



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากชันของชันโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni*

The study of chemical compounds from propolis of stingless bee

Tetragonula pagdeni.

โดย

นสภ.กฤษมณี ยี่รงค์ 58210153

นสภ.พัชรพล ผดุงพัฒน์นอม 58210190

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากชันของชันโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni*
The study of chemical compounds from propolis of stingless bee
Tetragonula pagdeni.

โดย

นสภ.กฤษณมณี	ธีรพงศ์	58210153
นสภ.พัชรพล	ผดุงพัฒน์	58210190

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานการวิจัย เรื่อง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากชั้นของชั้นโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni* มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในชั้นของชั้นโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni* โดยใช้วิธีทาง chromatography สกัดและแยกสารรวมถึงค้นหาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และเพื่อพัฒนาไปสู่การนำไปใช้เป็นยารักษาโรคต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้กับชั้นของชั้นโรง ซึ่งเป็นหนึ่งในทรัพยากรธรรมชาติของภาคตะวันออก นอกจากนี้ผลการทดลองและข้อเสนอแนะต่างๆ ในงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปใช้เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชั้นของชั้นโรงต่อไปได้ในอนาคต

คณะผู้วิจัย

นายภูมพิ ยี่รงค์

นายพัชรพล ผดุงพัฒน์นอม

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ปีการศึกษา 2562

เรื่อง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากชั้นของชั้นโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni*

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.กฤษณพี ยี่รงค์ รหัส 58210153

2. นสภ.พัชรพล ผดุงพัฒน์โนดม รหัส 58210190

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภาณุ. ดร.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ

2. ภก. ผศ. ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

3. ภาณุ. ดร.สมาวดี เปลี่ยนวงษ์

บทคัดย่อ

ชั้นของชั้นโรง นับเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง โดยชั้นโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงในจังหวัดจันทบุรี การศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากชั้นของชั้นโรงชนิดนี้ จากผลการสกัดแยกสารสกัดหยาบจากชั้นด้วย methanol ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ได้แก่ vacuum liquid chromatography โดยการเพิ่มความเข้มข้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ (SiO_2 , hexane, ethyl acetate, methanol), classic column chromatography (SiO_2 , hexane:ethyl acetate, 2:3) และ size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, methanol) และ TLC (SiO_2 , hexane:ethyl acetate, 2:3) ได้สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักจำนวน 3 รายการ แต่จากการตรวจสอบโดยใช้ TLC (SiO_2 , hexane:ethyl acetate, 2:3) ร่วมกับผลการวิเคราะห์ด้วย ^1H -NMR spectroscopy พบว่าสารเคมีที่คาดว่าเป็นองค์ประกอบหลัก ยังคงมีสารอื่นปะปนอยู่ จึงต้องมีการแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยใช้ HPLC ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย ^1H , ^{13}C -NMR spectroscopy, Infrared spectrometry, UV-Visible spectrophotometry และ mass spectrometry เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักต่อไป

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2019

: The study of chemical compounds from propolis of stingless bee *Tetragonula pagdeni*

By

1. Mr. Kudumpee Yeerong ID 58210153

2. Mr. Patcharapol Phadungpattanodom ID 58210190

Advisors:

1. Dr. Naphatson Chanthathamrongsiri

2. Assist.Prof.Dr. Boonyadist Vongsak

3. Dr. Samarwadee Plianwong

Abstract

This research focuses on the study of chemical components and structures of the isolated compounds from stingless bee propolis, *Tetragonula pagdeni* extract, which is one of the natural products in Chanthaburi, Thailand. The chemicals analysis starts from extraction of propolis crude extract by methanol and follow by separation and purify with chromatography techniques, including vacuum liquid chromatography with gradient mobile phase (SiO₂, hexane, ethyl acetate, methanol), classic column chromatography (SiO₂, hexane:ethyl acetate, 2:3), size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, methanol) and Thin layer chromatography (SiO₂, hexane:ethyl acetate, 2:3). The result shows the three main pre-purified fractions, which identity by using TLC (SiO₂, hexane:ethyl acetate, 2:3) and ¹H-NMR spectra (300MHz, CDCl₃). Therefore, the next step for purification is HPLC and elucidation the chemical structure of all isolated compounds by spectrophotometric techniques, including ¹H, ¹³C-NMR spectroscopy, infrared spectrometry, UV-Visible spectrophotometry and mass spectrometry.

Major Advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ ภญ. ดร.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาแนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้า คอยแนะนำ ให้ความรู้ ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนตรวจสอบปรับปรุง แก้ไข ข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จตามความคาดหวัง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ภก. ผศ. ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ และ อาจารย์ ภญ. ดร.สมาวดี เปลี่ยนวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาเพิ่มเติม ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ บุคลากรคณะเภสัชศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยทุกๆ ด้าน และขอขอบพระคุณที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคุณอาจารย์ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชา จนทำให้ผลงานวิจัยเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และสุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และเพื่อนๆ รวมถึงผู้เกี่ยวข้องทุกคน ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจในการศึกษาเล่าเรียนรวมถึงการทำงานวิจัยเสมอมา

คณะผู้วิจัย

นายภูมพิ ยี่รงค์

นายพัชรพล ผดุงพัฒน์

5 พฤศจิกายน 2562

สารบัญ

หน้า

คำนำ.....	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
Abstract.....	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
กรอบแนวคิด	2
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	3
1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	3
2. ประโยชน์และฤทธิ์ทางชีวภาพของชันจากชันโรง.....	4
3. การสกัดแยกสารสำคัญจากตัวอย่างชันของชันโรงที่พบในรายงานการวิจัย.....	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	9
1. เครื่องมือ วัสดุ/เครื่องแก้ว และสารเคมี.....	9
2. วิธีการดำเนินการทดลอง	11
2.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากชันของชันโรงขนเงิน <i>Tetragonula pagdeni</i>	11
2.2 ทหาระบบสำหรับการแยกสารสกัดด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)	12
2.3 แยกตัวอย่างด้วยวิธี Vacuum liquid chromatography (VLC)	13

2.4 รวม fraction จาก VLC ด้วยวิธี TLC.....	14
2.5 แยกตัวอย่างด้วยวิธี Classic Column chromatography (CC).....	15
2.6 รวม fraction จาก CC chromatography ด้วยวิธี TLC	16
2.7 แยกตัวอย่างด้วยวิธี size exclusion.....	17
2.8 การตกผลึกตัวอย่าง.....	18
2.9 หาระบบที่เหมาะสมสำหรับการแยก TP6/24 ด้วยวิธี TLC.....	18
2.10 แยกตัวอย่าง TP6/24 ด้วยวิธี TLC	19
2.11 แยกตัวอย่าง TP6/26 ด้วยวิธี TLC	21
2.12 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย TLC และ $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy (Nuclear magnetic resonance spectroscopy).....	23
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
1. น้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดได้.....	24
2. ผลการเปรียบเทียบระบบที่ใช้ในการแยกสารสกัดหยาบเบื้องต้น	24
3. ความบริสุทธิ์และน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี VLC.....	28
4. ความบริสุทธิ์และน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี CC.....	31
5. ความบริสุทธิ์และน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี size exclusion	35
6. น้ำหนักผลึกที่ได้จาก TP6/23.....	39
7. ความบริสุทธิ์และน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี TLC.....	39
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	43
เอกสารอ้างอิง	44

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของชันจากชันโรงขนเงินในแหล่งต่างๆ	24
ตารางที่ 4-2 ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย anisaldehyde-H ₂ SO ₄ reagent	25
ตารางที่ 4-3 แสดงค่า R _f ของสารสกัดหยาบจากชันของชันโรงขนเงินแหล่งต่างๆ	26
ตารางที่ 4-4 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธี VLC.....	28
ตารางที่ 4-5 แสดงค่า R _f ของสารที่สกัดด้วยวิธี VLC	29
ตารางที่ 4-6 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธี CC.....	32
ตารางที่ 4-7 แสดงค่า R _f ของสารที่สกัดด้วยวิธี CC.....	33
ตารางที่ 4-8 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธี size exclusion	35
ตารางที่ 4-9 แสดงค่า R _f ของสารที่สกัดด้วยวิธี size exclusion.....	37
ตารางที่ 4-10 น้ำหนักผลึกและ %yield	39
ตารางที่ 4-11 ปริมาณสารสกัด TP6/24 และ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธีชุด TLC.....	39
ตารางที่ 4-12 ปริมาณสารสกัด TP6/26 และ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธีชุด TLC.....	39

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 ลักษณะภายนอกของชั้นโรงขนเงิน <i>Tetragonula pagdeni</i>	3
ภาพที่ 2-2 วงจรชีวิตของชั้นโรงขนเงิน <i>Tetragonula pagdeni</i>	4
ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบของชั้นจากชั้นโรงขนเงิน <i>Tetragonula pagdeni</i>	12
ภาพที่ 3-2 การเตรียม TLC plate สำหรับตรวจสอบองค์ประกอบ.....	13
ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการแยกตัวอย่างด้วยวิธี VLC.....	14
ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการแยกตัวอย่างด้วยวิธี CC.....	16
ภาพที่ 3-5 ขั้นตอนการแยกตัวอย่างด้วยวิธี size exclusion chromatography	17
ภาพที่ 3-6 ขั้นตอนการตกผลึกตัวอย่าง	18
ภาพที่ 3-7 เตรียม TLC plate สำหรับการชุบ (TP6/24).....	19
ภาพที่ 3-8 การชุบ TLC plate (TP6/24)	20
ภาพที่ 3-9 ขั้นตอนการแยกตัวอย่าง TP6/24 ด้วยวิธี TLC.....	20
ภาพที่ 3-10 เตรียม TLC plate สำหรับการชุบ (TP6/26).....	21
ภาพที่ 3-11 การชุบ TLC plate (TP6/26).....	22
ภาพที่ 3-12 ขั้นตอนการแยกตัวอย่าง TP6/26 ด้วยวิธี TLC.....	22
ภาพที่ 4-1 การคำนวณค่า R_f ที่ได้จาก TLC.....	25
ภาพที่ 4-2 TLC ของสารสกัดหยาบจากแหล่งต่างๆ	26
ภาพที่ 4-3 TLC จากการแยกด้วยวิธี VLC.....	29
ภาพที่ 4-4 TLC จากการแยกสารด้วยวิธี CC.....	32
ภาพที่ 4-5 TLC จากการแยกสารด้วยวิธี size exclusion (1).....	36
ภาพที่ 4-6 TLC จากการแยกสารด้วยวิธี size exclusion (2).....	37
ภาพที่ 4-7 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัด TP6/33 (CDCl_3).....	40
ภาพที่ 4-8 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัด TP6/32 (CDCl_3).....	40
ภาพที่ 4-9 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัด TP6/34 (CDCl_3).....	41
ภาพที่ 4-10 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัด TP6/36 (CDCl_3).....	41
ภาพที่ 4-11 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัด TP6/37 (CDCl_3).....	42

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การดำรงชีวิตมนุษย์ต้องอาศัยปัจจัยพื้นฐานที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อาหาร น้ำ ที่อยู่อาศัย และยารักษาโรค ซึ่งล้วนเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นจากสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติ มนุษย์กับสิ่งแวดล้อมมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกันอย่างใกล้ชิด เนื่องจากสิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งที่เอื้อประโยชน์ให้มนุษย์ได้รับปัจจัยพื้นฐานดังกล่าว โดยเฉพาะการได้มาซึ่งยารักษาโรคจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ชั้นของผิวกิ่งและชั้นโรงสายพันธุ์ต่างๆ นับเป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง โดยจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสารสกัดจากชั้นประกอบด้วยสารในกลุ่ม flavonoids⁽²⁾ phenolics⁽³⁾ benzophenones⁽⁴⁾ และ piperidinic alkaloids⁽⁵⁾ ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่าง ๆ ได้แก่ ยับยั้งเอนไซม์ alpha glucosidase⁽³⁾ ต้านอนุมูลอิสระ⁽⁶⁾ ต้านเซลล์มะเร็ง⁽⁷⁾ เป็นต้น ชั้นโรงเป็นผิวกิ่งสายพันธุ์หนึ่งที่ไม่ค่อยมีแหล่งใน พบได้ประมาณ 400 สายพันธุ์ทั่วโลก ในทวีปอเมริกาพบมากกว่า 300 สายพันธุ์ ทวีปเอเชียภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบมากกว่า 60 สายพันธุ์⁽⁸⁾ สำหรับประเทศไทยพบมีการรายงานสายพันธุ์ของชั้นโรงโดยประมาณ 32 สายพันธุ์ พบการเลี้ยงชั้นโรงเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างจริงจังประมาณกว่า 10 กว่าปีที่ผ่านมา โดยพบการเลี้ยงใน 2 พื้นที่ คือ ทางภาคใต้ใน จ.สงขลา และภาคตะวันออก จ.จันทบุรี โดยมีวัตถุประสงค์หลักในการผสมเกสรดอกไม้และเก็บน้ำผึ้งขายเป็นรายได้⁽⁸⁾

จากข้อมูลการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากชั้นโรงของชั้นโรง พบว่าชั้นโรงของชั้นโรงชนิดเงิน *Tetragonula pagdeni* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงในจังหวัดจันทบุรีมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในชั้นโรงเพื่อนำไปสู่การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ รวมถึงยารักษาโรคต่อไปในอนาคต

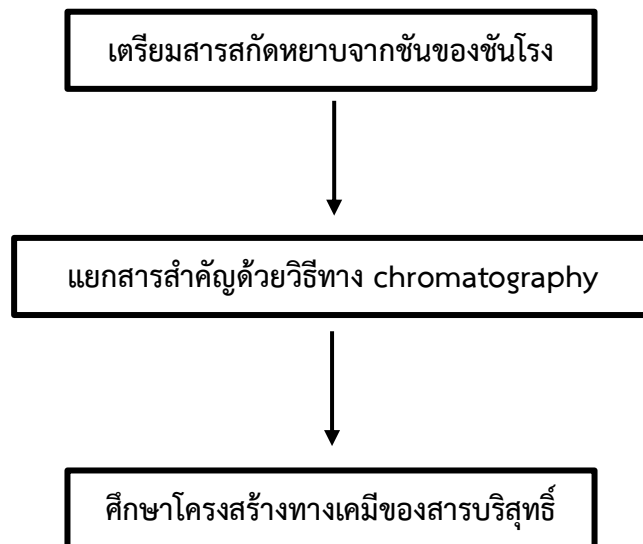
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสกัดและแยกสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในชั้นโรงจากชั้นโรงชนิดเงิน *Tetragonula pagdeni*
2. เพื่อค้นหาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากชั้นโรงชนิดเงิน *Tetragonula pagdeni*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

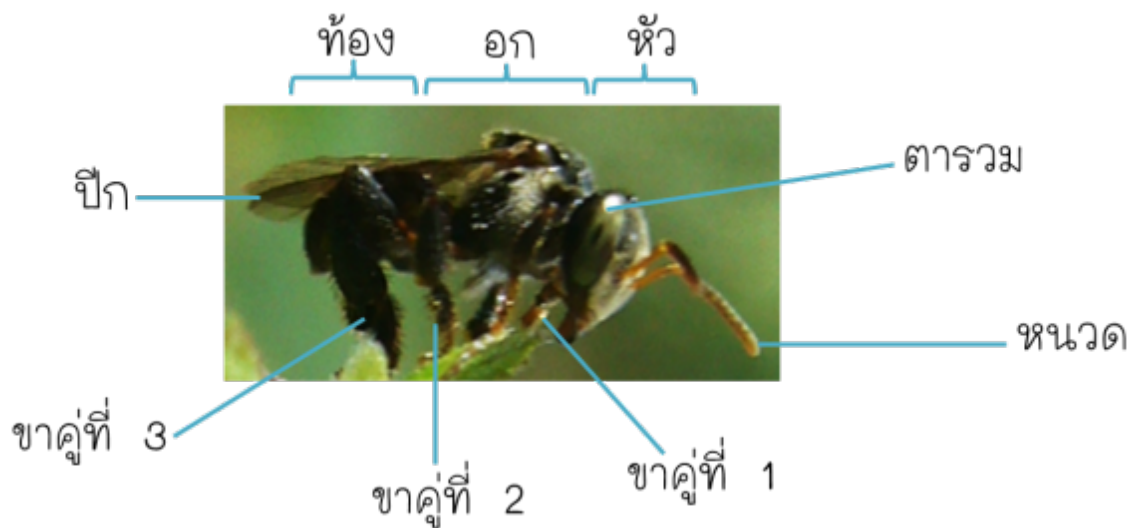
1. ทราบชนิดสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในชั้นของชั้นโรง *Tetragonula pagdeni*
2. เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และการพัฒนาไปสู่ยารักษาโรค
3. เพื่อส่งเสริมการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้กับทรัพยากรธรรมชาติในภาคตะวันออก
4. เพื่อเรียนรู้กระบวนการและขั้นตอนในการวิจัยเพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการวิจัยอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

กรอบแนวคิด



บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา



ภาพที่ 2-1 ลักษณะภายนอกของชันโรงชนิด *Tetragonula pagdeni*

1.1 ข้อมูลทั่วไปชันโรงชนิด

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tetragonula pagdeni* Schwarz

ชื่ออื่น⁽⁹⁾ : ผึ้งจิ๋ว, ชี้ตังนี, ชี้ตัง, อุง, อีโลม, ตัง, ชี้สุด

ชื่อวงศ์⁽¹⁰⁾ : Order Hymenoptera, Family Apidae; Subfamily Meliponinae

1.2 ลักษณะทางชีววิทยาของชันโรง⁽⁸⁾

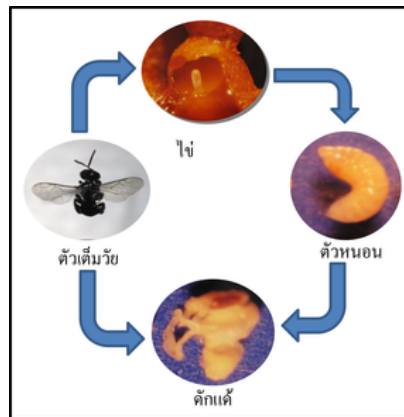
ส่วนหัว (head) ประกอบด้วยตาประกอบ 1 คู่ ตาเดี่ยว 3 ดวง มีหนวด 1 คู่ และมีกราม 1 คู่ (mandibles) ที่แข็งแรง ซึ่งชันโรงจะใช้ประโยชน์ในการต่อสู้ สร้างถ้วยอาหารหรือตัวอ่อน มีขนบริเวณตาเดี่ยวเป็นขนแข็งแรง และขนละเอียด อวัยวะภายในส่วนหัวมีต่อมอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ ระบบต่อมน้ำลาย (salivary gland system) ต่อมริมฝีปากล่าง (labial gland) มีท่อเปิด (salivary duct) ไปที่ฐานของลิ้น ทำหน้าที่ผลิตสารคัดหลั่งน้ำมันเพื่อใช้หล่อลื่นส่วนของปาก ย่อยและแปรรูปอาหาร

ส่วนอก (thorax) มีขนาดใหญ่ เป็นลักษณะเด่นของชันโรงทั่วไป ที่อกมีปีก 2 คู่ ปีกคู่หน้ายื่นออกไปนอกลำตัวคลุมส่วนของท้องทั้งหมด มีขา 3 คู่ โดยขาคู่หลังยาวกว่าความยาวของลำตัวเพื่อตัวรับชันผึ้งที่ปากได้ ออกด้านบนมีแถบขน

ส่วนท้อง (abdomen หรือ metasoma) มีต่อมไขผึ้ง (wax gland) อยู่ใต้ผิวหนังของส่วนท้องด้านบน ซึ่งตรงข้ามกับผึ้งรวงที่มีต่อมไขผึ้งอยู่ใต้ท้อง มีต่อมน้ำพิษแต่ไม่มีน้ำพิษ ที่ส่วนท้องของชันโรงมีเหล็กในแต่ไม่พัฒนาหรือทำหน้าที่เป็นหลักไม่ได้ ส่วนท้องของชันโรงมีขนาดเล็กทำให้กระเพาะน้ำผึ้งมีขนาดเล็กไปด้วย

1.3 วงจรชีวิตของชันโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni*⁽⁸⁾

จากการศึกษาชีววิทยาชันโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni* ของ อัญชลีและคณะ⁽⁸⁾ พบว่าชันโรงขนเงินชนิดนี้มักอาศัยในโพรงธรรมชาติเหนือดิน โดยพบทั้งโพรงในต้นไม้และตามอาคารบ้านเรือน โดยมีปากทางเข้ารังเป็นท่อสั้น ๆ ถ้วยตัวอ่อนและถ้วยอาหารมีลักษณะเป็นกลุ่ม (cluster type) วงจรชีวิตมี 4 ระยะ คือ 1.ระยะไข่ใช้เวลา 7 วัน 2.ระยะหนอนใช้เวลา 19 วัน 3.ระยะดักแด้ใช้เวลา 22 วัน 4.ระยะตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 35 วัน โดยระยะไข่ ระยะตัวหนอน และระยะดักแด้จะอยู่ในถ้วยตัวอ่อนที่จะถูกสร้างด้วยไขผึ้งและยางไม้ โดยทั่วไปที่มีไขอยู่ภายในจะมีสีเข้ม หลังจากนั้นผนังของถ้วยซึ่งประกอบด้วยไขผึ้งและชัน จะถูกนำไปสร้างถ้วยใหม่ จึงทำให้สีของถ้วยจางและผนังถ้วยนี้มลง ดังนั้นสีของถ้วยจึงสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของตัวอ่อนภายใน



ภาพที่ 2-2 วงจรชีวิตของชันโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni*

2. ประโยชน์และฤทธิ์ทางชีวภาพของชันจากชันโรง

2.1 ข้อมูลการใช้ประโยชน์จากภูมิปัญญาท้องถิ่น

ในอดีตนำชันมาใช้ในการอุดท่อน้ำ อุดฐานพระ เพื่อซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย⁽¹¹⁾ การใช้ประโยชน์จากน้ำผึ้งของชันโรงโดยนำมาเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ⁽¹¹⁾ เช่น สบู่ ยาสีฟัน

เครื่องสำอาง เพื่อบำรุงผิวพรรณทั้งใบหน้าและร่างกาย บำรุงเส้นผม นอกจากนี้ ยังมีการใช้ชันโรงในการผสมเกสรเพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชเศรษฐกิจ เช่น มะระจีน⁽¹²⁾ กาแฟ⁽¹³⁾ สตรอเบอร์รี่⁽¹⁴⁾

2.2 การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพจากชันโรง

ในการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามียางชันโรงฤทธิ์ทางชีวภาพของการสกัดชันจากชันโรง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ^(3,15) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง^(4,7,15) ฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านการอักเสบ⁽¹⁵⁾ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase⁽³⁾

2.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาของ Vongsak B., et al., 2015⁽³⁾ พบว่าสารสกัดจากชันของชันโรง *Tetragonula pagdeni*, *Lepidotrigona ventralis* และ *L. terminata* เมื่อทดสอบด้วย FRAP assay มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 61.14 ถึง 279.70 $\mu\text{mol FeSO}_4$ equivalent/g เปรียบเทียบกับ ascorbic acid (positive control) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7698.02 ± 698.03 $\mu\text{mol FeSO}_4$ -equivalent/g เมื่อทดสอบด้วย ABTS assay (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 59.52 ถึง 605.39 $\mu\text{g/mL}$ เปรียบเทียบกับ ascorbic acid (positive control) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.09 ± 1.69 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อทดสอบด้วย DPPH assay มีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 122.71 ถึง 1228.89 $\mu\text{g/mL}$ เปรียบเทียบกับ ascorbic acid (positive control) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.33 ± 0.85 $\mu\text{g/mL}$

จากการศึกษาของ Campos J., et al., 2015⁽¹⁵⁾ พบว่าสารสกัดจากชันของชันโรง *Tetragonisca fiebrigi* เมื่อทดสอบด้วย ABTS assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 119.6 ± 20.5 $\mu\text{g/mL}$ และมีค่า maximum inhibition เท่ากับ $86.5 \pm 2.8\%$ ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ เปรียบเทียบกับ ascorbic acid (positive control) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.3 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$ และมีค่า maximum inhibition เท่ากับ $99.5 \pm 0.2\%$ ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อทดสอบการยับยั้ง AAPH-induced lipid peroxidation สารสกัดสามารถลดการเกิด malondialdehyde ได้ $35.9 \pm 2.4\%$ ที่ความเข้มข้น 125 $\mu\text{g/mL}$

2.2.2 ฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาของ Campos J., et al., 2015⁽¹⁵⁾ พบว่าสารสกัดจากชันของชันโรง *T. fiebrigi* ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแกรมบวกและเชื้อแกรมลบ ดังนี้ *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 1.5 ± 0.14 ถึง 15.50 ± 0.29 mg/mL

2.2.3ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากการศึกษาของ Campos J., et al., 2015⁽¹⁵⁾ พบว่าสารสกัดจากชันของชันโรง *T. febrigi* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ hyaluronidase โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ (75 mg/mL) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ $43.06 \pm 3.06\%$

2.2.4ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase

จากการศึกษาของ Vongsak B., et al., 2015⁽³⁾ พบว่าสารสกัดจากชันของชันโรง *Tetragonula pagdeni*, *Lepidotrigona ventralis* และ *L. terminata* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดจากชันของชันโรงชนิด *Tetragonula pagdeni* เท่ากับ $70.79 \pm 6.44 \mu\text{g/mL}$ เปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ต่ำกว่าของ acarbose (positive control) เท่ากับ $155.82 \pm 6.69 \mu\text{g/mL}$

2.2.5ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

จากการศึกษาของ Da Cunha, MG. et al., 2013⁽⁴⁾ พบว่าสารสกัดจากชันของชันโรง *Melipona scutellaris* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Glioma (U251), Melanoma (UACC-62), Breast (MCF-7), Multidrug resistant ovarian (NCI/ADR-RES), Kidney (786-0), Lung (NCI-H460), Prostate (PC-3), Ovarian (OVCAR-3)) โดยมีค่า Total growth inhibition (TGI) อยู่ระหว่าง 10.90 ถึง $32.26 \mu\text{g/mL}$ และการยับยั้งเซลล์ปกติ (keratinocytes (HaCaT), 3T3) ต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่า $40 \mu\text{g/mL}$ เปรียบเทียบกับ Doxorubicin (positive control) ซึ่งมีค่า TGI สำหรับการยับยั้งเซลล์มะเร็งอยู่ระหว่าง 0.22 ถึง $6.19 \mu\text{g/mL}$ และการยับยั้งเซลล์ปกติมีค่าเท่ากับ $0.96 \mu\text{g/mL}$

จากการศึกษาของ Vongsak B., et al., 2016⁽⁷⁾ พบว่าสารสกัดจากชันของชันโรง *Tetragonula pagdeni*, *Lepidotrigona ventralis* และ *L. terminata* สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ได้ โดยสารสกัดจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Papilloma carcinoma (KB), Hepatocellular carcinoma (HepG2), Colon adenocarcinoma (Caco-2) และ Melanoma (SK-MEL-28)) โดยค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 33.38 ± 3.30 ถึง $80.81 \pm 2.68 \mu\text{g/mL}$ ในขณะที่การยับยั้งเซลล์ปกติของมนุษย์ (Fibroblast (Hs68)) ค่า IC_{50} เท่ากับ $228.75 \pm 10.64 \mu\text{g/mL}$ โดยเปรียบเทียบกับ Doxorubicin (positive control) ซึ่งค่า IC_{50} ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งอยู่ระหว่าง 2.04 ± 0.12 ถึง $54.66 \pm 1.89 \mu\text{g/mL}$ ในขณะที่การยับยั้งเซลล์ปกติของมนุษย์มีค่า IC_{50} เท่ากับ $65.93 \pm 4.43 \mu\text{g/mL}$

จากการศึกษาของ Campos J., et al., 2015⁽¹⁵⁾ พบว่าสารสกัดจากชั้นของชั้นโรง *T. fiebrigi* ที่ความเข้มข้นสูงที่ใช้ในการทดลอง (500 µg/mL) สามารถลดการเจริญเติบโตของ erythroleukemia (K562) cell line ได้ถึง 67±2.5%

3. การสกัดแยกสารสำคัญจากตัวอย่างชั้นของชั้นโรงที่พบในรายงานการวิจัย

จากการศึกษาของ Vongsak B., et al., 2015⁽³⁾ ผู้วิจัยได้สกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี sonication (40°C, 20 นาที) โดยใช้ตัวทำละลาย hexane แล้ว centrifugation (2,000 x g, 20°C, 5 นาที) เพื่อนำ wax ออก แล้วสกัดตะกอนที่เหลือด้วยตัวทำละลาย 80% ethanol ด้วยวิธี sonication (40°C, 30 นาที) แล้ว centrifugation (3,000 x g, 20°C, 5 นาที) ได้เป็น ethanol-crude extract จากนั้นแยกสาร 2 ขั้นตอนด้วย column chromatography (SiO₂, 20% ethyl acetate in hexane) และ thin-layer chromatography (SiO₂, 50% ethyl acetate in hexane), (SiO₂, 100% dichloromethane) แล้ววิเคราะห์ด้วย NMR spectroscopy จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยข้อมูลทาง spectrometry พบว่าสารสำคัญที่แยกได้คือ γ -mangostin และ α -mangostin

จากการศึกษาของ Da Cunha MG., et al., 2013⁽⁴⁾ ผู้วิจัยได้สกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี reflux (70°C, 30 นาที) โดยใช้ตัวทำละลาย ethanol (1:7 w/v) แล้วนำไปกรอง ได้ ethanol-crude extract นำมา partition (hexane, chloroform และ ethyl acetate) จากนั้นแยกสารโดยวิธี HPLC (RP-18, gradient system; water/acetic acid (19:1, v/v) และ methanol, flow rate 1mL/min) แล้ววิเคราะห์สารสกัดด้วย Gas chromatography-mass spectrometry (60°C to 240°C, increasing at 3°C/min, Helium, flow rate 1 mL/min) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยข้อมูลทาง GC-MS พบว่าสารสำคัญที่แยกได้คือ 2-propensaeure-3-phenyl-trimethylsilylether และ 1,2-benzenedicarboxylic acid

จากการศึกษาของ Cisilotto J., et al., 2018⁽⁵⁾ ผู้วิจัยได้สกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี maceration (ที่อุณหภูมิห้อง, 30 วัน) โดยใช้ตัวทำละลาย 70% ethanol แยกสารโดย UPLC (RP-18, gradient system; 0.1% formic acid in water:acetonitrile, flow rate 0.3 mL/นาที) แล้ววิเคราะห์ด้วย Liquid chromatography-mass spectrometry พบสารที่เป็นองค์ประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย UPLC และ MS คือ lelobanonoline และ norlobeline (piperidic alkaloids)

จากการศึกษาของ Kustiawan P., et al., 2015⁽¹⁶⁾ ผู้วิจัยได้สกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี maceration โดยแช่ตลอดเวลา (100 rpm, room temperature, 24 ชั่วโมง) โดยใช้ตัวทำละลาย 96% methanol แล้ว partition ด้วย *n*-hexane และ ethyl acetate และแยกสารด้วย column chromatography (SiO₂, gradient polarity system; hexane, dichloromethane, methanol), column chromatography (SiO₂, gradient polarity system; hexane, ethyl

acetate, methanol), size exclusion (Sephadex LH-20 column, gradient polarity system; hexane:ethyl acetate) จากการแยกสารและการพิสูจน์เอกลักษณ์ทาง spectroscopy พบว่าสารองค์ประกอบที่แยกได้คือ cardol

จากการศึกษาของ Umthong S., et al., 2011^(17,18) ผู้สกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี maceration โดยเขย่าตลอดเวลา (100 rpm, 15°C, 20 ชั่วโมง) โดยใช้ตัวทำละลาย 95% ethanol แล้วนำไป centrifugation (7,000 rpm, 15°C, 15 นาที) จากนั้น evaporation (40°C) นำสารมา partition (hexane และ dichloromethane) แยกสารด้วย column chromatography (SiO₂, gradient polarity system; hexane, dichloromethane, methanol), Size exclusion (Sephadex LH-20, gradient polarity system; dichloromethane, methanol) และ TLC (SiO₂, gradient polarity system; hexane, dichloromethane)

จากการศึกษาของ Charernsriwilaiwat N., et al., 2018⁽¹⁹⁾ ผู้วิจัยสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี maceration ที่อุณหภูมิห้อง โดยตัวทำละลาย ethanol นำไปทำให้แห้งด้วย evaporation จากนั้นแยกสารสำคัญด้วย HPLC (C18, gradient system; acetonitrile:0.1% phosphoric acid) สารองค์ประกอบที่แยกได้คือ α -mangostin

จากการศึกษาของ Rosli NL., et al., 2016⁽²⁰⁾ ผู้วิจัยสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธี maceration เขย่าตลอดเวลา (300 rpm, 37°C, 24 ชั่วโมง) โดยตัวทำละลาย ethanol แล้ว centrifugation (3,000 rpm, 10 นาที) ได้เป็น ethanol-crude extract แยกสารด้วย HPLC (C18, gradient system; methanol:acetonitrile:water, flow rate 1.2 mL/min) ได้สารบริสุทธิ์คือ caffeic acid

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. เครื่องมือ วัสดุ/เครื่องแก้ว และสารเคมี

1.1 ชั้นของชั้นโรงในงานวิจัย

- ชั้นของชั้นโรงขนเงิน (*Tetragonula pagdeni*) จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ นาข้าว, สวนดอกไม้ 1 จ.นนทบุรี, สวนดอกไม้ 2 จ.นนทบุรี, สวนสมุนไพร จ.จันทบุรี, สวนส้มโอ จ.จันทบุรี, ป่าชายเลน จ.จันทบุรี

1.2 วัสดุ

- กระดาษกรอง no.1 (filter paper) Whatman®
- กรวยกรอง (funnel) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 cm
- ปีกเกอร์ (beaker) 150 mL, 250 mL, 500 mL, 1,000 mL
- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod) ขนาด 8 นิ้ว
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) 250 mL, 500 mL
- หลอดหยด (dropper) + จุกยาง silicone 2 mL
- กระบอกตวง (cylinder) 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL
- กระจกนาฬิกา (watch glass) เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 mm
- หลอดเซนตริฟิวก์ (ependorf)
- หลอดแคปิลลารี (capillary tube)
- กระดาษทรายละเอียด
- โถวางแผ่น TLC (TLC tank)
- TLC Silica gel 60 F₂₅₄
- พาสเจอร์ไพเปต (pasteur pipette) ความยาว 230 mm
- คอลัมน์สำหรับ Vacuum liquid chromatography (VLC column)
- Suction flask 500 mL
- Glass column 500 mL
- คอลัมน์สำหรับ Classic column chromatography (CC Column) เส้นผ่าน-
ศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 70 cm Sephadex LH-20

- กระดาษกรองหยาบ
- ขวดสเปรย์ 50 mL
- คีม (Forcep)
- Silica gel 60 for Flash column
- vial 20 mL
- ขวดแก้วรับ fraction ขนาด 100 mL
- สำลี
- ฟอยล์อะลูมิเนียม (foil)
- ขวดดูแรน (Duran® laboratory bottle) 50 mL, 1,000 mL
- Buchner funnel

1.3 อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง (balance) 2 ตำแหน่ง รุ่น MS3002S และ 4 ตำแหน่ง รุ่น MS204 (METTLER TOLEDO®, Switzerland)
- เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) รุ่น WiseClean® WUC-D22H (Wisd. laboratory instrument, Germany)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, Germany)
- TLC UV cabinet รุ่น CAMAG® UV Cabinet4 (CAMAG, Switzerland)
- เครื่องระเหยด้วยการลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) รุ่น v-750 (Buchi, Switzerland)
- เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) รุ่น Labconco® FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dryers (LABCONCO, United States)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น MPW-260R (MPW, Poland)
- ปั๊มลม (pump) รุ่น DOA-P504-BN (GAST, China)
- ตู้ดูดควัน (Fume hood) รุ่น EASY LAB® (S.K.POWERABLE, Thailand)
- เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (Hot plate & stirrer) รุ่น C-MAG HS7

1.4 สารเคมี

- Distilled water
- Methanol (AR grade) Scharlau (Barcelona, Spain)

- Ethyl acetate (AR grade) Scharlau® (Barcelona, Spain)
- Dichloromethane (AR grade) CHEMLAB (Zedelgem, Belgium)
- Hexane (AR grade) J.T.Baker® (Avantor, United States)
- Glacial acetic acid (QReC, New Zealand)
- Concentrated H₂SO₄

2. วิธีการดำเนินการทดลอง

2.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากชิ้นของชิ้นโรจนเงิน *Tetragonula pagdeni*

2.1.1 ชั่งตัวอย่างชิ้นจากแต่ละแหล่งให้มีน้ำหนักประมาณ 25 g บันทึกน้ำหนัก แนนอน ลดขนาด และใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 mL

2.1.2 กำจัด wax โดยสกัดตัวอย่างชิ้นด้วยตัวทำละลาย hexane ปริมาตร 250 mL ด้วยการ sonicate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

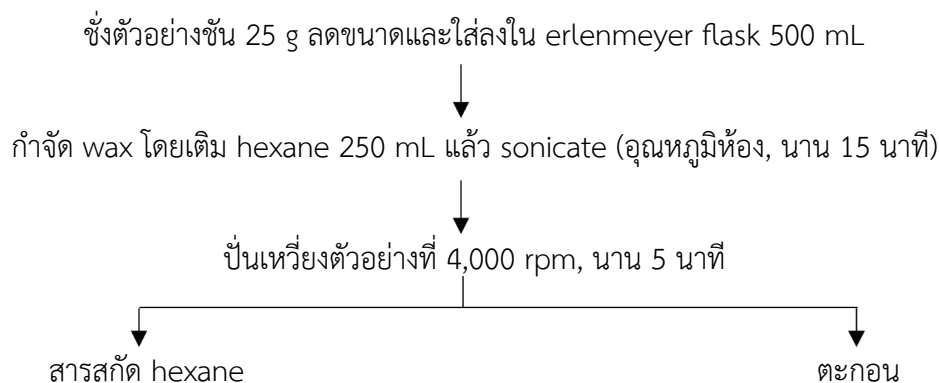
2.1.3 แยกตะกอนกับสารสกัด hexane ด้วยการปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 4,000 rpm. นาน 5 นาที แล้วเก็บตะกอน และการสกัดแยกออกจากกัน

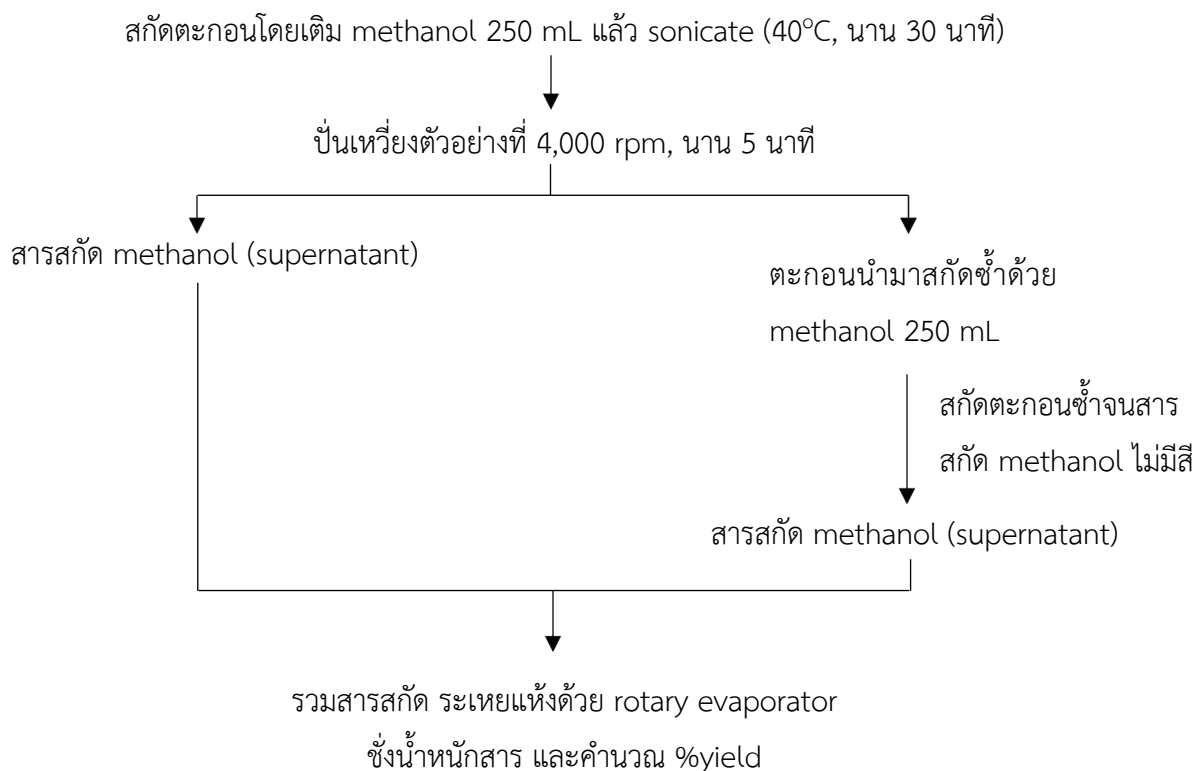
2.1.4 สกัดตะกอนซ้ำอีก 1-2 ครั้งด้วยสารละลาย hexane ปริมาตร 250 mL เพื่อ กำจัด wax จากตัวอย่างจนหมด

2.1.5 สกัดตะกอนที่เหลือจากการกำจัด wax แล้วด้วย methanol ปริมาตร 250 mL ด้วยการ sonicate ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 30 นาที

2.1.6 แยกตะกอนกับสารสกัด methanol ด้วยการปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 4,000 rpm. นาน 5 นาที เก็บชิ้นสารละลาย

2.1.7 สกัดตะกอนที่เหลือด้วย methanol ปริมาตร 250 mL ข้างบนสารละลายมีสี จางลงจนเกือบไม่มีสี ระเหยตัวทำละลาย methanol ได้เป็น methanol-crude extract จากนั้นชั่ง น้ำหนักสารที่ได้





ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบของชันจากชันโรงชนิด *Tetragonula pagdeni*

2.2 หาระบบสำหรับการแยกสารสกัดด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)

2.2.1 เตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทำ TLC จากสารสกัดในข้อ 2.1.7 โดยละลายด้วย ethyl acetate และ methanol

2.2.2 เตรียมระบบตัวทำละลายใน TLC tank ดังนี้

Stationary phase : SiO₂ 60 F₂₅₄ on aluminum sheet ขนาด 6.5x6.5 cm

Mobile phases : 2 ระบบได้แก่ hexane:ethyl acetate (3:2) และ dichloromethane:methanol (9:1)

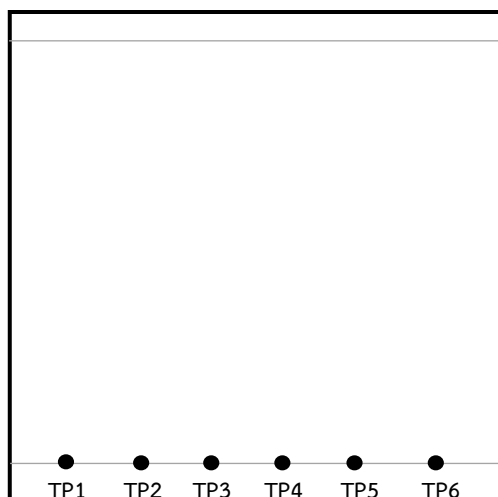
2.2.3 นำสารสกัดหยาบจากข้อ 2.2.1 มา spot บนแผ่น TLC (รูปที่ 3-2) โดยใช้หลอดแคปิลลารีขนาดเล็กดูดสารละลายตัวอย่าง spot ลงบน แผ่น TLC ขนาด 6.5x6.5 cm โดยให้แต่ละจุดห่างจากขอบด้านข้างและ spot ข้างเคียง 0.5 cm

2.2.4 นำแผ่น TLC ที่ spot สารเสร็จแล้ว และตัวทำละลายระเหยจนแห้งแล้ว วางลงใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลาย (mobile phase) ที่เตรียมไว้ โดยมีกระดาษกรองให้ TLC tank อิ่มตัวด้วยไอระเหยของ mobile phase

2.2.5 รอจน mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นก็ให้นำแผ่น TLC ออกจาก TLC tank รอให้แห้ง และทำการสังเกต spot บน TLC chromatogram ด้วยวิธีต่อไปนี้

- 1) สังเกตสีด้วยตาเปล่า ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้
- 2) สังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้
- 3) นำแผ่น TLC มาสเปรย์ด้วย anisaldehyde-H₂SO₄ reagent แล้วให้ความร้อนที่ 120°C สังเกตสีและวง spot ที่พบ
- 4) คำนวณหาค่า R_f ของแต่ละ spot โดยค่า R_f สามารถคำนวณได้จาก

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่}}$$



TLC 1 แผ่น ประกอบด้วย 6 จุด

จุด TP1 คือสารสกัดจากแหล่ง นาข้าว

จุด TP2 คือสารสกัดจากแหล่ง สวนดอกไม้ 1

จุด TP3 คือสารสกัดจากแหล่ง สวนดอกไม้ 2

จุด TP4 คือสารสกัดจากแหล่ง สวนสมุนไพร

จุด TP5 คือสารสกัดจากแหล่ง สวนส้มโอ

จุด TP6 คือสารสกัดจากแหล่ง ป่าชายเลน

ภาพที่ 3-2 การเตรียม TLC plate สำหรับตรวจสอบองค์ประกอบ

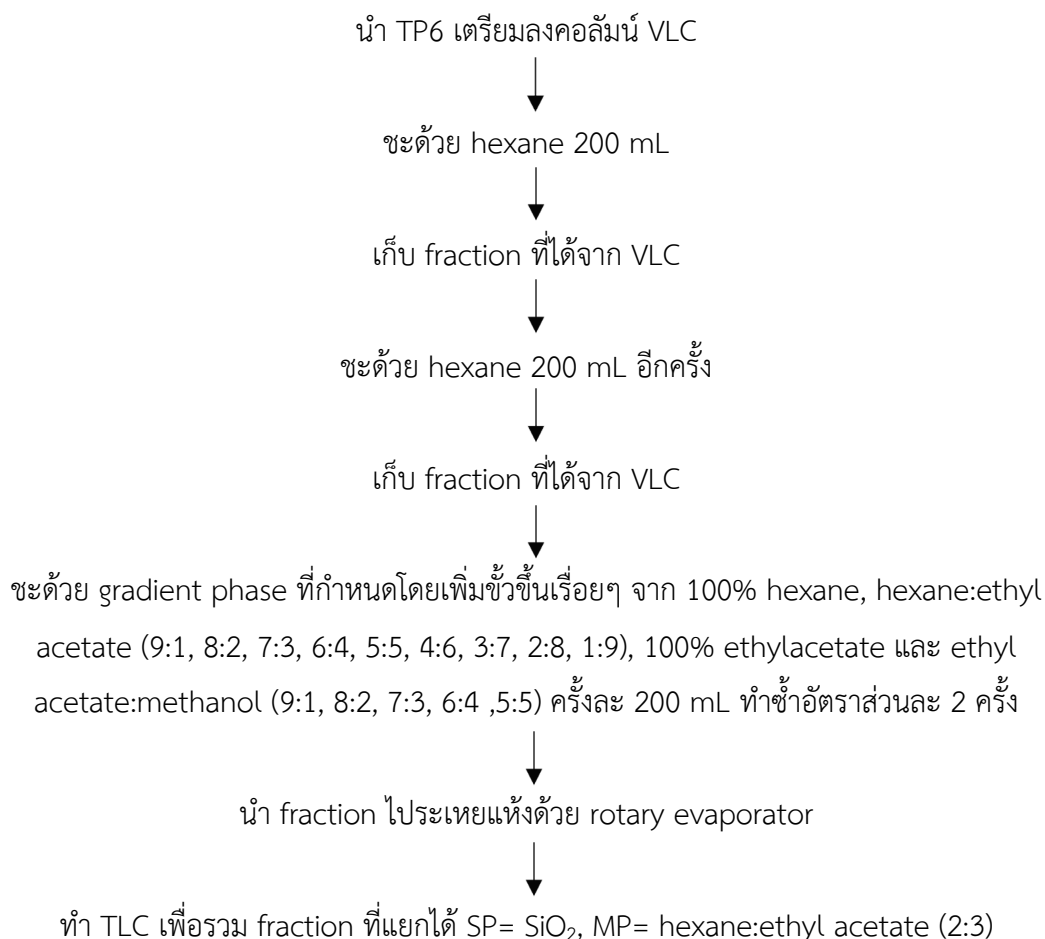
2.3 แยกตัวอย่างด้วยวิธี Vacuum liquid chromatography (VLC)

2.3.1 เตรียมสารสกัดที่สนใจ คือ TP6 โดยการผสมสารสกัดกับ SiO₂ ที่ไว้ 1 คืนให้แห้งใน vacuum desiccator และทำการเตรียมคอลัมน์สำหรับการทำ VLC (SiO₂, gradient polarity mobile phase; hexane, ethyl acetate, methanol)

2.3.2 เตรียม column ด้วย SiO₂ และนำสารสกัดลงคอลัมน์แล้ว ชะด้วย gradient polarity mobile phase ในข้อ 2.3.1 เริ่มจากช้าไปเร็ว โดยจะชะอัตราส่วนละ 2 ครั้ง ครั้งละ 200 mL

2.3.3 ระเหยสารสกัด เพื่อนำตัวทำละลายออกด้วยการลดความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำ TLC เพื่อรวม fraction ซึ่งนำหนักสารที่ได้ โดย fraction ที่ได้จาก VLC มี

จำนวน 8 fractions ดังนี้ TP6/1 (7.3 mg), TP6/2 (131 mg), TP6/3 (142 mg), TP6/4 (377 mg), TP6/5 (52 mg), TP6/6 (478 mg), TP6/7 (490 mg), TP6/8 (121 mg)



ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการแยกตัวอย่างด้วยวิธี VLC

2.4 รวม fraction จาก VLC ด้วยวิธี TLC

2.4.1 เตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทำ TLC จากสารสกัดในข้อ 2.3.3

2.4.2 เตรียมระบบตัวทำละลายใน TLC tank ดังนี้

Stationary phase : SiO₂ 60 F₂₅₄ on aluminum sheet ขนาด 6.5x10 cm

Mobile phase : hexane:ethyl acetate (2:3)

2.4.3 นำสารสกัดมา spot บนแผ่น TLC โดยใช้หลอดแคปิลลารีขนาดเล็กดูดสารละลายตัวอย่าง spot ลงบน แผ่น TLC ขนาด 6.5x10 cm โดยให้แต่ละจุดห่างจากขอบด้านข้าง 0.5 cm

2.4.4 นำแผ่น TLC ที่ spot สารเสร็จแล้ว และตัวทำละลายระเหยจนแห้งแล้ว วางลงใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลาย (mobile phase) ที่เตรียมไว้ โดยมีกระดาษกรองเพื่อให้เกิดการอ้อมตัวของตัวทำละลายใน TLC tank

2.4.5 รอจน mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก TLC tank และทำการสังเกต TLC chromatogram ด้วยวิธีต่อไปนี้

- 1) สังเกตสีด้วยตาเปล่า ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้
 - 2) สังเกตภายใต้แสง UV chamber ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้
 - 3) นำแผ่น TLC มาสเปรย์ด้วย anisaldehyde-H₂SO₄ reagent แล้วให้ความร้อนที่ 120°C สังเกตสีและวง spot ที่พบ
 - 4) คำนวณหาค่า R_f ของแต่ละ spot
- โดย fraction ที่เลือกมาทำการแยก ในขั้นตอนต่อไปคือ TP6/4

2.5 แยกตัวอย่างด้วยวิธี Classic Column chromatography (CC)

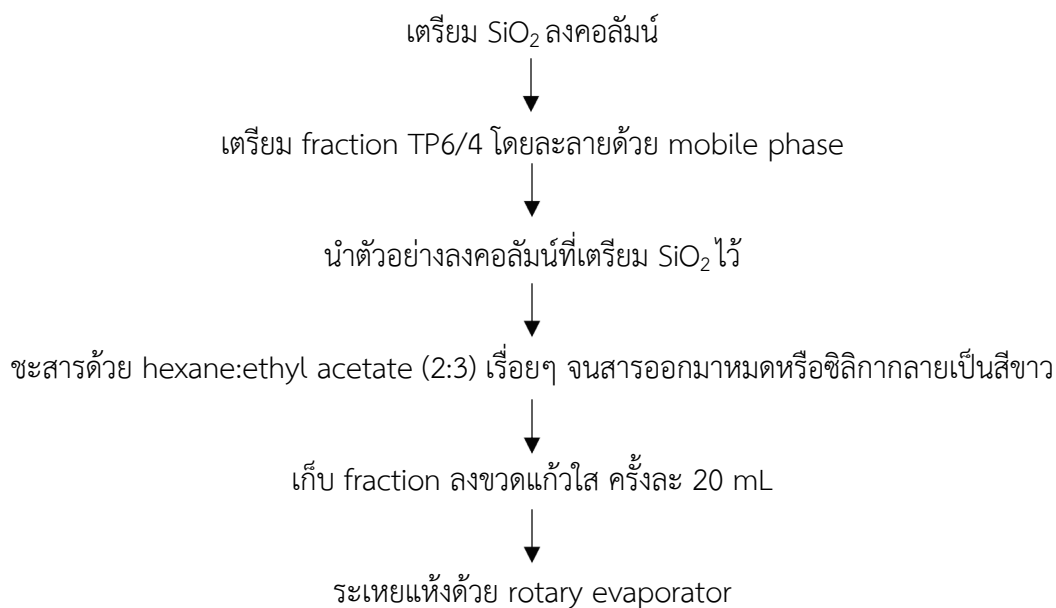
2.5.1 เตรียม fraction TP6/4 ที่มี major compound และทำการเตรียมคอลัมน์สำหรับการทำ CC โดยระบบที่ใช้ในการแยกสารสกัดมีดังนี้

Stationary phase : SiO₂

Mobile phase : hexane:ethyl acetate 2:3

2.5.2 หลังจากเตรียมสารสกัดลงคอลัมน์แล้ว ทำการชะด้วย mobile phase อย่างต่อเนื่อง โดยเก็บ fraction ที่ได้ครั้งละ 20 mL เก็บจนกว่าสารในคอลัมน์จะถูกชะออกมาจนหมด หรือ SiO₂ กลายเป็นสีขาว

2.5.3 ระเหย fraction ที่ได้ เพื่อนำ mobile phase ออกด้วยด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งน้ำหนัก fractions ที่ได้ มีจำนวน 8 fractions ดังนี้ TP6/9 (20.8 mg), TP6/10 (29.7), TP6/11 (20.1 mg), TP6/12 (67 mg), TP6/13 (40.7), TP6/14 (20.4), TP6/15 (15.8) และ TP6/16 (5.4 mg)



ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการแยกตัวอย่างด้วยวิธี CC

2.6 รวม fraction จาก CC chromatography ด้วยวิธี TLC

2.6.1 เตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทำ TLC จากสารสกัดในข้อ 2.5.3 โดยละลายด้วย ethyl acetate

2.6.2 เตรียมระบบตัวทำละลายใน TLC (SiO₂, mobile phase; hexane:ethyl acetate 2:3)

2.6.3 นำสารสกัดมา spot บนแผ่น TLC โดยใช้หลอดแคปิลลารีขนาดเล็กดูดสารละลายตัวอย่าง spot ลงบน แผ่น TLC ขนาด 6.5x14 cm โดยให้แต่ละจุดห่างจากขอบด้านข้าง 0.5 cm

2.6.4 นำแผ่น TLC ที่ spot สารเสร็จแล้ว และตัวทำละลายระเหยจนแห้งแล้ว วางลงใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลาย (mobile phase) ที่เตรียมไว้ โดยมีกระดาษกรองเพื่อทำให้เกิดการอิมตัวของตัวทำละลายใน TLC tank

2.6.5 รอน mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก TLC tank และทำการสังเกต TLC chromatogram ด้วยวิธีต่อไปนี้

- 1) สังเกตสีด้วยตาเปล่า ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้
- 2) สังเกตภายใต้แสง UV chamber ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

3) นำแผ่น TLC มาสเปรย์ด้วย anisaldehyde-H₂SO₄ reagent แล้วให้ความร้อนที่ 120°C สังเกตสีและวง spot ที่พบ

4) คำนวณหาค่า R_f ของแต่ละ spot

เนื่องจากการแยกด้วยวิธี Column chromatography สังเกตจาก TLC plate พบว่า spot ที่ได้มีความซับซ้อน ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ จึงทำการแยกสารต่อด้วยวิธี size exclusion chromatography โดย fraction ที่เลือกมาทำการแยกต่อคือ TP6/12 (67 mg)

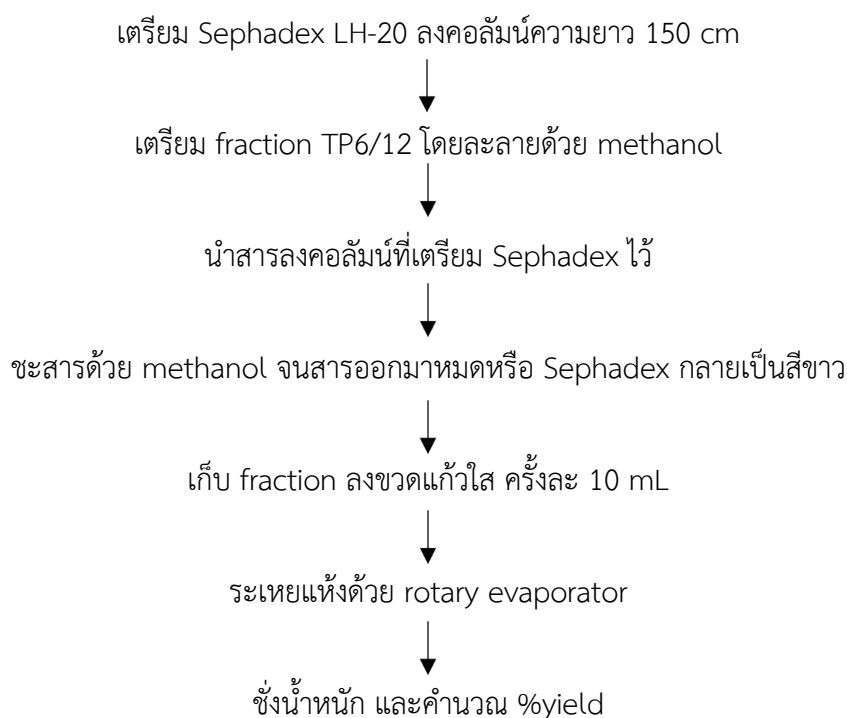
2.7 แยกตัวอย่างด้วยวิธี size exclusion chromatography

2.7.1 เตรียม fraction TP6/12 โดยละลายด้วย methanol

2.7.2 เตรียมคอลัมน์สำหรับทำ size exclusion chromatography (stationary phase; Sephadex LH-20 column, mobile phase; methanol)

2.7.3 เก็บ fraction ครึ่งละ 10 mL โดยเก็บต่อเนื่องจนกว่าสารจะออกมาหมด

2.7.4 นำ fraction ที่ได้ไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator แล้วชั่งน้ำหนักและทำ TLC เพื่อดูองค์ประกอบทางเคมีใน fractions ที่แยกได้ โดย fraction ที่แยกได้มีจำนวน 15 fractions ดังนี้ TP6/17 (0.5 mg), TP6/18 (1.5 mg), TP6/19 (1.1 mg), TP6/20 (0.8 mg), TP6/21 (1.0 mg), TP6/22 (3.2 mg), TP6/23 (17.1 mg), TP6/24 (17.4 mg), TP6/25 (3.2 mg), TP6/26 (1.2 mg), TP6/27 (0.3 mg), TP6/28 (1.2 mg), TP6/29 (0.4 mg), TP6/30 (1.2 mg), TP6/31 (0.8 mg)



ภาพที่ 3-5 ขั้นตอนการแยกตัวอย่างด้วยวิธี size exclusion chromatography

2.8 การตกผลึกตัวอย่าง

2.8.1 เติมน methanol ลงไปเพื่อให้เกิด crystallization เป็นเวลา 24 ชม.

2.8.2 เก็บผลึก และชั่งน้ำหนักผลึกที่ได้

เติมน methanol ลงใน TP6/23 ทิ้งไว้ 24 ชม.



แยกตะกอนและสารละลายด้วยพาสเจอร์รีเปต



เก็บผลึก และชั่งน้ำหนัก

ภาพที่ 3-6 ขั้นตอนการตกผลึกตัวอย่าง

2.9 หาระบบที่เหมาะสมสำหรับการแยก TP6/24 ด้วยวิธี TLC

2.9.1 เตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทำ TLC จากสารสกัดในข้อ 2.7.4 โดยละลายด้วย ethyl acetate

2.9.2 เตรียมระบบตัวทำละลายใน TLC tank ดังนี้

Stationary phase : SiO_2 60 F₂₅₄ on aluminum sheet ขนาด 6.5x2.5 cm

Mobile phase : hexane:ethyl acetate (4:1, 3:2 และ 1:1), hexane:ethyl acetate with acetic acid (4:1, 3:2 และ 1:1)

2.9.3 นำสารสกัดจากข้อ 2.9.1 มา spot บนแผ่น TLC (รูปที่ 3-1) โดยใช้หลอดแคปิลลารีขนาดเล็กดูดสารละลายตัวอย่าง spot ลงบน แผ่น TLC ขนาด 6.5x2.5 cm โดย spot ห่างจากขอบ ข้างละ 0.5 cm

2.9.4 นำแผ่น TLC ที่ spot สารเสร็จแล้ว และตัวทำละลายระเหยจนแห้งแล้ว วางลงใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลาย (mobile phase) ที่เตรียมไว้ โดยมีกระดาษกรองเพื่อให้เกิดการอิมตัวของตัวทำละลายใน TLC tank

2.9.5 รอจน mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก TLC tank และทำการสังเกต TLC chromatogram ด้วยวิธีต่อไปนี้

1) สังเกตด้วยตาเปล่า ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

2) สังเกตภายใต้แสง UV chamber ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

3) คำนวณหาค่า R_f ของแต่ละ spot

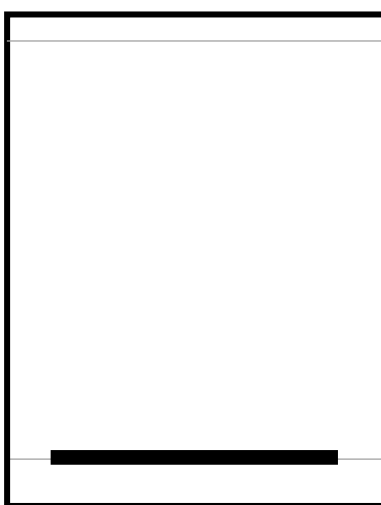
โดย mobile phase ที่เลือกใช้คือ hexane:ethyl acetate 3:2

2.10 แยกตัวอย่าง TP6/24 ด้วยวิธี TLC

2.10.1 เตรียม TP6/24 โดยละลายด้วย ethyl acetate

2.10.2 เตรียมระบบตัวทำละลายใน TLC tank (SiO_2 , mobile phase; hexane:ethyl acetate 3:2)

2.10.3 นำสารสกัดจากข้อ 2.10.1 มา spot บนแผ่น TLC โดยใช้หลอดแคปิลลารี ขนาดเล็กดูดสารละลายตัวอย่าง spot ลงบน แผ่น TLC ขนาด 6.5x5 cm จนหมด (รูปที่ 3-7) โดย spot ห่างจากขอบ ข้างละ 0.5 cm



ภาพที่ 3-7 เตรียม TLC plate สำหรับการชุด (TP6/24)

2.10.4 นำแผ่น TLC ที่ spot สารเสร็จแล้ว และตัวทำละลายระเหยจนแห้งแล้ว วางลงใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลาย (mobile phase) ที่เตรียมไว้ โดยมีกระดาษกรองเพื่อให้เกิดการอิมตัวของตัวทำละลายใน TLC tank

2.10.5 รอจน mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก TLC tank และทำการสังเกต TLC chromatogram ด้วยวิธีต่อไปนี้

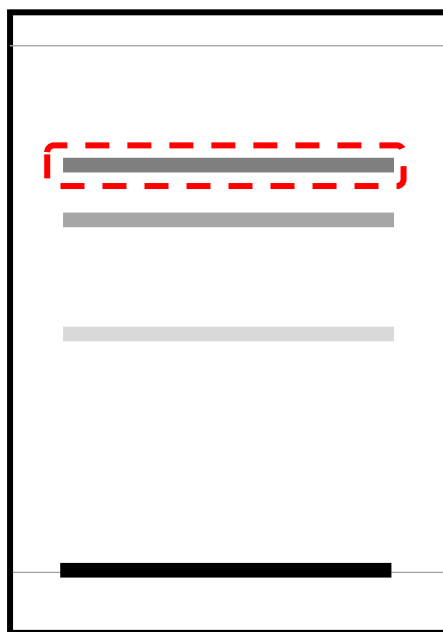
- 1) สังเกตด้วยตาเปล่า ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้
- 2) สังเกตภายใต้แสง UV chamber ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ทำการวางตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

2.10.6 ตัด TLC plate เฉพาะส่วนที่มีสาร (รูปที่ 3-8) เป็นชิ้นเล็กๆ ลงขวดแก้ว โดย spot ที่ตัดลงขวด ได้มาทั้งหมด 3 spots ลงขวดแก้ว spot ละขวด (TP6/34, TP6/35, TP6/36)

2.10.7 นำขวดแต่ละขวดมาแยกสารออกจากซิลิกาโดยเติม 20% methanol ใน dichloromethane 10 mL แล้ว sonicate เป็นเวลา 15 นาที ที่ 40°C

2.10.8 กรองเก็บสารละลาย

2.10.9 นำ TLC plate ที่เหลือ ทำซ้ำตามข้อ 2.10.7 ถึง 2.10.8 จนสารละลายไม่มีสี โดยเก็บสารละลายรวมกัน แล้วนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator และชั่งน้ำหนัก คิด %yield

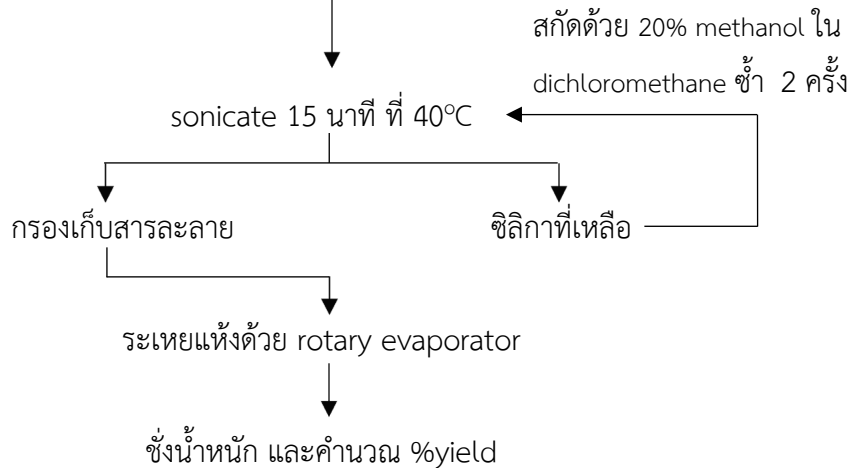


ภาพที่ 3-8 การชุด TLC plate (TP6/24)

ทำ TLC ของ TP6/24 (SiO_2 , mobile phase; hexane:ethyl acetate 3:2)

ส่อง UV 254 nm แล้วตัดตาม spot บน TLC plate เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในขวดแก้ว

แยกสารออกจาก SiO_2 โดยเติม 20% methanol in dichloromethane 10 mL



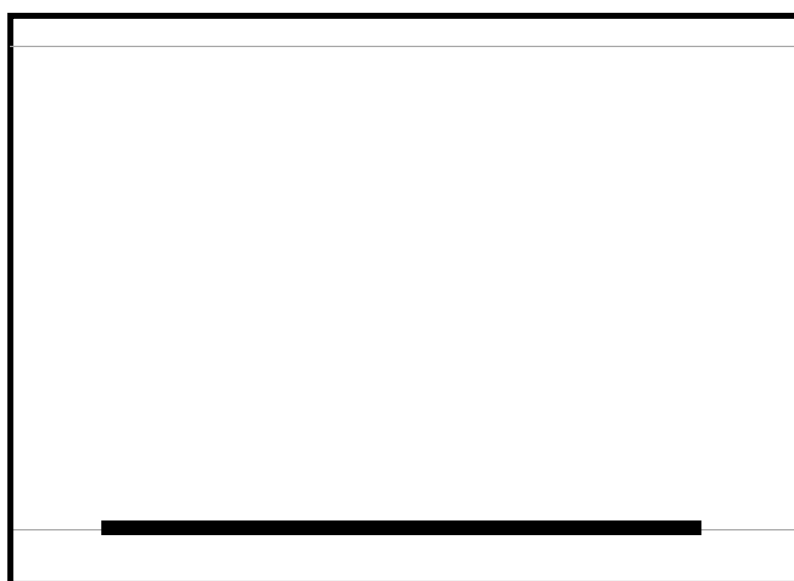
ภาพที่ 3-9 ขั้นตอนการแยกตัวอย่าง TP6/24 ด้วยวิธี TLC

2.11 แยกตัวอย่าง TP6/26 ด้วยวิธี TLC

2.11.1 เตรียม TP6/26 โดยละลายด้วย ethyl acetate

2.11.2 เตรียมระบบตัวทำละลายใน TLC tank (SiO₂, mobile phase; hexane:ethyl acetate 2:3)

2.11.3 นำสารสกัดจากข้อ 2.11.1 มา spot บนแผ่น TLC โดยใช้หลอดแคปิลลารี ขนาดเล็กดูดสารละลายตัวอย่าง spot ลงบน แผ่น TLC ขนาด 6.5x20 cm จนหมด (รูปที่ 3-10) โดย spot ห่างจากขอบ ข้างละ 0.5 cm



ภาพที่ 3-10 เตรียม TLC plate สำหรับการจุด (TP6/26)

2.11.4 นำแผ่น TLC ที่ spot สารเสร็จแล้ว และตัวทำละลายระเหยจนแห้งแล้ว วางลงใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลาย (mobile phase) ที่เตรียมไว้ โดยมีกระดาษกรองเพื่อให้เกิดการอิมตัวของตัวทำละลายใน TLC tank

2.11.5 รอจน mobile phase เคลื่อนที่มาถึง solvent front ที่กำหนดไว้ หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ออกจาก TLC tank และทำการสังเกต TLC chromatogram ด้วยวิธีต่อไปนี้

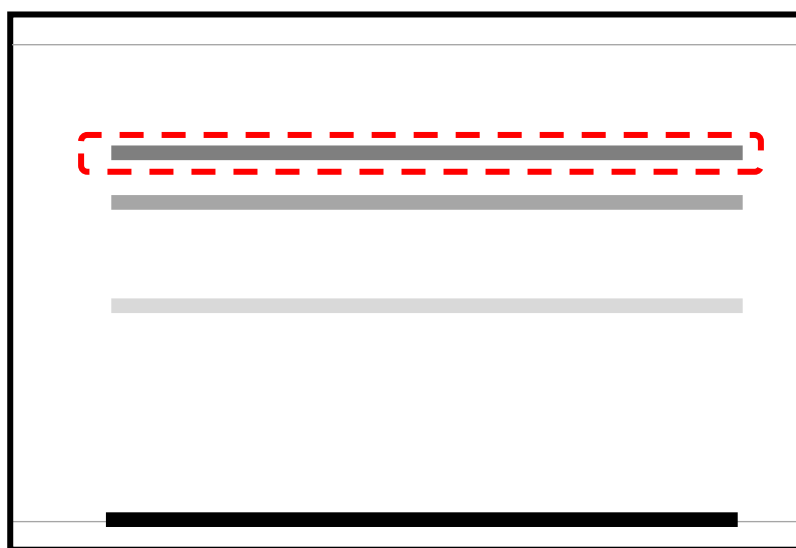
- 1) สังเกตด้วยตาเปล่า ทำการจดตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้
- 2) สังเกตภายใต้แสง UV chamber ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ทำการจดตำแหน่งของ spot ที่สังเกตได้

2.11.6 ตัด TLC plate เฉพาะส่วนที่มีสาร (รูปที่ 3-11) เป็นชิ้นเล็กๆ ลงขวดแก้ว โดย spot ที่ตัดลงขวด ได้มาทั้งหมด 3 spots ลงขวดแก้ว spot ละขวด (TP6/37, TP6/38, TP6/39)

2.11.7 นำขวดแต่ละขวดมาละลายด้วย 20% methanol in dichloromethane แล้ว sonicate เป็นเวลา 15 นาที

2.11.8 กรองเก็บสารละลาย

2.11.9 นำ TLC plate ที่เหลือ ทำซ้ำตามข้อ 2.10.7 ถึง 2.10.8 จนสารละลายไม่มีสี โดยเก็บสารละลายรวมกัน แล้วนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator และชั่งน้ำหนัก คำนวณ %yield

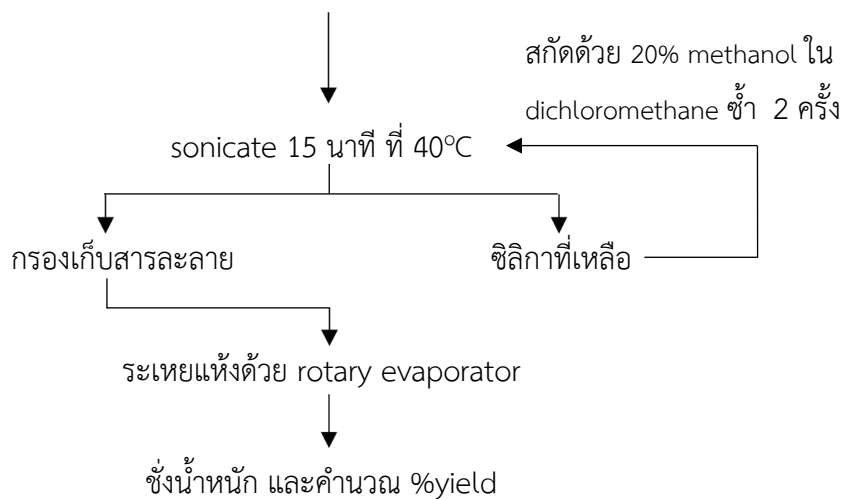


ภาพที่ 3-11 การชุด TLC plate (TP6/26)

ทำ TLC ของ TP6/26 (SiO₂, mobile phase; hexane:ethyl acetate 2:3)

ตัดสารตาม spot บน TLC plate เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในขวดแก้ว

แยกสารออกจากซิลิกาโดยเติม 20% methanol in dichloromethane 10 mL



ภาพที่ 3-12 ขั้นตอนการแยกตัวอย่าง TP6/26 ด้วยวิธี TLC

2.12 พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย TLC และ ^1H -NMR spectroscopy (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)

นำ TP6/32, TP6/33, TP6/34, TP6/36, TP6/37 ส่งตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. น้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดได้

ในการศึกษาการสกัดนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารที่มีในชั้นของชั้นโรงขนเงิน เพื่อนำมาแยกสารสกัดด้วยวิธีทาง chromatography โดยเปรียบเทียบน้ำหนักสารสกัด methanol-crude extract ในรูปของ %yield ซึ่งได้จากการคำนวณ ดังนี้

$$\%yield = [(น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ (g))/(น้ำหนักชั้นที่สกัดได้ (g))] \times 100$$

ตารางที่ 4-1 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของชั้นจากชั้นโรงขนเงินในแหล่งต่างๆ

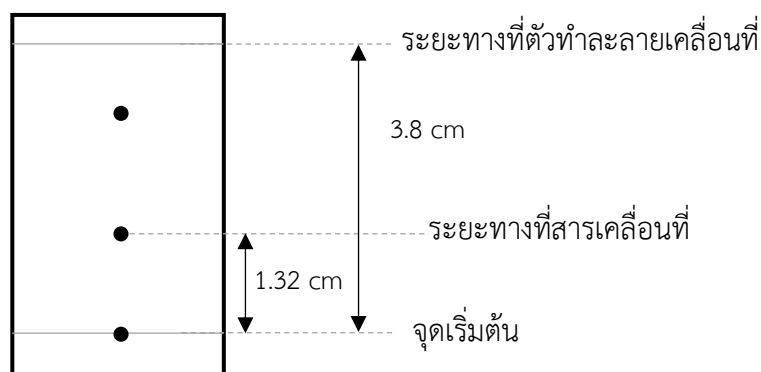
แหล่งของชั้น	น้ำหนักชั้น (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)	%yield
นาข้าว (TP1)	24.89	9.85	39.57
สวนดอกไม้ 1 (TP2)	24.36	7.69	31.57
สวนดอกไม้ 2 (TP3)	25.28	12.72	50.32
สวนสมุนไพร (TP4)	24.81	2.87	11.57
สวนส้มโอ (TP5)	24.95	3.86	15.47
ป่าชายเลน (TP6)	24.62	11.21	45.53

โดยจากผลการทดลอง (ตารางที่ 4-1) พบว่า หลังจากทำการสกัดเอา wax ออก และเก็บส่วน supernatant ปริมาณสารสกัดที่สกัดได้ในแต่ละสารสกัดมีปริมาณลดลงอย่างมาก

2. ผลการเปรียบเทียบระบบที่ใช้ในการแยกสารสกัดหยาบเบื้องต้น

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากชั้นของชั้นโรงขนเงินด้วยวิธี TLC เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีโดยการเปรียบเทียบ spot บน TLC plate (ภาพที่ 4-1) เมื่อสังเกตผลด้วยการมองด้วยตาเปล่า สังเกตภายใต้รังสียูวี 254 และ 366 nm และการใช้น้ำยาทดสอบ anisaldehyde-H₂SO₄ reagent (ตารางที่ 4-2) โดยรายงานตำแหน่งของสารแต่ละชนิดด้วยค่า R_f ซึ่งสามารถคำนวณได้ ดังนี้

$$R_f = \text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่} / \text{ระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่}$$



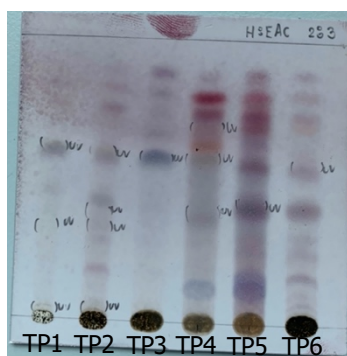
ภาพที่ 4-1 การคำนวณค่า R_f ที่ได้จาก TLC

ตารางที่ 4-2 ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย anisaldehyde- H_2SO_4 reagent

น้ำยาทดสอบ	สารเคมี	ทดสอบ	ผลการทดลอง ด้วย TLC
Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent	<i>p</i> -anisaldehyde ใน glacial acetic acid และ 97% sulfuric acid	ฟีนอลิก เทอร์พีน สเตียรอยด์ และ น้ำตาล	(+) ม่วง แดง น้ำเงิน

หมายเหตุ (+) หมายถึง เกิดปฏิกิริยา

โดยการวิเคราะห์หาระบบที่เหมาะสมสำหรับการแยกองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้ hexane:ethyl acetate (4:1, 3:2, 2:3 และ 1:4), ethyl acetate:methanol (4:1, 3:2, 2:3 และ 1:4) และ 100% methanol พบว่า stationary phase ที่ใช้คือ silica gel (SiO_2) และ mobile phase ที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารสกัดหยาบที่ได้คือ hexane:ethyl acetate ในอัตราส่วน 2:3 (ภาพที่ 4-2 และตารางที่ 4-3) ซึ่งจากการสังเกตพบว่า สารสกัดหยาบจากป่าชายเลน (TP6) แยกเป็น spot ของ major compound ที่ชัดเจน และมีน้ำหนักสารที่สกัดได้ เท่ากับ 11.21 g ซึ่งมากเพียงพอสำหรับการนำไปแยกด้วยวิธีทาง chromatography อื่นๆ ต่อไป



ภาพที่ 4-2 TLC ของสารสกัดหยาบจากแหล่งต่างๆ

ตารางที่ 4-3 แสดงค่า R_f ของสารสกัดหยาบจากชั้นของชั้นโรงขนเงินแหล่งต่างๆ

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
นาข้าว (TP1)				
1. 0.054	x	✓	x	x
2. 0.333	x	✓	x	x
3. 0.614	x	✓	✓	ม่วง
สวนดอกไม้ 1 (TP2)				
1. 0.054	x	✓	x	x
2. 0.175	x	x	x	ชมพู
3. 0.333	x	✓	x	x
4. 0.386	x	✓	x	x
5. 0.438	x	x	x	เทา
6. 0.596	x	✓	✓	เทา
7. 0.754	x	x	x	ม่วง
8. 0.824	x	x	x	ม่วง
สวนดอกไม้ 2 (TP3)				
1. 0.578	x	✓	✓	น้ำเงิน
2. 0.666	x	x	x	ม่วง
3. 0.736	x	x	x	ม่วง
4. 0.807	x	x	x	ม่วง

ตารางที่ 4-3 (ต่อ) แสดงค่า R_f ของสารสกัดหยาบจากชั้นของชั้นโรงแขนเงินแหล่งต่างๆ

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
5. 0.877	x	x	x	ม่วง
สวนสมุนไพร (TP4)				
1. 0.122	x	x	x	น้ำเงิน
2. 0.385	x	✓	x	ม่วง
3. 0.561	x	✓	✓	น้ำเงิน
4. 0.631	x	x	x	ส้ม
5. 0.684	x	✓	x	ม่วง
6. 0.736	x	x	x	ม่วง
7. 0.807	x	x	x	แดง
8. 0.877	x	x	x	ม่วง
สวนส้มโอ (TP5)				
1. 0.140	x	x	x	ม่วง
2. 0.175	x	x	x	ม่วง
3. 0.281	x	x	x	ม่วง
4. 0.385	x	x	x	ม่วง
5. 0.438	x	✓	✓	ม่วง
6. 0.561	x	x	x	ม่วง
7. 0.684	x	x	x	แดง
8. 0.719	x	x	x	ม่วง
9. 0.789	x	x	x	แดง
10. 0.859	x	x	x	ม่วง
ป่าชายเลน (TP6)				
1. 0.140	x	x	x	ม่วง
2. 0.245	x	x	x	ม่วง
3. 0.385	x	x	x	ม่วง
4. 0.526	x	✓	✓	ม่วง
5. 0.649	x	x	x	ส้ม

ตารางที่ 4-3 (ต่อ) แสดงค่า R_f ของสารสกัดหยาบจากชั้นของชั้นโรงแขนเงินแหล่งต่างๆ

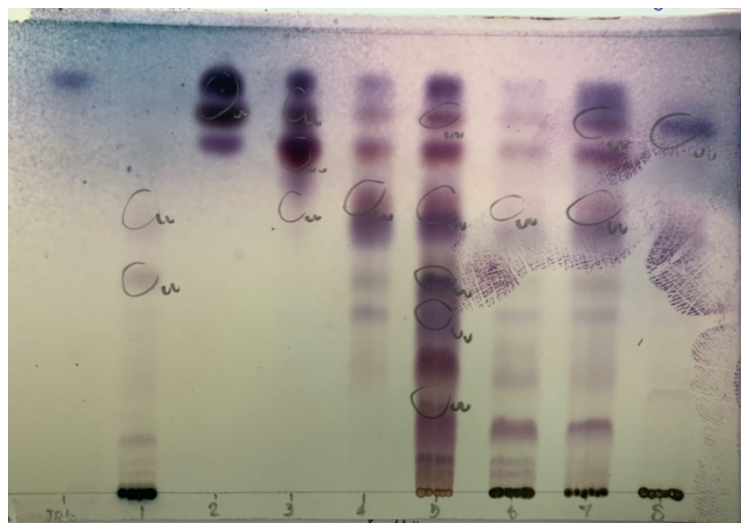
R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
6. 0.684	x	x	x	ม่วง
7. 0.771	x	x	x	ม่วง
8. 0.842	x	x	x	ม่วง

3. ความบริสุทธิ์และน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี VLC

โดยสารสกัดที่เลือกมาแยกด้วยวิธีการ VLC คือ TP6 ซึ่งมีน้ำหนักเริ่มต้นก่อนการแยกสารเท่ากับ 5.94 g โดยสารที่แยกได้จะเปรียบเทียบกับ %yield (ตารางที่ 4-4) และ TLC เพื่อดูความบริสุทธิ์ของสาร (ภาพที่ 4-3 และตารางที่ 4-5)

ตารางที่ 4-4 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธี VLC

fraction	น้ำหนักสาร (mg)
TP6/1	7.3
TP6/2	131.0
TP6/3	142.0
TP6/4	377.0
TP6/5	52.0
TP6/6	3,478.0
TP6/7	490.0
TP6/8	121.0
น้ำหนักรวม	4,801.3 mg
%yield	80.84%



ภาพที่ 4-3 TLC จากการแยกด้วยวิธี VLC

ตารางที่ 4-5 แสดงค่า R_f ของสารที่สกัดด้วยวิธี VLC

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
TP6/1				
1. 0.145	x	x	x	ม่วง
2. 0.467	x	✓	✓	ม่วง
3. 0.596	x	✓	✓	ม่วง
TP6/2				
1. 0.741	x	x	x	ม่วง
2. 0.806	x	✓	✓	ม่วง
3. 0.887	x	✓	✓	น้ำเงิน
TP6/3				
1. 0.612	x	x	✓	ม่วง
2. 0.725	x	✓	✓	ม่วง
3. 0.806	x	✓	✓	ม่วง
4. 0.887	x	x	x	ม่วง
TP6/4				
1. 0.387	x	x	x	ม่วง

ตารางที่ 4-5 (ต่อ) แสดงค่า R_f ของสารที่สกัดด้วยวิธี VLC

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
2. 0.451	x	x	x	ม่วง
3. 0.564	x	x	x	ม่วง
4. 0.629	x	✓	✓	ม่วง
5. 0.725	x	x	x	ม่วง
6. 0.806	x	x	x	ม่วง
7. 0.887	x	x	x	ม่วง
TP6/5				
1. 0.129	x	x	x	ม่วง
2. 0.193	x	✓	x	ม่วง
3. 0.29	x	x	x	ม่วง
4. 0.387	x	✓	x	ม่วง
5. 0.467	x	✓	x	ม่วง
6. 0.564	x	x	x	ม่วง
7. 0.629	x	✓	✓	ม่วง
8. 0.725	x	x	x	ม่วง
9. 0.838	x	✓	x	ม่วง
10. 0.903	x	x	x	ม่วง
TP6/6				
1. 0.129	x	x	x	ม่วง
2. 0.274	x	x	x	ม่วง
3. 0.387	x	x	x	ม่วง
4. 0.467	x	x	x	ม่วง
5. 0.564	x	x	x	ม่วง
6. 0.629	x	✓	✓	ม่วง
7. 0.725	x	x	x	ม่วง
8. 0.838	x	x	x	ม่วง
9. 0.903	x	x	x	ม่วง

ตารางที่ 4-5 (ต่อ) แสดงค่า R_f ของสารที่สกัดด้วยวิธี VLC

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
TP6/7				
1. 0.129	x	x	x	ม่วง
2. 0.274	x	x	x	ม่วง
3. 0.387	x	x	x	ม่วง
4. 0.467	x	x	x	ม่วง
5. 0.564	x	x	x	ม่วง
6. 0.629	x	✓	✓	ม่วง
7. 0.725	x	x	x	ม่วง
8. 0.838	x	✓	✓	ม่วง
9. 0.903	x	x	x	ม่วง
TP6/8				
1. 0.725	x	x	x	น้ำเงิน
2. 0.838	x	✓	✓	ม่วง

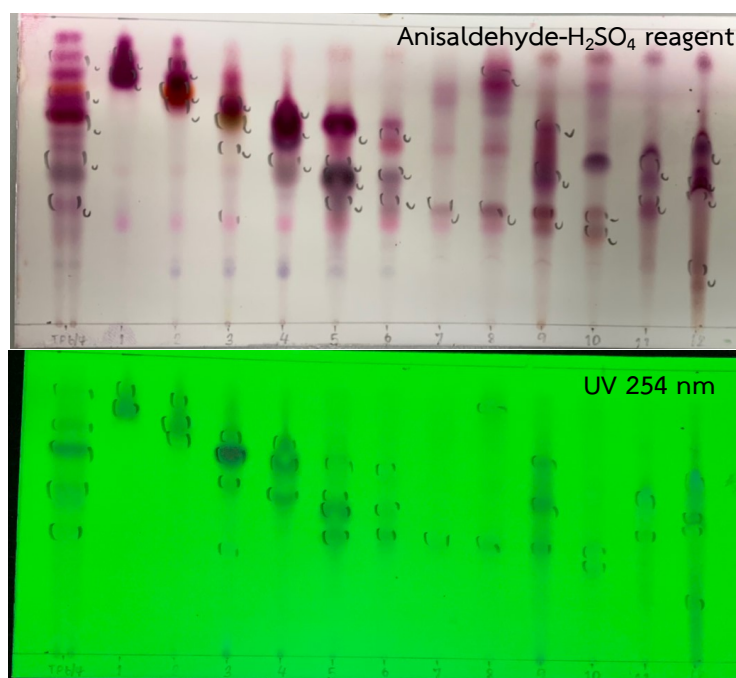
จากการทำ TLC พบว่าสารมีความซับซ้อน ไม่แยกออกจากกัน จึงเลือก fraction มาทำการแยกต่อ โดย fraction ที่เลือกคือ TP6/4 (377 mg) เนื่องจากมีน้ำหนักสารที่มากพอ และมีสาร major compound เป็นองค์ประกอบ

4. ความบริสุทธิ์และน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี CC

โดยสารสกัดที่เลือกมาแยกด้วยวิธีการ CC คือ TP6/4 ซึ่งมีน้ำหนักเริ่มต้นก่อนการแยกสารเท่ากับ 377 mg โดยสารที่แยกได้จะเปรียบเทียบกับ %yield (ตารางที่ 4-6) และ TLC เพื่อดูความบริสุทธิ์ของสาร (ภาพที่ 4-4 และตารางที่ 4-7)

ตารางที่ 4-6 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธี CC

fraction	น้ำหนักสาร (mg)
TP6/9	20.8
TP6/10	29.7
TP6/11	20.1
TP6/12	67
TP6/13	40.7
TP6/14	20.4
TP6/15	15.8
TP6/16	5.4
น้ำหนักรวม	219.9 mg
%yield	58.33%



ภาพที่ 4-4 TLC จากการแยกสารด้วยวิธี CC

ตารางที่ 4-7 แสดงค่า R_f ของสารที่สกัดด้วยวิธี CC

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
TP6/9				
1. 0.344	x	x	x	ชมพู
2. 0.517	x	x	x	ม่วง
3. 0.827	x	✓	✓	ม่วง
4. 0.879	x	✓	✓	ม่วง
5. 0.931	x	x	x	ม่วง
TP6/10				
1. 0.172	x	x	x	ม่วง
2. 0.344	x	x	x	ชมพู
3. 0.517	x	x	x	ม่วง
4. 0.724	x	✓	x	ส้ม
5. 0.775	x	✓	✓	ม่วง
6. 0.862	x	✓	x	ม่วง
7. 0.879	x	x	x	ม่วง
8. 0.948	x	x	x	ม่วง
TP6/11				
1. 0.224	x	x	x	ม่วง
2. 0.362	x	x	x	ชมพู
3. 0.517	x	x	x	ไม่มีสี
4. 0.603	x	✓	✓	เหลือง
5. 0.689	x	✓	x	ม่วง
6. 0.758	x	✓	x	ม่วง
7. 0.827	x	x	x	ม่วง
8. 0.896	x	x	x	ม่วง
TP6/12				
1. 0.224	x	x	x	ม่วง
2. 0.362	x	x	x	ชมพู

ตารางที่ 4-7 (ต่อ) แสดงค่า R_f ของสารที่สกัดด้วยวิธี CC

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
3. 0.448	x	x	x	ม่วง
4. 0.517	x	x	x	เทา
5. 0.603	x	✓	✓	ม่วง
6. 0.689	x	✓	x	ม่วง
7. 0.758	x	✓	x	ชมพู
8. 0.896	x	x	x	ชมพู
TP6/13				
1. 0.224	x	x	x	ม่วง
2. 0.362	x	x	x	ชมพู
3. 0.413	x	✓	✓	ม่วง
4. 0.448	x	x	x	ม่วง
5. 0.517	x	✓	✓	เทา
6. 0.603	x	✓	x	ม่วง
7. 0.689	x	✓	x	ม่วง
8. 0.758	x	x	x	ม่วง
9. 0.896	x	x	x	ม่วง
TP6/14				
1. 0.344	x	x	x	ชมพู
2. 0.396	x	✓	x	ม่วง
3. 0.620	x	x	x	ม่วง
4. 0.724	x	x	x	ม่วง
5. 0.775	x	x	x	ม่วง
6. 0.810	x	x	x	ม่วง
7. 0.862	x	✓	x	ม่วง
8. 0.931	x	x	x	ม่วง
TP6/15				
1. 0.396	x	✓	✓	ม่วง

ตารางที่ 4-7 (ต่อ) แสดงค่า R_f ของสารที่สกัดด้วยวิธี CC

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
2. 0.534	x	✓	x	ม่วง
3. 0.689	x	✓	✓	ม่วง
4. 0.724	x	x	x	ม่วง
5. 0.810	x	x	x	ม่วง
6. 0.931	x	x	x	ม่วง
TP6/16				
1. 0.327	x	✓	✓	ชมพู
2. 0.396	x	✓	✓	ม่วง
3. 0.534	x	x	x	ม่วง
4. 0.810	x	x	x	ม่วง
5. 0.931	x	x	x	ม่วง

จากการทำ TLC พบว่าสารมีความซับซ้อนน้อยลง spot แยกออกจากกัน เห็น spot ของสารสำคัญ จึงเลือก fraction มาทำการแยกต่อ โดย fraction ที่เลือกคือ TP6/12 (67 mg) เนื่องจากมีน้ำหนักสารที่มากพอ และมี spot ของ major compound ที่แยกกันชัดเจน

5. ความบริสุทธิ์และน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี size exclusion chromatography

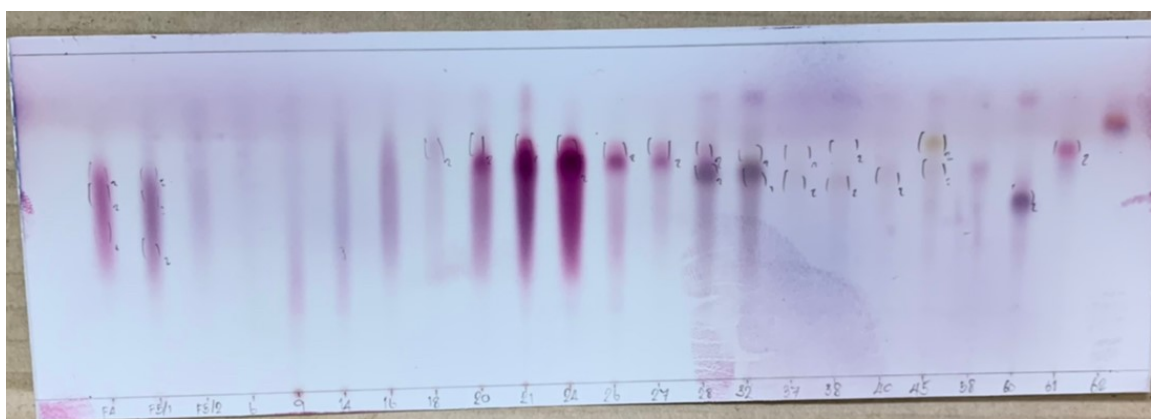
โดยสารสกัดที่เลือกมาแยกด้วยวิธีการ size exclusion chromatography คือ TP6/12 ซึ่งมีน้ำหนักเริ่มต้นก่อนการแยกสารเท่ากับ 67 mg โดยสารที่แยกได้จะเปรียบเทียบกับ %yield (ตารางที่ 4-8) และ TLC เพื่อดูความบริสุทธิ์ของสาร (ภาพที่ 4-5, 4-6 และตารางที่ 4-9)

ตารางที่ 4-8 ปริมาณสารสกัดและ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธี size exclusion

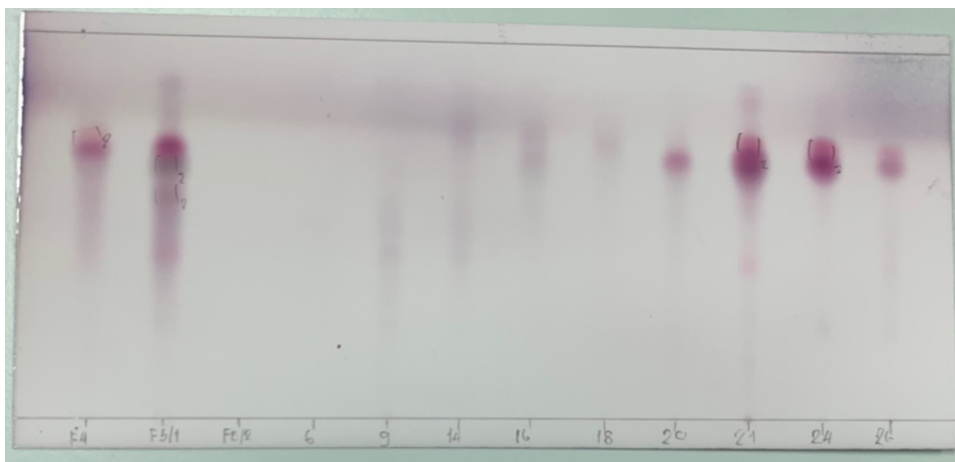
fraction	น้ำหนักสาร (mg)
TP6/17	0.5
TP6/18	1.5
TP6/19	1.1

ตารางที่ 4-8 (ต่อ) ปริมาณสารสกัดและ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธี size exclusion

fraction	น้ำหนักสาร (mg)
TP6/20	0.8
TP6/21	1.0
TP6/22	3.2
TP6/23	17.1
TP6/24	17.4
TP6/25	3.2
TP6/26	1.2
TP6/27	0.3
TP6/28	1.2
TP6/29	0.4
TP6/30	1.2
TP6/31	0.8
น้ำหนักรวม	50.9 mg
%yield	75.97%



ภาพที่ 4-5 TLC จากการแยกสารด้วยวิธี size exclusion (1)



ภาพที่ 4-6 TLC จากการแยกสารด้วยวิธี size exclusion (2)

ตารางที่ 4-9 แสดงค่า R_f ของสารที่สกัดด้วยวิธี size exclusion

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
TP6/17				
1. 0.3	x	x	x	ม่วง
TP6/18				
1. 0.666	x	x	x	ม่วง
TP6/19				
1. 0.666	x	x	x	ม่วง
TP6/20				
1. 0.716	x	✓	x	ม่วง
TP6/21				
1. 0.65	x	✓	x	ม่วง
2. 0.716	x	x	x	ม่วง
TP6/22				
1. 0.65	x	x	x	ม่วง
2. 0.716	x	✓	x	ม่วง
3. 0.85	x	x	x	ม่วง

ตารางที่ 4-9 (ต่อ) แสดงค่า R_f ของสารที่สกัดด้วยวิธี size exclusion

R_f	สังเกตด้วยตาเปล่า	UV 254 nm	UV 366 nm	Anisaldehyde- H_2SO_4 reagent
TP6/23				
1. 0.65	x	✓	x	ม่วง
2. 0.716	x	✓	x	ม่วง
TP6/24				
1. 0.616	x	✓	x	เทา
2. 0.7	x	✓	x	ม่วง
3. 0.85	x	x	x	ม่วง
TP6/25				
1. 0.6	x	✓	x	x
2. 0.683	x	✓	x	x
TP6/26				
1. 0.6	x	✓	x	ชมพู
TP6/27				
1. 0.616	x	✓	x	ม่วง
2. 0.7	x	✓	x	เหลือง
TP6/28				
1. 0.616	x	x	x	ชมพู
TP6/29				
1. 0.533	x	✓	x	ม่วง
2. 0.85	x	x	x	ชมพู
TP6/30				
1. 0.683	x	✓	x	ชมพู
TP6/31				
1. 0.733	x	x	x	ม่วง

จากการทำ TLC พบว่าสารมีความซับซ้อนน้อยลง spot แยกออกจากกัน เห็น spot ของสารสำคัญ จึงเลือก fraction มาทำการแยกต่อ โดย fraction ที่เลือกคือ TP6/23 (17.1 mg) และ TP6/24 (17.4 mg) เนื่องจากมีน้ำหนักสารที่มากพอ และ spot แยกกันชัดเจน

6. น้ำหนักผลึกที่ได้จาก TP6/23

สารสกัด TP6/23 (17.1 mg) มีลักษณะเหมือนเป็นผงเล็กๆ สารสกัดจะละลายใน ethyl acetate และ dichloromethane จึงทำการตกผลึกด้วย methanol เพื่อเก็บผลึกของสารสกัด ซึ่งน้ำหนัก (ตารางที่ 4-10) และนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy ต่อไป

ตารางที่ 4-10 น้ำหนักผลึกและ %yield

Fraction	น้ำหนักเริ่มต้น (mg)	น้ำหนักผลึก (mg)	%yield
TP6/32	17.1	15	87.72

7. ความบริสุทธิ์และน้ำหนักของสารสกัดจากการแยกด้วยวิธี TLC

โดยสารสกัดที่เลือกมาแยกด้วยวิธีชุด TLC คือ TP6/24 และ TP6/26 ซึ่งมีน้ำหนักเริ่มต้นก่อนการแยกสารเท่ากับ 17.4 mg และ 1.2 mg โดยสารที่แยกได้จะเปรียบเทียบกับ %yield (ตารางที่ 4-11 และ 4-12) และนำไปวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy ต่อไป

ตารางที่ 4-11 ปริมาณสารสกัด TP6/24 และ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธีชุด TLC

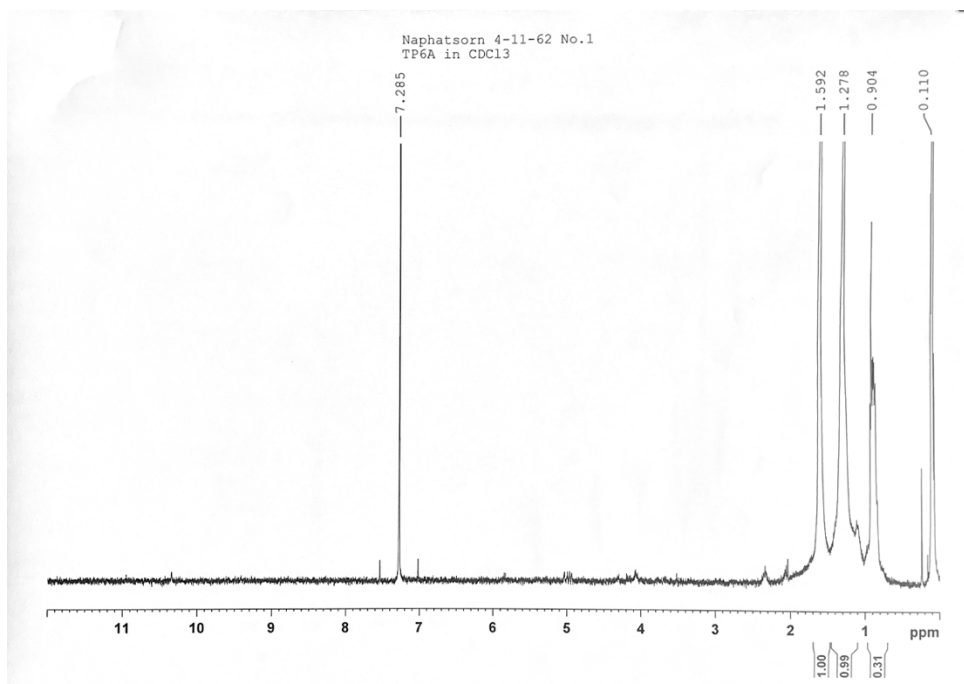
fraction	น้ำหนักสาร (mg)
TP6/33	10.2
TP6/34	5.8
TP6/35	2.5
น้ำหนักรวม	18.5 mg
%yield	106.32%

ตารางที่ 4-12 ปริมาณสารสกัด TP6/26 และ %yield ของสารสกัดที่แยกด้วยวิธีชุด TLC

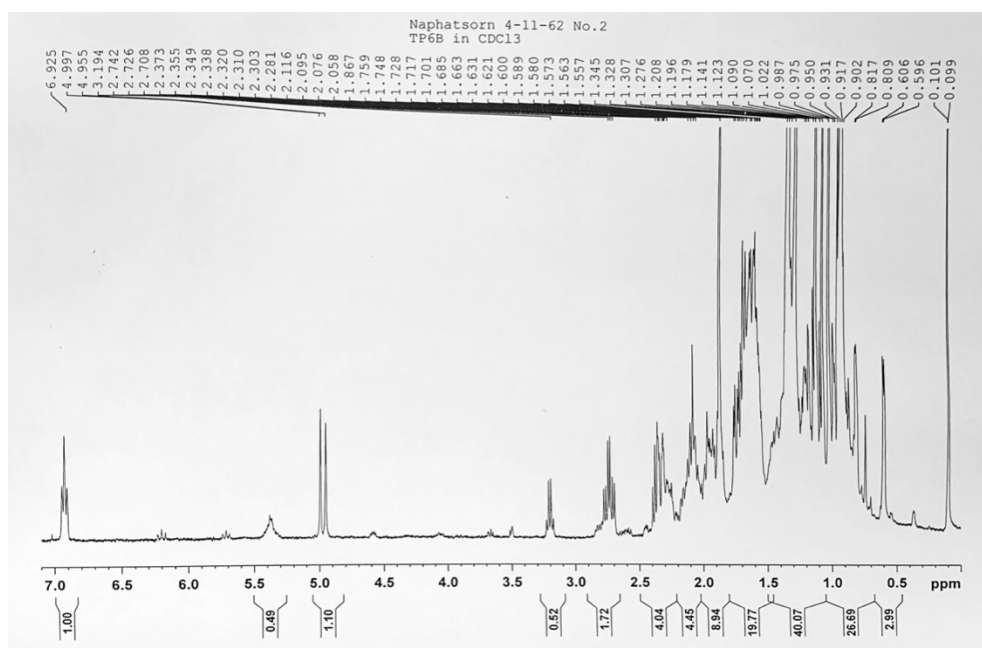
fraction	น้ำหนักสาร (mg)
TP6/36	0.8
TP6/37	4.0
TP6/38	7.2
น้ำหนักรวม	12 mg
%yield	1000%

8. ผลพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย TLC และ $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)

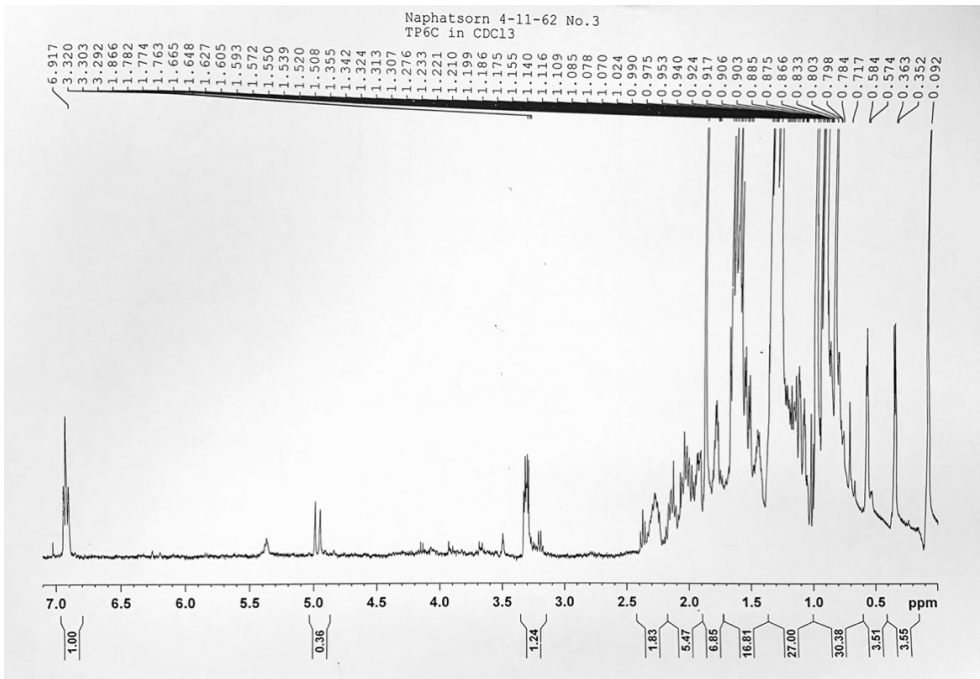
โดย fraction ที่นำไปวิเคราะห์ NMR มีดังนี้ TP6/32 (6A), TP6/33 (6B), TP6/34 (6C), TP6/36 (6D), TP6/37 (6E) ซึ่งผลมีดังนี้



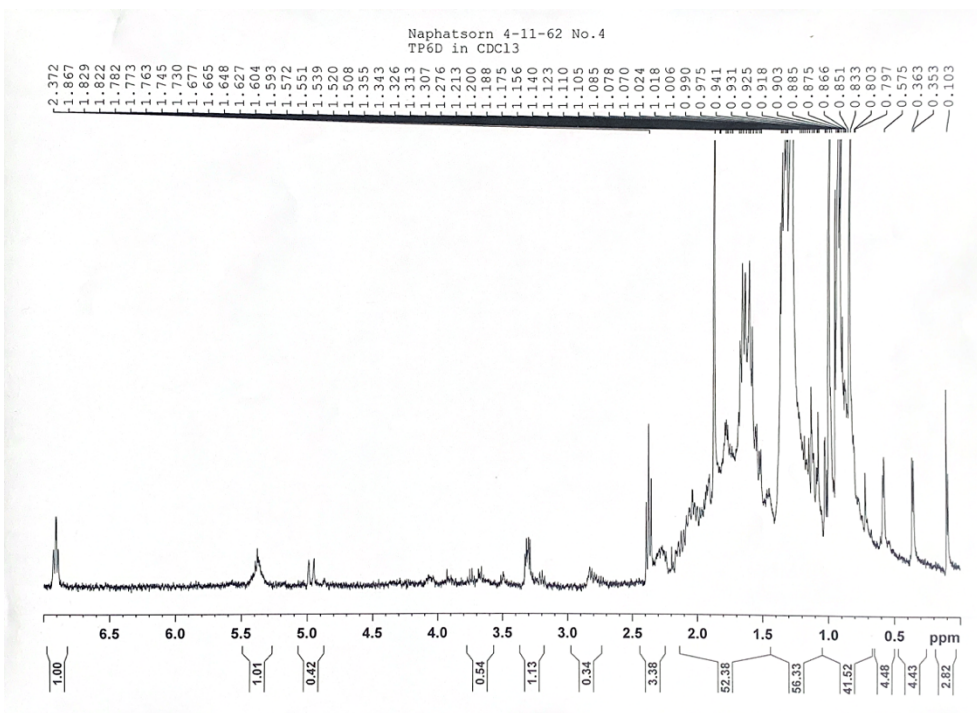
ภาพที่ 4-8 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัด TP6/32 (CDCl_3)



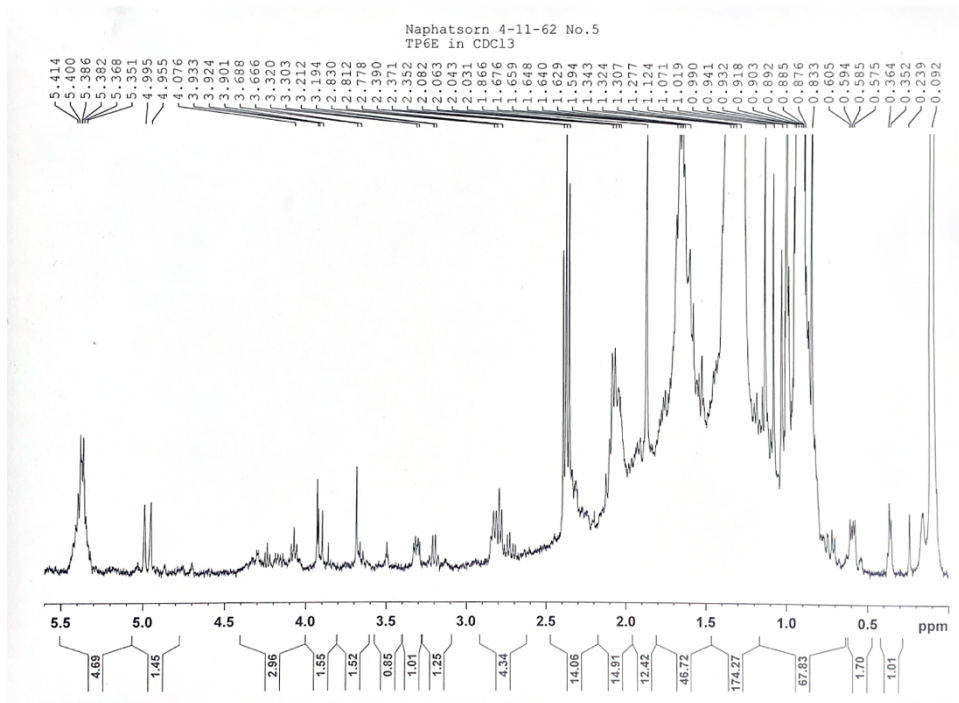
ภาพที่ 4-7 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัด TP6/33 (CDCl_3)



ภาพที่ 4-9 ^1H -NMR ของสารสกัด TP6/34 (CDCl_3)



ภาพที่ 4-10 ^1H -NMR ของสารสกัด TP6/36 (CDCl_3)



ภาพที่ 4-11 ^1H -NMR ของสารสกัด TP6/37 (CDCl_3)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากชั้นของชั้นโรงขนเงิน *Tetragonula pagdeni* ได้เลือกวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol และทำการแยกสารด้วยวิธี thin-layer chromatography เพื่อดูลักษณะของสาร จากนั้นทำการแยกสารต่อด้วยวิธีทาง chromatography คือ vacuum liquid chromatography, column chromatography, size exclusion chromatography และทำการวิเคราะห์ผลด้วย NMR spectroscopy

ผลการศึกษาการสกัดด้วย methanol นั้นได้สารสกัดในแต่ละแหล่งแตกต่างกัน ดังนี้ นาข้าว, สวนดอกไม้ 1, สวนดอกไม้ 2, สวนสมุนไพร, สวนส้มโอ และ ป่าชายเลน คิดเป็นร้อยละ 39.57, 31.57, 50.32, 11.57, 15.47 และ 45.53 ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักที่ได้แตกต่างกันนี้ อาจเกิดจากตัวทำละลายที่ใช้ไม่เหมาะสมกับตัวอย่าง

ผลการศึกษาการตรวจสอบองค์ประกอบและหาตัวทำละลายในการสกัดเบื้องต้นด้วยวิธี thin-layer chromatography โดยการคำนวณระยะทางเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) เพื่อเปรียบเทียบและดูความแตกต่างของ spot จากการสังเกตด้วยตาเปล่า แสง UV 254 และ 366 nm และการฉีดพ่นด้วย anisaldehyde- H_2SO_4 reagent จากผลการทดลอง พบว่าสารสกัดที่ได้จากแต่ละแหล่งตัวอย่าง มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยในการทดลองนี้อาจเกิดข้อผิดพลาดจากการ spot สารมากเกินไป ทำให้สารแยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ อาจทำให้สารสำคัญบางตัวสังเกตได้ไม่ชัดเจน

ผลการศึกษาการแยกสารด้วยวิธีทาง chromatography พบว่า สารสกัดที่ได้มีความซับซ้อนอย่างมาก เนื่องจากการแยกสารด้วยวิธีทาง chromatography ที่ใช้มีทฤษฎีการแยกที่ต่างกัน แต่ก็ไม่สามารถแยกสารให้มีความบริสุทธิ์ได้ดีพอ กล่าวคือ การแยกตามความมีขั้วด้วยวิธี vacuum liquid chromatography, column chromatography และการแยกตามขนาดของสารด้วยวิธี size exclusion chromatography ซึ่งไม่สามารถทำให้สารเป็นสารบริสุทธิ์ได้จากการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี 1H -NMR spectroscopy โดยอาจจะต้องนำสารที่สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วย High performance liquid chromatography และทำการแยกสารสกัดเพิ่มเติมเพื่อให้สารมีความบริสุทธิ์ แล้วจึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR spectroscopy, Infrared spectrometry, UV-Visible spectrophotometry และ mass spectrometry เพื่อหาสารสำคัญต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. ความรู้เกี่ยวกับชันโรง 2014 [cited 2019 04 April]. Available from: <https://thaistinglessbee.wordpress.com>.
2. Da-Silva A. IA, Silva, T.M. S., Camara, C.A., Queiroz, N., Magnani, M., Novais, J.S., Soledade, L.E.B., Lima, E.O., De Souza, A.L. and De Souza. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. Food chemistry. 2013;141(4):3552-8.
3. Boonyadist Vongsaka SK, Sunan Jaisamuta, Sasipawan Machanaa, Chamnan Pattarapanicha. In vitro alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2015;25(5):445-50.
4. Marcos Guilherme da Cunha MF, LiviaCâmaradeCarvalho Galvão, AnaLúciaTascaGóis de Ruiz, João Ernesto de Carvalho, Masarahu Ikegaki, Severino Matias de Alencar, Hyun Koo, Pedro Luiz Rosalen. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. BMC Complement Altern Med. 2013;13:23.
5. Ju'lia Cisilotto, Louis P. Sanjo, Larissa G. Faqueti, Helo'isa Fernandes, De'bora Joppi, Maique W. Biavatti, Ta'nia Beatriz Creczynski-Pasa. Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: the uncommon presence of piperidinic alkaloids. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018;149:502-11.
6. Toshiro Matsui, Sumi Ebuchi, Tomoko Fujise, Kanthi J. M. Abesundara, Shima Doi, Hideo Yamada, Kiyoshi Matsumoto. Strong Antihyperglycemic Effects of Water-Soluble Fraction of Brazilian Propolis and Its Bioactive Constituent, 3,4,5-Tri-O-caffeoylquinic Acid. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2004;27(11):1797-803.
7. Boonyadist Vongsak, Chirapond Chonanant, Sasipawan Machana. In Vitro Cytotoxicity of Thai Stingless Bee Propolis from Chanthaburi Orchard. Walailak journal. 2016;14(9).

8. อัญชลี สวาสดีธรรม. มหัทศจรยช์นโรง. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed: สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี; 2013.
9. สำนักงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ กรมป่าไม้. ชันโรง 2011 [cited 2019 04 April]. Available from:
http://biodiversity.forest.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=196:2011-11-24-09-40-45&catid=25:the-project&Itemid=68.
10. Kiattipoom Jante, Soontaree Cheentam, Punrphat Takopuekdee.
 Development of Environmental Education Center for Local of Wisdom Stingless Bee Conversation in Pattawee Subdistrict Makham District, Chanthaburi Provice. J Res Unit Sci Technol Environ Learning 2015;Vol. 6(No.1):32-4.
11. ปิยนุช จัมพรหมพร. ชันโรง [cited 2019 04 April]. Available from:
<http://www.chumphon2.mju.ac.th/km/?p=501>.
12. Nutpachara Theanworakant, Lamai Yapanan, Chittima Thangsirimongkol, Suchada Thophon. Pollination Efficacy of Stingless Bee (*Tetragonula pagdeni*) to Increase Yield of Bitter Guard in the Fields. SDU Research Journal Sciences and Technolog. 2017;Vol.10(No.3):171-86.
13. Alexandra-Maria Klein, Ingolf Steffan-Dewenter, Teja Tscharntke. BEE POLLINATION AND FRUIT SET OF *Coffea arabica* AND *C. canephora* (RUBIACEAE). American journal of botany. 2003;90(1):153-7.
14. Katia Sampaio, Malangodi-Braga, Astrid de Martos Peixoto Kleinert. Could *Tetragonisca angustula Latreille* (Apinae, Meliponini) be effective asstrawberry pollinator in greenhouses? Australian Journal of Agricultural Research. 2004;55(7):771-3.
15. Jaqueline Ferreira Campos, Uilson Pereira dos Santos, Paola dos Santos da Rocha, Marcio José Damião, José Benedito Perrella Balestieri, Claudia Andrea Lima Cardoso,2Edgar Julian Paredes-Gamero, Leticia Miranda Estevinho, Kely de Picoli Souza, and Edson Lucas dos Santos. Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015;2015:11.
16. Kustiawan Paula, Phuwapraisirisan, Preecha Puthong, Songchan Palaga, Tanapat Arung, Chanchao Chanpen. Propolis from the Stingless Bee *Trigona incisa*

from East Kalimantan, Indonesia, Induces In Vitro Cytotoxicity and Apoptosis in Cancer Cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(15):6581-9.

17. Supawadee Umthong, Songchan Puthong, Chanpen Chanchao. *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand: Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2009;37(5):855-65.

18. Supawadee Umthong, Preecha Phuwapraisirisan, Songchan Puthong and Chanpen Chanchao. In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11(37).

19. Natthan Charernsriwilaiwat, Passakorn Praserttrungpanich, Chanawit Wanitrattanaphong, Boonyadist Vongsak. Formulation of antibacterial gel containing stingless bees' propolis extract. *Thai journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;42(Supplement issue).

20. Nur Liyana Rosli, Husnitayi Roslan, Eshaifol Azam Omar, Norehan Mokhtar, Nor Hussaini Abdul Hapit, and Nornaimah Asem. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Trigona Apicalis* propolis extract. *AIP Conference Proceedings*. 2016;1791.