-acetamidoflavone) จะให้ % การยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสสูงสุด เท่ากับ 69.45% ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสของอนุพันธ์ฟลาโวนสังเคราะห์ (สาร **1-6s**)

สาร	ยับยั้งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส(%)	ยับยั้งบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส(%)
1s	72.58	67.74
2s	62.25	25.00
3s	70.87	63.24
4s	15.13	63.67
5s	21.75	69.45
6s	56.14	64.98
Eserine (Standard)	91.91	98.09

4. การแปรรูปกระชายดำผง โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) ได้สกัดด้วยสารละลายเมทานอลในน้ำ 0% 1% 5% และ 50% (วิธี 1-4) ตามข้อ 2.1.4 แล้วทำการวิเคราะห์

ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่า วิธี 1 (สกัดด้วย 100% น้ำ) ไม่มีปริมาณสาร **6** และ **7** ส่วน วิธี 2 (สกัดด้วย 1% เมทานอล-น้ำ) มีปริมาณสาร **7** เท่ากับ 69.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของกระชายผงแห้งแบบแช่แข็ง วิธี 3 (สกัดด้วย 5% เมทานอล-น้ำ) มีปริมาณสาร **7** เท่ากับ 98.4 มิลลิกรัมต่อกรัมของกระชายผงแห้งแบบแช่แข็ง และวิธี 4 (สกัดด้วย 50% เมทานอล-น้ำ) มีปริมาณสาร **7** เท่ากับ 245.3 มิลลิกรัมต่อกรัมของกระชายผงแห้งแบบแช่แข็ง ถึงแม้วิธี 3 (สกัดด้วย 50% เมทานอล-น้ำ) จะมีปริมาณสาร **7** มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามจะดูดความชื้นเมื่อวางทิ้งไว้



รูปที่ 3 การสกัดกระชายดำผง ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) ด้วยสารละลายเมทานอลในน้ำ 0 (ก) 1 (ข) 5 (ค) และ 50 % (ง)

3. วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส ด้วยวิธี microplate ของสารที่แยกได้จากกระชายดำ (**1-10**) พบว่า สาร **7** (5,7-dimethoxyflavone) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสค่อนข้างสูง เท่ากับ 84.6% ส่วนสาร **6** (5,7,4′-trimethoxy-flavone) มีฤทธิ์ยับยั้งเพียง 46.2%

นอกจากนี้ จากเอกสารอ้างอิง[13] ที่ผ่านมาพบว่าสาร **2** และ **4** มีฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ (antiallergic activity) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.6 และ 8.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน ketotifen fumarate (IC_{50}= 47.50 ไมโครโมลาร์)

2. การสังเคราะห์ไนโตรฟลาโวน (สาร **1-2s**) อะมิโนฟลาโวน (สาร **3-4s**) และเอไมด์ฟลาโวน (สาร **5-6s**) ทำให้ได้สารสังเคราะห์ในกลุ่มนี้ที่มีตำแหน่งและหมู่แทนที่หลากหลายขึ้น

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสของสารที่สังเคราะห์ได้ (สาร **1-6s**) พบว่า ค่า% การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรส ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาร **1s** จะให้% การยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสค่อนข้างสูง (72.58%) ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรส พบว่าสาร **5s** จะให้ % การยับยั้งเอนไซม์บิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสค่อนข้างสูง (69.45%) แต่ยังน้อยกว่าสามาตรฐาน eserine ดังนั้นการสังเคราะห์สารในกลุ่มนี้ให้มีตำแหน่งและหมู่แทนที่หลากหลายขึ้นจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ได้สารที่ฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น

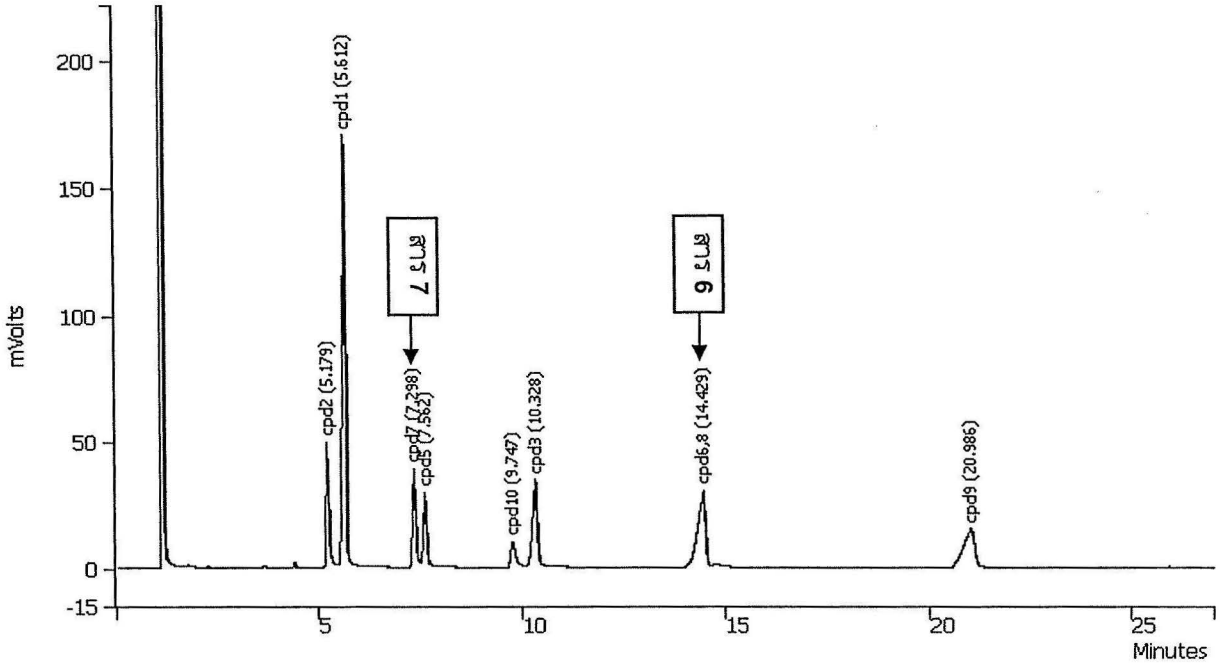
4. การแปรรูปกระชายดำผงที่มีสารสำคัญเป็นส่วนประกอบเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเสริม โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) พบว่า วิธี 4 (สกัดด้วย 50% เมทานอล-น้ำ) จะพบสาร **7** ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นส่วนประกอบมากกว่าวิธีอื่น แต่จะดูดความชื้นเมื่อวางทิ้งไว้ เพราะไขมันหรือน้ำมันในเหง้ากระชายจะละลายได้ดีในเมทานอล จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ดูดความชื้นได้ดี ดังนั้นจึงอาจลดลดปริมาณของเมทานอลลงหรืออาจต้องใช้บรรจุภัณฑ์ที่ทนต่อความชื้นและสภาวะอากาศเปลี่ยนแปลงได้ดี เช่น ถุงอลูมิเนียมฟรอยด์ เป็นต้น ส่วนการปรับปรุงหาวิธีการแปรรูปอื่นๆในกระชายดำผง เช่นโดยการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยยังไม่สามารถทำได้เนื่องจากขาดเครื่องมือในการทำแห้งแบบพ่นฝอย

4. สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

- ควรมีการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ในกลุ่มนี้ ให้มีอนุพันธ์หลากหลายขึ้น
- ควรมีการปรับปรุงวิธีการแปรรูปในกระชายดำผงให้หลากหลายขึ้น เช่น การทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (spray-dry)
- หากสามารถสังเคราะห์สารในกลุ่มนี้ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุดแล้ว ควรมีการทดสอบความเป็นพิษก่อนนำไปใช้
- การแปรรูปกระชายดำผง โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze-dry) เมื่อทำการวิเคราะห์หาสารสำคัญ (สาร**6**และ **7**) จะพบเฉพาะสาร**7**เท่านั้นส่วนสาร**6**มีปริมาณน้อยมากจนเครื่องGCไม่สามารถตรวจสอบได้ และสาร**7**จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเตอเรสที่ดี นอกจากนี้การควบคุมปริมาณของสาร**7**ในสิ่งสกัดให้เท่ากันทุกครั้งเป็นไปได้อยาก ดังนั้นการเติมสาร**7** จากที่แยกได้เพื่อให้ได้สารสำคัญตามความต้องการจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพราะสาร**7**เป็นองค์ประกอบหลักสารหนึ่งในกระชายดำ ส่วนในการปฏิบัติจริงอาจใช้เอทานอลสกัดแทนเมทานอลได้ แต่จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า เมทานอลจะระเหยได้ง่ายกว่าเอทานอล ฉะนั้นจึงสามารถกำจัดตัวทำละลายออกได้ง่ายกว่า

ภาคผนวก

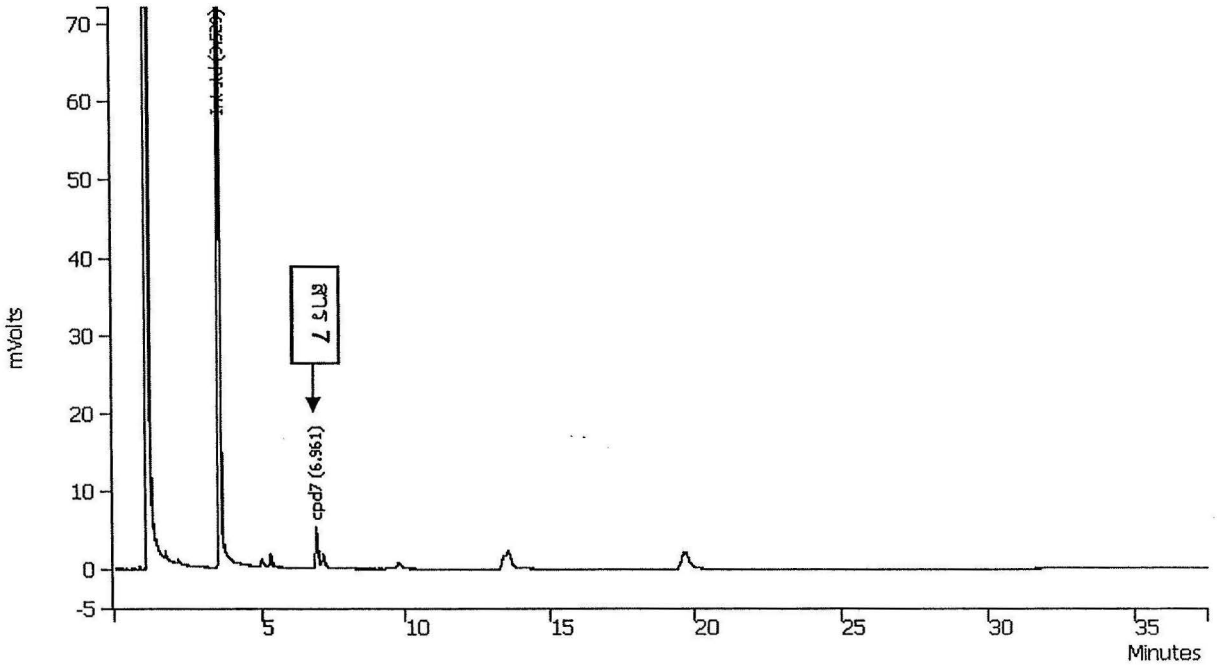
Data File:	d:\data\warintho\mong\natural product	Operator (Calc):	Nick
Channel:	Front = FID RESULTS	Calc Date:	12/09/2009 05:24:04 PM
Sample ID:	mix flavonoid	Times Calculated:	12
Operator (Inj):	Nick	Calculation Method:	mix flavonoid 7-6-2551
Injection Date:	06/07/2008 04:40:08 PM	Instrument (Calc):	GC#4
Injection Method:	d:\method\warintho\nick\five step3.mth	Run Mode:	Analysis
Run Time (min):	27.027	Peak Measurement:	Peak Area
Workstation:	GC3	Calculation Type:	Percent
Instrument (Inj):	GC#4	Calibration Level:	N/A
		Verification Tolerance:	N/A



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Rel Ret Time	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1	cpd2	8.5762	5.179	-0.000	0.00	210359	BB	3.7		0
2	cpd1	33.7895	5.612	0.000	0.00	828802	BB	4.6		0
3	cpd7	8.6845	7.298	0.000	0.00	213017	BV	5.0		0
4	cpd5	6.2892	7.562	0.000	0.00	154264	VB	4.8		0
5	cpd10	3.3654	9.747	-0.000	0.00	82548	BB	7.2		0
6	cpd3	11.4069	10.328	-0.000	0.00	279792	BB	7.4		0
7	cpd6,8	16.0102	14.429	0.000	0.00	392703	BB	12.7		0
8	cpd9	11.8781	20.986	-0.000	0.00	291351	BB	17.9		0
	Totals	**100.0000**		**0.000**		**2452836**				

รูปที่ ก-1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน (สาร **1-10**) โดยเครื่อง GC

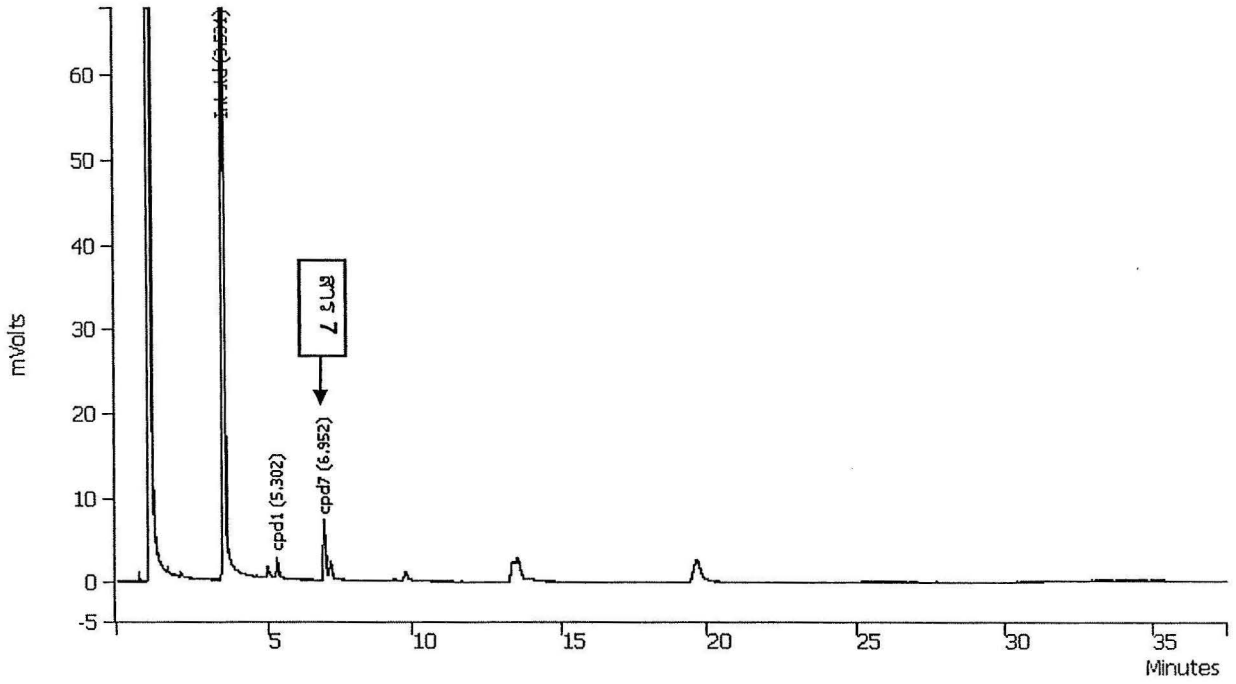
Data File:	d:\data\warintho\mong\pat\1%meoh	Operator (Calc):	Mong
Channel:	Front = FID RESULTS	Calc Date:	12/16/2009 03:44:18 PM
Sample ID:	1%MeOH	Times Calculated:	4
Operator (Inj):	Mong	Calculation Method:	1%meoh 16-12-2552 14;58;27-front.mth
Injection Date:	12/16/2009 02:58:27 PM	Instrument (Calc):	gc4
Injection Method:	d:\method\warintho\nick\five step 3.mth	Run Mode:	Analysis
Run Time (min):	37.562	Peak Measurement:	Peak Area
Workstation:		Calculation Type:	Percent
Instrument (Inj):	gc4	Calibration Level:	N/A
		Verification Tolerance:	N/A



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Rel Ret Time	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1	Int std	98.0058	3.529	0.000	0.00	1264004	BB	2.9		0
2	cpd7	1.9942	6.961	-0.000	0.00	25720	BB	4.7		0
	Totals	**100.0000**		**0.000**		**1289724**				

รูปที่ ก-2 โครมาโทแกรมของสิ่งสกัดจากกระชายดำผงที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล-น้ำ (1:99)) เพื่อวิเคราะห์สาร **6** และ **7** โดยเครื่อง GC

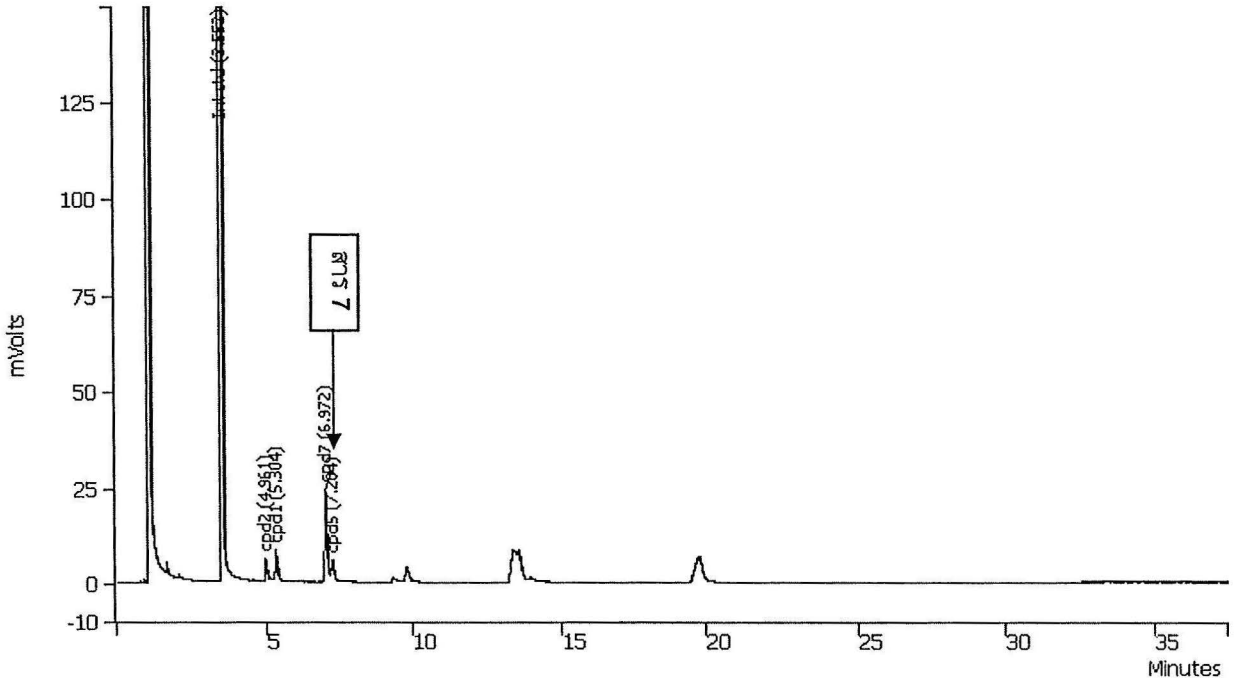
Data File:	d:\data\warintho\mong\pat\5%meoh	Operator (Calc):	Mong
Channel:	Front = FID RESULTS	Calc Date:	12/16/2009 04:26:20 PM
Sample ID:	5%MeOH	Times Calculated:	6
Operator (Inj):	Mong	Calculation Method:	5%meoh 16-12-2552 15;40;52-front.mth
Injection Date:	12/16/2009 03:40:52 PM	Instrument (Calc):	gc4
Injection Method:	d:\method\warintho\nick\five step 3.mth	Run Mode:	Analysis
Run Time (min):	37.563	Peak Measurement:	Peak Area
Workstation:		Calculation Type:	Percent
Instrument (Inj):	gc4	Calibration Level:	N/A
		Verification Tolerance:	N/A



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Rel Ret Time	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1	Int std	96.8099	3.531	0.000	0.00	1395004	BB	3.0		0
2	cpd1	0.7493	5.302	0.000	0.00	10797	BB	3.7		0
3	cpd7	2.4408	6.952	0.000	0.00	35171	BB	4.9		0
	Totals	**100.0000**		**0.000**		**1440972**				

รูปที่ ก-3 โครมาโทแกรมของสิ่งสกัดจากกระชายดำผงที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล-น้ำ (5:95)) เพื่อวิเคราะห์สาร **6** และ **7** โดยเครื่อง GC

Data File:	d:\data\warintho\mong\pat\50%meoh	Operator (Calc):	Mong
Channel:	Front = FID RESULTS	Calc Date:	12/16/2009 05:21:57 PM
Sample ID:	50%MeOH	Times Calculated:	4
Operator (Inj):	Mong	Calculation Method:	50%meoh 16-12-2552
Injection Date:	12/16/2009 04:24:24 PM	Instrument (Calc):	gc4
Injection Method:	d:\method\warintho\nick\five step 3.mth	Run Mode:	Analysis
Run Time (min):	37.562	Peak Measurement:	Peak Area
Workstation:		Calculation Type:	Percent
Instrument (Inj):	gc4	Calibration Level:	N/A
		Verification Tolerance:	N/A



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Rel Ret Time	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1	Int std	88.9135	3.552	0.000	0.00	1888687	BB	3.4		0
2	cpd2	1.2452	4.961	-0.000	0.00	26450	BB	4.1		0
3	cpd1	1.6925	5.304	-0.000	0.00	35952	BB	3.8		0
4	cpd7	6.4445	6.972	-0.000	0.00	136893	BV	4.8		0
5	cpd5	1.7043	7.204	0.000	0.00	36203	VB	5.8		0
	Totals	**100.0000**		**0.000**		**2124185**				

รูปที่ ก-4 โครมาโทแกรมของสิ่งสกัดจากกระชายดำผงที่สกัดด้วยสารละลายเมทานอล-น้ำ (50:50)) เพื่อวิเคราะห์สาร **6** และ **7** โดยเครื่อง GC

บรรณานุกรม

1. Jaipetch, T. ; Reutrakul, V. ; Tuntiwachwuttikul, P. and Santisuk, T. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 625-626.
2. Sutthanut, K.; Sripanidkulchai, B.; Yenjai, C. and Jay. *J Chromatogr A* **2007**, *1143*, 227-233.
3. Ruijjanawate, C.; Kanjanapothi, D.; Amornlerdpison, D. and Pojanagaroon, S. *J. Ethnopharmacol* **2005**, *102*, 120-122.
4. Yenchai, C.; Prasanphen, K.; Doodee, S.; Wongpanich, V. and Kittakoop, P. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 89-92.
5 Wattanapitayakul, S.K., Chularojmaontri, L.: Herunsalee, A. Charuchongkdwongse, S. and Chansuvanich, N. *Fitoterapia* **2008**, 214-216.
6. Ellman, G. L.; Coutney, K. D.; Valentino, C.; Zarzuelo, A. Jr. and Feathertone, R. M., *Biochem Pharmacol* **1961**, *7*, 88-95.
7. Rhee, K.; Meent, M.; Ingkaninan, K. and Verpoorte, R. *Journal of Chromatography A* **2001**, *915*, 217-223.
8. Fulton, B. and Benfield, P. *Drugs Aging* **1996**, *9*, 60-65.
9. Zarotsky, V.; Sramek, J.J. and Cutler, N.R. *Journal of Health-System Pharmacist* **2003**, *60*, 446-452.
10. Krupka, R.M., *Biochemistry* 1963, 2,76-82
11. เกษร นันทจิต, ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ใช้รักษาโรคอัลไซเมอร์, พิมพ์ที่คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 2548.
12. Ingkaninan, K.; Temkitthawon, P.; Chuenchom, K.; Yuyaem, T.,and Thongnoi, W. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 261-264.
13. Tewtrakul, S.; Subhadhirasakul, S. and Kummee, S. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 191-193.

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. หัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) สันติ ทิพยางค์ ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

(ภาษาอังกฤษ) Santi Tip-pyang

ภาควิชา เคมี คณะ วิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2218-7625

ที่อยู่ปัจจุบัน 454/58 หมู่บ้านทิวสน ลาดพร้าว 87 บางกะปิ กทม. 10310 โทรศัพท์ 0-2538-6766

ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
PhD	อินทรีย์เคมี	Mississippi State University	2533

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง ๓ ปี (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

1. P. Phuwapraisirisan, P. Sowanthip, D.H. Miles, **S.Tip-pyang**. *Phytother. Res.* **2006,** *20*, 458-461.
2. P. Phuwapraisirisan, S. Surapinit, S. Sombund, P. Siripong, **S.Tip-pyang**. *Tetrahedron lett.*, **2006**, *47*, 3685-4688.
3. P. Phuwapraisirisan, S. Surapinit, **S. Tip-pyang**. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 708-710.
4. P. Phuwapraisirisan, A. Poapolathep, S. Poapolathep, **S. Tip-pyang**. *ACGC Chem. Res. Comm.*, **2006**, *20*,17-19.
5. P. Phuwapraisirisan, J. Rangsan, P. Siripong, **S. Tip-pyang**. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 1321-1325.
6. P. Phuwapraisirisan, S. Udomchotphruet, S. Surapinit, **S. Tip-pyang**. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*,1332-1337.
7. P. Phuwapraisirisan, S.Surapinit, P.Siripong ,**S.Tip-pyang** and U.kokpol. *Tetrahedron lett.*, **2007**, *48*, 527-530.
8. P. Phuwapraisirisan, S. Surapinit, R. Jeenapongsa, **S. Tip-pyang**, U.kokpol. *Phytother. Res.*, **2007**, *21*, 485-487.
9. P. Phuwapraisirisan, K. Swang, P. Siripong, **S. Tip-pyang**. *Tetrahedron lett* ., **2007**, *48*, 527-530.
10. C. Phoopichayanun, P. Phuwapraisirisan, **S. Tip-pyang**, J. Jongaramruong. *Nat. Prod. Res.* **2008** , *22* ,1297-1303.
11. Y. Limpipatwattana, **S. Tip-pyang**, S. Khumkratok. *Biochem. System. Ecol.* **2008** , *36*, 798-800.

12. P. Phuwapraisirisan,J. Rangsan, P. Siripong and **S. Tip-pyang** . *Nat. Prod. Res.* **2009,** *13* , 1063-1071.

13. S. Saisin, **S. Tip-pyang** and P. Phuwapraisirisa. *Nat. Prod. Res.* **2009**, 23, 1472-1477.

2. ผู้วิจัย

(ภาษาไทย) วรินทร ชวศิริ ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

(ภาษาอังกฤษ) Warinthorn Chavasiri

ภาควิชา เคมี คณะ วิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2218-7625

ที่อยู่ปัจจุบัน 160/26 ซ. กิตติชัย ถ. บางกอกน้อย-ตลิ่งชัน โทรศัพท์ 02-4332578

บางกอกน้อยกรุงเทพ 10700

ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
Ph.D.	เคมี	Texas A&M University, U.S.A.	2536
วท.ม.	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2531
วท.บ.	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2528

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง ๓ ปี (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

1. Pluempanupat, W., Chantarasriwong, O., Taboonpong, P., Jang, D.O., **Chavasiri, W.** "Reactivity of chlorinating agents/PPh_3 for the chlorination of alcohols and carboxylic acids: a comparative study" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 223-226.

2. Kang, D.H., Joo, T.Y., **Chavasiri, W.**, Jang, D.O. "Radical mediated-direct conversion of aldehydes into acid bromides" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 285-287.

3. Intaranongpai, J., **Chavasiri,W.**, Gritsanapan, W. "Anti-head lice effect of *Annona squamosa* seeds" *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health* **2006**, *37*, 532-535.

4. Chantarasriwong, O., Jang, D.O., **Chavasiri, W.** "A practical and efficient method for the preparation of sulfonamides utilizing Cl_3CCN/PPh_3" *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7489-7492.

5. Pluempanupat, W., **Chavasiri, W.** "An efficient method for chlorination of alcohols using PPh_3/Cl_3CCONH_2" *Tetrahedron Lett.* **2006,** *47*, 6821-6823.

6. Morimoto, M., Fukumoto, H., Hiratani, M., **Chavasiri, W.**, Komai, K. "Insect antifeedants, pterocarpans and pterocarpol, in heartwood of *Pterocarpus macrocarpus* Kruz" *Biosci. Biotech. Biochem.* **2006,** *70*, 1864-1868.

7. Kang, D.H., Joo, T.Y., Lee, E.H., Chaysripongkul, S., **Chavasiri, W.**, Jang, D.O. "A mild and efficient reaction for conversion of carboxylic acids into acid bromides with ethyl

tribromoacetate/triphenylphosphine under acid-free conditions" *Tetrahedron Lett.* **2006,** *47,* 5693-5696.

3. ผู้วิจัย

(ภาษาไทย) ปรีชา ภูวไพรศิริศาล ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

(ภาษาอังกฤษ) Preecha Phuwapraisirisan

ภาควิชา เคมี คณะ วิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02-2187624

ที่อยู่ปัจจุบัน 40/2580 ต.ท่าทราย อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000 โทรศัพท์ 02-5914172

ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
PhD	Aquatic Bioscience	University of Tokyo	2546
วท.ม.	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2541
วท.บ. (เกียรตินิยม)	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2539

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง ๓ ปี (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

1. S. saisin, S. Tip-pyang and **P. Phuwapraisirisan.** *Nat. Prod. Res.* **2009**, 23, 1472-1477.
2. **P. Phuwapraisirisan**,J. Rangsan, P. Siripong and S. Tip-pyang . *Nat. Prod. Res.* **2009,** *13* , 1063-1071.
3. C. Phoopichayanun, **P. Phuwapraisirisan**, S. Tip-pyang, J. Jongaramruong. *Nat. Prod. Res.*
4. **Phuwapraisirisan, P.**; Sawang, K.; Siripong. P.; Tip-pyang, S. "Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5193-5195.
5. **Phuwapraisirisan, P.**; Surapinit, S.; Jeenapongsa, R.; Tip-pyang, S.; Kokpol, U. "Feroniellin B, a new highly potent human platelet aggregation inhibitor from *Feroniella lucida*" *Phytother. Res.* **2007,** *21*, 485-487.
6. **Phuwapraisirisan, P.**; Surapinit, S.; Siripong. P.; Tip-pyang, S.; Kokpol, U. "Feroniellides A and B, apotirucallane triterpenes with novel cyclic acetals from *Feroniella lucida*" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 527-530.
7. **Phuwapraisirisan, P.**; Rangsan, J.; Siripong. P.; Tip-pyang, S. "9-*epi*-Viridiol, a novel cytotoxic furanosteroid from soil fungus *Trichoderma virens*" *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 1321-1325.
8. **Phuwapraisirisan, P.**; Udomchotphruet, S.; Surapinit, S.; Tip-pyang, S. "Antioxidant xanthones from *Cratoxylum cochinchinense*" *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 1332-1337.
9. **Phuwapraisirisan, P.**; Surapinit, S.; Tip-pyang, S. "A Novel Furanocoumarin from *Feroniella lucida* Exerts Protective Effect against Lipid Peroxidation" *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 708-710.

10. **Phuwapraisirisan, P.**; Surapinit, S.; Sombund, S.; Siripong. P.; Tip-pyang, S. "Feroniellins A-C, novel cytotoxic furanocoumarins with highly oxygenated C_{10} moieties from *Feroniella lucida*" *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3685-3688.
11. **Phuwapraisirisan, P.**; Poapolathep, A.; Poapolathep, S.; Tip-pyang, S. "In *vivo* Oxytoxin Antagonistic Effects of Pyrolizidine Alkaloids from *Stemona* sp. and *Asparagus racemosus*" *ACGC Chem. Res. Comm.* **2006**, *20*, 17-19.
12. **Phuwapraisirisan, P.**; Sowanthip, P.; Miles, D. H.; Tip-pyang, S. "Reactive Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibition of Proanthocyanidins from *Carallia brachiata*" *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 458-461.

4. ผู้วิจัย

(ภาษาไทย) พัฒทรา สวัสดี ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

(ภาษาอังกฤษ) Pattara Sawasdee

ภาควิชา เคมี คณะ วิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02-2187624

ที่อยู่ปัจจุบัน 2/1 ม. 8 ซอยอุดมทรัพย์ ถนนจรัญฯ 13 บางแค กรุงเทพฯ 10330โทรศัพท์ 081-2961475

ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วท.บ.	เคมี (เกียรตินิยม)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2538
วท.ด.	เคมีอินทรีย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2546

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง ๓ ปี (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

.....ไม่มี.....

5. ผู้วิจัย

(ภาษาไทย) ไพฑูรย์ รัชตะสาคร ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

(ภาษาอังกฤษ) Paitoon Rashatasakhon

ภาควิชา เคมี คณะ วิทยาศาสตร์ โทรศัพท์ 02-2187633

ที่อยู่ปัจจุบัน 69/2 หมู่ 1 ต.ท่าจีน อ.เมือง จ.สมุทรสาคร 74000 โทรศัพท์ 034-423463

ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
วท.บ.	เคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2540
PhD	เคมี	University of Missouri	2545

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ย้อนหลัง ๓ ปี (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่ตีพิมพ์)

1. Padwa, A.; Boonsombat, J.; **Rashatasakhon, P.** "An approach toward oxidopyrylium ylides using Rh(II)-catalyzed cyclization chemistry" *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5938-5941.
2. Rose, M.D.; Cassidy, M.P.; **Rashatasakhon, P.**; Padwa, A. "Acid-Promoted Cyclization Reactions of Tetrahydroindolinones. Model Studies for Possible Application in a Synthesis of Selaginoidine" *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 538-549.