บทความวิจัยและงานสร้างสรรค์
Proceedings

Creative Economy

การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยสร้างสรรค์ ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 3

28-29 มกราคม 2553 ณ ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบพระชนมพรรษา

มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

คำนำ

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ร่วมกับเครือข่ายวิจัยอุดมศึกษาภาคกลางตอนล่าง สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) จัดโครงการประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยสร้างสรรค์ "ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 3 : ศิลปากรสรรค์สร้าง สังคมเศรษฐกิจไทยสร้างสรรค์" ซึ่งเป็นการสนับสนุนการทำวิจัยสร้างสรรค์ เพื่อประโยชน์ต่อสาธารณชน และเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาประเทศ รวมทั้งสนับสนุนการนำเสนอผลงานวิชาการ ตลอดจนการเผยแพร่ผลงานวิจัยสร้างสรรค์ทั้งในและต่างประเทศ การจัดเวทีเพื่อให้บุคลากรภายในมหาวิทยาลัยและหน่วยงานภายนอกมหาวิทยาลัย ได้มีโอกาสนำเสนอผลงานที่แสดงถึงกระบวนการสร้างงานวิจัยและงานสร้างสรรค์ ทั้งนี้เพื่อให้บุคลากรได้มีโอกาสเผยแพร่ผลงานที่หลากหลาย ซึ่งนับว่าเป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้เกิดบรรยากาศทางวิชาการ และเป็นการส่งเสริมและสนับสนุนให้บุคลากรของมหาวิทยาลัยตระหนักถึงความสำคัญของการทำงานวิจัยและงานสร้างสรรค์มากยิ่งขึ้น และยังช่วยในการสร้างความร่วมมือในการทำวิจัยสร้างสรรค์ทั้งระหว่างบุคลากรภายในมหาวิทยาลัย และร่วมกับหน่วยงานภายนอกมหาวิทยาลัย เพื่อให้เกิดงานวิจัยสร้างสรรค์ที่ตอบสนองต่อความต้องการของชุมชนมากยิ่งขึ้นอีกด้วย

คณะกรรมการดำเนินงานการประชุมวิชาการฯ ขอขอบพระคุณผู้นำเสนอผลงานวิชาการทุกท่าน และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่พิจารณาผลงานวิชาการทั้งภาคบรรยาย โปสเตอร์ นิทรรศการ และงานสร้างสรรค์ ที่ได้ให้เกียรติตรวจพิจารณาผลงานวิชาการ คณะกรรมการดำเนินงานการประชุมวิชาการฯ หวังว่าผลงานวิชาการเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการวิชาการต่อไป

คณะกรรมการดำเนินงาน
การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยสร้างสรรค์ : ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 3
21 มกราคม 2553

ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย และฤทธิ์ต้านวัณโรคของสาร heteronemin ที่แยกได้จากฟองน้ำไทยสกุล *Aplysinopsis*

Antimalarial and antitubercular activities of heteronemin isolated from the Thai marine sponge *Aplysinopsis* sp.

พัชรีพร ชาตะกูล[1] ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล[1] และอนุชิต พลับรู้การ[1]

Phatchareephorn Chatakul[1], Chatchai Wattanapiromsakul[1] and Anuchit Plubrukarn[1]

บทคัดย่อ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นเมธานอลจากฟองน้ำไทยสกุล *Aplysinopsis* ซึ่งเก็บจากเกาะห้า จังหวัดกระบี่ พบว่ามีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* K1 strain โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.58 μg/mL หลังจากแยกสารสกัดโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี และนำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี พบว่าสามารถแยกสาร heteronemin (สารหมายเลข 1) ออกมาได้ ซึ่งสารดังกล่าวมีลักษณะทั่วไปเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จัดเป็นสารองค์ประกอบหลักที่แยกได้ครั้งแรกจากฟองน้ำสกุล *Aplysinopsis* ในการศึกษานี้ พบว่า heteronemin มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* K1 strain โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9 μM และต้านวัณโรคในสายพันธุ์ *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6 μM ดังนั้นฟองน้ำสกุล *Aplysinopsis* จึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นยารักษามาลาเรีย และวัณโรคได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามสิ่งที่ต้องคำนึงต่อไปคือ ความเป็นพิษของสารดังกล่าว

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ฤทธิ์ต้านวัณโรค ฟองน้ำสกุล *Aplysinopsis*

Abstract

The chemical investigation of the methanolic extract from the Thai marine sponge *Aplysinopsis* sp. collected from Koh Ha, Krabi Province showed antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 strain (IC_{50} 2.58 μg/mL). After isolation by using chromatographic technique and structure elucidation by using spectroscopic technique, heteronemin was identified (compound 1). It was obtained as white needle crystal. It was first isolated as a major component from the sponge *Aplysinopsis* sp. In this study, heteronemin showed antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* K1 strain (IC_{50} 9 μM) and antitubercular activity against *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ (MIC 6 μM). Therefore, the sponge *Aplysinopsis* sp. has the potential to be used as antimalarial and antitubercular agents. However, toxicity evaluation of this compound has to be done.

Keywords : antimalarial, antitubercular, *Aplysinopsis* sp.

[1] หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ภาควิชาเภสัชเวท และเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

Marine Natural Products Research Unit, Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112

1. คำนำ และวัตถุประสงค์

ในปัจจุบันนักวิจัยได้ศึกษาถึงสารเคมีที่สกัดได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลหลายชนิด การศึกษาดังกล่าวทำให้ค้นพบสารที่มีโครงสร้างทางเคมีใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ฟองน้ำจัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลที่มีรายงานการวิจัยว่าเป็นแหล่งผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ อย่างเช่นฟองน้ำใน order Dictyoceratida เป็นแหล่งผลิตสารในกลุ่ม sesterterpene ซึ่งสารในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ต้านวัณโรค ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ในการศึกษานี้ จะศึกษาถึงการแยกสกัดสารจากฟองน้ำไทยสกุล *Aplysinopsis* ซึ่งจัดเป็นฟองน้ำที่อยู่ใน order Dictyoceratida จากการรายงานสารที่สกัดได้จากฟองน้ำในสกุล *Aplysinopsis* พบสารในกลุ่ม sesterterpene ได้แก่ aplyolide A ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยจะไปยับยั้งการเกิด PLA_2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.50 μM (Crews *et al*., 1991; Ungur and Kulcitki, 2009) และ aplysinoplides A-C มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (P388 leukemia cells) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.45, 0.45 และ 11 μg/mL ตามลำดับ (Ueoka *et al*., 2008)

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดชั้นเมธานอลจากฟองน้ำไทยสกุล *Aplysinopsis* พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรียในสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* K1 strain โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.58 μg/mL ด้วยเหตุนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย

2. อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 อุปกรณ์

การวิเคราะห์ชนิดของหมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างสาร ใช้เครื่อง Jasco® IR-810 infrared spectrometer ส่วนการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ใช้เครื่อง Fourier Transform NMR Spectrometer 500 MHz (Model UNITY INOVA, Varian®) โดยใช้ chloroform-d_6 เป็นตัวทำละลาย และกำหนดค่า chemical shift (δ) โดยใช้สัญญาณของ chloroform-d_6 ที่ δ 7.25 และ 77.0 สำหรับโปรตอน (^{1}H-NMR) และคาร์บอน (^{13}C-NMR) ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสาร โดยใช้เครื่อง Micromass® LCT mass spectrometer

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ในสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* K1 strain และทดสอบฤทธิ์ต้านวัณโรค ในสายพันธุ์ *Mycobacterium tuberculosis* H_{37}Ra ทำการทดสอบโดยศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

2.2 วิธีการ

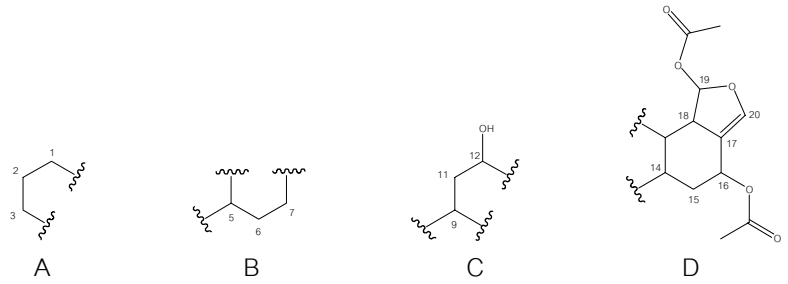
เก็บตัวอย่างฟองน้ำสกุล *Aplysinopsis* รหัส AP 07-012-03 จากเกาะห้า จังหวัดกระบี่ ในปี 2550 แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนถึงเวลาแยกสกัด นำตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้ มีน้ำหนักเปียก 239.30 กรัม มาทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง ได้ตัวอย่างฟองน้ำ มีน้ำหนักแห้ง 123.67 กรัม จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน 0.99 กรัม นำสารสกัดชั้นนี้ 0.80 กรัม มาแยก**โดยใช้เทคนิค**โครมาโทกราฟีแบบเร็ว **ผ่านคอลัมน์ซิลิกา โดยใช้** 5% ถึง 100% ethyl acetate ใน petroleum ether ได้ผลึกสารหมายเลข 1 นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ในสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* K1 strain และทดสอบฤทธิ์ต้านวัณโรค ในสายพันธุ์ *Mycobacterium tuberculosis* H_{37}Ra

3. ผล และวิจารณ์

จากฟองน้ำที่นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ พบว่ามีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* K1 strain โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.83 μg/mL และผลจากการแยกฟองน้ำ ได้ผลึกสารหมายเลข 1 น้ำหนัก 455.8 มิลลิกรัม (คิดเป็น 56.98% ของสารสกัดชั้นเฮกเซน) ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลักที่แยกได้จากฟองน้ำสกุลนี้

สารหมายเลข 1 มีลักษณะทั่วไปคือ เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จากข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยวิธี ESIMS พบสัญญาณของมวลโมเลกุลที่ *m/z* 511 $[M+Na]^+$ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{29}H_{44}O_6$ ซึ่งค่า D.B.E. = 8 คาดว่ามีหมู่คาร์บอนิล 2 หมู่ มีโอเลฟิน 1 หมู่ และมีวงแหวนอีก 5 วง ข้อมูลจาก IR สเปกตรัม พบว่าที่ ν_{max} 3500 cm^{-1} แสดงแถบดูดกลืนจากการยืดของพันธะ O-H และที่ ν_{max} 1740 และ 1235 cm^{-1} แสดงแถบดูดกลืนจากการยืดของพันธะ C=O ที่เป็นประเภท ester จาก ^{1}H-NMR สเปกตรัม พบสัญญาณของเมธิล 5 สัญญาณ ที่ δ 0.75, 0.78, 0.80, 0.80 และ 0.86 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารที่อยู่ในกลุ่ม sesterterpene และพบเมธิลของหมู่อะซิธิลอีก 2 สัญญาณ ที่ δ 2.06 และ 2.07 สำหรับโปรตอนที่ δ 3.41 น่าจะเป็นโปรตอนของ -OH ที่เกาะอยู่บน (C-12) สัญญาณที่ปรากฏเป็น broad doublet มีค่า coupling constant เท่ากับ 10.4 Hz ในขณะเดียวกันโปรตอนที่ δ 3.31 น่าจะเป็นโปรตอนที่เกาะอยู่บน oxygenated carbon (C-12) ซึ่งปรากฏสัญญาณเป็น broad singlet ส่วนโปรตอนที่ δ 5.32 เป็นโปรตอนที่เกาะอยู่บนคาร์บอนที่มีหมู่อะซิทิลเกาะอยู่ (C-16) และสำหรับโปรตอนที่ δ 6.73 เป็นโปรตอนที่เกาะอยู่กับ oxygenated carbon (C-19) ซึ่งมีหมู่อะซิทิลเกาะอยู่ อีกทั้งยัง coupling กับโปรตอนที่ δ 2.39 (H-18) จากตำแหน่งนี้จะแสดงการ coupling ต่อไปยังโปรตอนที่ δ 6.12 (H-20)

จากข้อมูลทาง ^{13}C-NMR สเปกตรัม พบสัญญาณคาร์บอน 29 สัญญาณ สัญญาณของเอสเทอร์คาร์บอนิลอีก 2 สัญญาณ ที่ δ 171.3 และ 170.6 รวมถึงสัญญาณคาร์บอนที่เป็น olefin 2 สัญญาณ ที่ δ 135.3 และ 101.6 อีกทั้งข้อมูลทาง DEPT experiment จะพบสัญญาณเมธิล 7 สัญญาณ เมธิลีน 7 สัญญาณ เมไธน์ 8 สัญญาณ และ quaternary คาร์บอน อีก 7 สัญญาณ จาก ^{1}H, ^{1}H COSY พบว่าสามารถเชื่อมโยงพันธะของสารที่อยู่ใกล้เคียงกันในโครงสร้าง ได้เป็น 4 หน่วยย่อย ซึ่งประกอบด้วย หน่วยย่อย A B C และ D ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงหน่วยย่อยของโครงสร้างสาร

จากรูปที่ 1 สามารถประกอบโครงสร้างของสารได้โดยใช้ข้อมูล HMBC วิเคราะห์การเชื่อมโยงของพันธะด้วยสัญญาณของ quaternary คาร์บอนที่เหลืออีก 4 สัญญาณ ที่ δ 33.2, 37.3, 38.0 และ 42.6 รวมถึงสัญญาณเมธิลอีก 5 สัญญาณ ที่ δ 0.75, 0.78, 0.80, 0.80 และ 0.86 จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารหมายเลข 1 จากรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าสารดังกล่าวคือ heteronemin (Kazlauskas *et al*., 1976; Crews and Bascansa, 1986; Wonganuchitmeta *et al*., 2004)

heteronemin มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* K1 strain โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9 μM ใช้ dihydroartemisinine (IC_{50} = 3.7 nM) เป็นสารมาตรฐาน และต้านวัณโรคในสายพันธุ์ *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6 μM ใช้ rifampicin, isoniazid, streptomycin และ ofloxacin (MIC = 0.003-0.012, 0.023-0.046, 0.156-0.313 และ 0.391-0.781 μg/mL) เป็นสารมาตรฐาน

4. สรุป

ในการศึกษาครั้งนี้ พบสาร heteronemin (สารหมายเลข 1) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่แยกได้จากฟองน้ำสกุล *Aplysinopsis* ลักษณะทั่วไปของสารดังกล่าวเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า heteronemin มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* K1 strain และฤทธิ์ต้านวัณโรคในสายพันธุ์ *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ ด้วยเหตุนี้ฟองน้ำสกุล *Aplysinopsis* จึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นยารักษามาลาเรีย และวัณโรคได้ จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าฟองน้ำไทยเต็มไปด้วยแหล่งผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพของการนำมาเป็นยารักษาโรคได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามสิ่งที่ต้องประเมินต่อไป คือ ความเป็นพิษของสารดังกล่าว พบว่า heteronemin สามารถทำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ขึ้นในเซลล์ได้ (Schumacher *et al.*, 2009)

5. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกองทุนสนับสนุนการทำวิจัย ประจำปี 2550 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. เอกสารอ้างอิง

Crews, P. and Bascansa, P. 1986. Sesterterpene from a common marine sponge, *Hyrtios erecta*. *J. Nat. Prod.* 49; 1041-1052.

Crews, P., Jimenez, C. and O'Neil-Johnson, M. 1991. Using spectroscopic and database strategies to unravel structures of polycyclic bioactive marine sponge sesterterpenes. *Tetrahedron* 47; 3585-3600.

Kazlauskas, R., Murply, P.T., Quinn, R.J. and Wells, R.J. 1976. Heteronemin, a new scalarin type sesterterpene from the sponge *Heteronema erecta*. *Tetrahedron Lett.* 30; 2631-2634.

Schumacher, M., Cerella, C., Eifes, S., Chateauvieux, S., Morceau, F., Jaspars, M., Dicato, M. and Diederich, M. 2009. Heteronemin, a spongean sesterterpene, inhibits TNFα-induced NF-κB activation through proteasome inhibition and induces apoptotic cell death. *Biochem Pharmacol. In press*.

Ueoka, R., Nakao, Y., Fujii, S., van Soest, R.W.M. and Matsunaga, S. 2008. Aplysinoplides A-C, cytotoxic sesterterpenes from the marine sponge *Aplysinopsis digitata*. *J. Nat. Prod.* 71; 1089-1091.

Ungur, N. and Kulcitki, V. 2009. Occurrence, biological activity and synthesis of cheilanthane sesterterpenoids. *Tetrahedron* 65; 3815-3828.

Wonganuchitmeta, S., Yuentongsawad, S., Keawpradub, N. and Plubrukarn, A. 2004. Antitubercular sesterterpenes from the Thai sponge *Brachiaster* sp. *J. Nat. Prod.* 67; 1767-1770.

จัดโดย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร
ร่วมกับเครือข่ายวิจัยอุดมศึกษาภาคกลางตอนล่าง สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)