



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การสำรวจสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลใน
แถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

A screening of bioactive natural products from sea
grasses and seaweeds around the eastern coast of
Thailand

โดย นางสาวจงกลณี จงอร่ามเรือง และคณะ

นักวิจัยที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. อุดม กักพล

ปี พ. ศ. 2548



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การสำรวจสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลใน
แถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

A screening of bioactive natural products from sea
grasses and seaweeds around the eastern coast of
Thailand

โดย นางสาวจงกลณี จงอร่ามเรือง และคณะ

นักวิจัยที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. อุดม กักพล

ปี พ. ศ. 2548

สัญญาเลขที่ MRG4680112

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การสำรวจสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร
ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลใน
แถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

**A screening of bioactive natural products from sea
grasses and seaweeds around the eastern coast of
Thailand**

คณะผู้วิจัย

1. นางสาวจงกลณี จงอร่ามเรือง
2. นางสาวเนาวรัตน์ กองคำ
3. นางสาวธิดารัตน์ น้อยรักษา

สังกัด

ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา
ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล
มหาวิทยาลัยบูรพา

นักวิจัยที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. อุดม กักผล

ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และทบวงมหาวิทยาลัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ที่ให้อีกโอกาส และกราบขอบพระคุณคณะกรรมการ ผู้ทรงคุณวุฒิ และเจ้าหน้าที่สกว. ทุกท่านด้วยค่ะ ขอกราบขอบพระคุณ ศ. ดร. อุดม กักพล ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่รับเป็นนักวิจัยที่ปรึกษา กราบขอบพระคุณ ศ. ดร. สมศักดิ์ รุจิรวัฒน์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการวิจัยทางเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์และอนุญาตให้ส่งสารบางตัวที่แยกได้ เพื่อวิเคราะห์หามวลด้วย Mass spectrometer โดยมีคุณนิติรัตน์ ฉิมน้อย นักเคมีของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์เป็นผู้กรุณาช่วยวิเคราะห์ให้ โดยมีได้คิดค่าใช้จ่าย ขอขอบคุณ ดร. ปรีชา ภูวไพริติธาล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำพูดคุยบางประการเกี่ยวกับ chlorophyll และ steroid ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุภาภรณ์ นพคุณดิษฐ์รัตน์ ภาควิชาเทคโนโลยีภาพถ่าย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น และอาจารย์จอมใจ ลูกใส ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งกำลังลาศึกษาต่อต่างประเทศ ที่มีส่วนช่วยในเรื่องการค้นหามูลบางส่วนจาก SciFinder นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือ ในด้านการเก็บตัวอย่างเป็นอย่างดีจากคุณเพ็ญแข คุณวรงค์เดช คุณเจษฎา เจริญวัฒน์ และคุณนพพล คำชาย นักวิชาการประมงของศูนย์ศึกษาการพัฒนาประมง อ่าวคุ้งกระเบน ขอขอบพระคุณ ดร. พิชัย สนแจ้ง ผู้อำนวยการสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้ความอนุเคราะห์ และอนุญาตทีมงานเข้าช่วยเก็บตัวอย่าง โดยมีคุณธิดารัตน์ น้อยรักษา และคุณสุชา มั่นคงสมบูรณ์ นักวิจัยของหน่วยวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาช่วยเหลือด้านการดำน้ำเก็บตัวอย่างบางตัว และคุณธิดารัตน์ น้อยรักษา ยังกรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการ key taxonomy ของตัวอย่างที่เก็บได้ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. อรุณี เทอดเทพพิทักษ์ ผศ. ขจิตภัย พิทยม่อง และอาจารย์เมทินี จามกระโทก ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาช่วยเหลือ ติดต่อประสานงาน และวางแผนในการเก็บตัวอย่าง ตลอดจนคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนิสิตภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา ที่มีส่วนช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่าง และขอบคุณภาควิชาเคมีที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย หายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาผู้มีพระคุณ และครูบาอาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอนให้ความรู้ และขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ และเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือให้กำลังใจตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
ความสำคัญ และที่มาของปัญหา	3
วัตถุประสงค์ของโครงการ และผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
ระเบียบวิธีวิจัย	4
ผลการทดลอง	6
ผลการเก็บตัวอย่าง	6
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัด	7
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจงของสารสกัด	8
ผลการแยกสาร และทำสารให้บริสุทธิ์	11
ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร	12
ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจงของสารที่แยกได้	16
สรุปผลการทดลอง	18
ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	21

สัญญาเลขที่ MRG4680112

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัย สำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

โครงการ: การสำรวจสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลใน
แถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

จงบกลณี จงอร่ามเรือง* เนาวรัตน์ กองคำ* ธิดารัตน์ น้อยรักษา** และอุดม กักผล***

บทคัดย่อ

การสกัดสารจากสาหร่ายทะเล และหญ้าทะเล 35 ตัวอย่างที่เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบน และชายหาดบางแสน ทั้งหมด 16 สปีชีส์ ด้วยเมทานอล แล้วทำ partition ต่อด้วยไดคลอโรมีเทนและเอธิลอะซิเตต (1:1) ได้สารสกัด (crude extracts) ทั้งหมด แล้วนำสารสกัด 12 สปีชีส์ที่เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบน และสารสกัด 4 สปีชีส์ที่เก็บจากชายหาดบางแสนมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)ฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริม (anti-*HSV-1*) ฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสามชนิด ได้แก่ มะเร็งในช่องปาก (anti-KB) มะเร็งเต้านม (anti-BC) และมะเร็งปอด (anti-NCI-H187) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (anti-TB) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่าสารสกัด 14 สปีชีส์ แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริม และยับยั้งเชื้อวัณโรค อย่างไรก็ตามไม่มีสารสกัดใดที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ และมีเพียงสปีชีส์เดียวคือ *Dictyota* sp. เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ที่น่าสนใจคือสารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสามชนิดมาก (IC_{50} 2.17, 2.27 และ 1.90 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ KB, BC และ NCI-H187 ตามลำดับ) สารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. ยังแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดได้ดีมาก (IC_{50} 4.18 $\mu\text{g/mL}$) จากนั้นนำสารสกัดของหญ้าทะเล *Halophila ovalis*, *Halodule pinifolia*, *Enhalus acoroides* สาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. และสาหร่ายสีเขียว *Caulerpa lentillifera* มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย column และ preparative thin layer chromatography ได้สารตั้งต้นคือ sulfur (1) และ indole-3-carboxaldehyde (2) steroid (3) จากหญ้าทะเล *Halophila ovalis*, *Enhalus acoroides* และ *Halodule pinifolia* ตามลำดับ diterpene (4) และ carotenoid (5) จากสาหร่าย *Dictyota* sp. อีกทั้ง palmitic acid (6) และ steroid (7) จากสาหร่ายสีเขียว *Caulerpa lentillifera* โดยที่ sulfur (1) และ steroid (3) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ IC_{50} 39.8 และ 38.6 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริมของ sulfur (1), steroid (3) และ carotenoid (5) ที่ IC_{50} 10.6, 5.5 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคของ sulfur (1), indole-3-carboxaldehyde (2), steroid (3), diterpene (4) และ steroid (7) ที่ IC_{50} 0.78, 50, 6.25, 200, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์อย่างอ่อนของ sulfur (1) ที่ IC_{50} 46.09 $\mu\text{g/mL}$ และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียของ carotenoid (5) ที่ IC_{50} 2.9 $\mu\text{g/mL}$

* ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

**สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

***ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Secondary metabolites and bioactivity screening of algae and sea grasses from Khun Kraben Bay and Bangsaen Beach, Thailand

Jongkolnee Jongaramruong ^{a,*}, Naowarut Kongkum ^a, Thidarat Noiraksa ^b and Udom Kokpol ^c

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131, Thailand

^bThe Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131, Thailand

^cDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

A total of sixteen species from thirty-five samples of algae and sea grasses were collected from Khun Krabaen Bay and Bangsaen Beach. Extracts of twelve species from Khun Krabaen Bay and four species from Bangsaen Beach were screened for cytotoxicity against vero cell, anti-*Herpes simplex* virus type 1 (HSV-1), anti-cancer (KB, BC and NCI-H187), anti-fungal *Candida albicans*, anti-tuberculosis (TB), anti-malarial *Plasmodium falcioarum* K1 strain and anti-inflammatory activities. A total of fourteen species showed anti-HSV-1 and anti-TB activities, however, none of them was active against anti-inflammatory activity. The brown alga *Dictyota* sp. displayed strongly active against anti-KB, anti-BC and anti-NCI-H187 (IC₅₀ 2.17, 2.27 and 1.90 µg/mL, respectively). Moreover, *Sargassum* sp. was also strongly active against anti-NCI-H187 at IC₅₀ 4.18 µg/mL. A further purification of the crude extracts by column and preparative thin layer chromatography to afford sulfur (1) from *Halophila ovalis* and *Enhalus acoroides*, indole-3-carboxaldehyde (2) and steroid (3) from *Halodule pinifolia*, the new diterpene, dihydroxydictyolactone (4) and carotenoid (5) from *Dictyota* sp., together with palmitic acid (6) and steroid (7) from *Caulerpa lentillifera*. Sulfur (1) and steroid (3) showed cytotoxicity at IC₅₀ 39.8 and 38.6 µg/mL, respectively. Sulfur (1), steroid (3) and carotenoid (5) were active against anti-HSV-1 at IC₅₀ 10.6, 5.5 and 50 µg/mL, respectively. In addition, sulfur (1), indole (2), steroid (3), diterpene (4), palmitic acid (6) and steroid (7) were active against anti-TB at IC₅₀ 0.78, 50, 6.25, 200, 50 and 100 µg/mL, respectively. Finally, sulfur (1) displayed weakly anti-fungal activity at IC₅₀ 46.09 µg/mL and carotenoid (5) showed anti-malarial activity at IC₅₀ 2.9 µg/mL.

*

Corresponding author. Tel.: 0-3874-5900 Ext. 3067; fax: 0-3839-3496, e-mail: jongkoln@buu.ac.th

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันนักเคมี และเภสัชกรได้ให้ความสนใจทำการค้นคว้าหาสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทรัพยากรทางทะเล เพื่อนำมาใช้เป็นยารักษาโรค นอกเหนือจากการศึกษาจากยาพื้นบ้านและสมุนไพรบนบกที่ทำกันมานานแล้ว เนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่าโลกที่เราอาศัยอยู่นี้ มีส่วนประกอบที่เป็นพื้นน้ำ หรือ มหาสมุทรอยู่ถึงสามในสี่ส่วน จึงทำให้เป็นที่สะสมสิ่งมีชีวิตแหล่งใหญ่ที่สุด ที่สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำนวนมากและความหลากหลายตามแหล่งกำเนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากพืชหรือสัตว์ทะเลเมื่อนำมาทำการศึกษาแล้วพบว่า มีฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางยาแล้ว ก็สามารถนำโครงสร้างของสารที่สกัดได้มาทำเป็นแนวทางเพื่อทำการสังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นยาต่อไป ข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่นได้อีก โดยใช้เป็นข้อมูลทางเคมีเพื่อศึกษานิเวศวิทยาของสิ่งมีชีวิตในท้องทะเลเพื่อรวบรวมเป็นแหล่งข้อมูลสำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง หรือหากพบว่าสิ่งมีชีวิตทางทะเลนั้นมีเป็นจำนวนมากเมื่อเก็บมาแล้วไม่ส่งผลกระทบต่อนิเวศวิทยาก็อาจนำสิ่งมีชีวิตทางทะเลที่มีสารที่น่าสนใจนั้นมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพที่สามารถเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรธรรมชาติทางทะเล เป็นต้น

ตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่น่าสนใจจากสาหร่ายทะเล เช่น Dolabellane diterpenes บางตัวแยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. ที่ออกฤทธิ์ทาง cytotoxicity ซึ่งยังพบสารประเภทนี้ใน sea hare บางชนิดด้วย และ polyhalogenated terpene เช่น holomon จากสาหร่ายสีแดง *Portieria hornemannii* ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเนื้องอก เป็นต้น สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาหร่ายทะเลที่ให้ผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ได้ยกมาแสดงพอสังเขปดังนี้ สารในกลุ่ม geranylgeraniol และอนุพันธ์ที่มีออกซิเจนอยู่ในโครงสร้างบางตัวที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Bifurcaria bifurcata* เป็นสารป้องกันตัว (defensive diterpenoid) หรือแสดงการต้านการถูกกิน (antifeeding activity) หรือสารในกลุ่ม spatanes บางชนิดที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Stoechospermum marginatum* และ *Dilophus okamurai* ซึ่งคล้ายคลึงกับสารที่มีโครงสร้างเป็น mulinane ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)¹

สารในกลุ่ม indole alkaloids บางชนิดที่พบในสารสกัดอะซิโตนของสาหร่ายสีแดง *Chondria atropurpurea* มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ indole ที่พบในรากของหัวหอม *Allium fistulosum* ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา/ยีสต์ (antifungal activity)²

สารในกลุ่ม halogenated acyclic monoterpenes ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดง *Plocamium cartilaginum* แสดงฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotic activity) ต่อต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*³ นอกจากนี้สาหร่ายสีแดง *Plocamium telfairiae* ยังให้สารพวก halogenated cyclic monoterpenes ที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของตัวอ่อนของยุง (insecticidal activity against mosquito larvae)^{4 5}

ประเทศไทยมีชายฝั่งทะเลที่มีความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายทางชีวภาพสูง เนื่องจากสภาพภูมิประเทศที่อยู่ในแถบชายฝั่งทะเลตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชียที่อยู่ใกล้กับเส้นศูนย์สูตรที่เป็นเขตร้อน จึงทำให้มีระบบนิเวศที่เหมาะสมในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในทะเลจำนวนมาก ประกอบกับมหาวิทยาลัยบูรพาเป็นมหาวิทยาลัยที่ให้ความสำคัญกับการวิจัยและการศึกษาเพื่อหาความรู้ใหม่ๆ และนำทรัพยากรทางทะเลมาใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาประเทศ โดยขณะนี้มีมหาวิทยาลัยได้เปิดวิทยาเขตที่จังหวัดจันทบุรีใกล้กับหาดคุ้งกระเบนที่มีความอุดมสมบูรณ์ของหญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลจำนวนมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของการวิจัยด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากหญ้าและสาหร่ายทะเลในแถบชายฝั่ง

ทะเลภาคตะวันออก รวมทั้งที่หาดคุ้งกระเบนด้วย เพื่อหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่น่าสนใจนำมาพัฒนาใช้เป็นยารักษาโรคหรือเพื่อใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ และผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อสำรวจสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น จากหญ้าและสาหร่ายทะเลในแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก
2. หาโครงสร้างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่สกัดออกมาได้ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแบบเฉพาะเจาะจง เพื่อให้ได้สารที่มีประโยชน์ทางยา
3. เพื่อช่วยในการผลิตมหาบัณฑิต จำนวนอย่างน้อย 1 คน และบัณฑิตทางเคมี 3-5 คนที่มีความรู้ในการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี ได้ตัวอย่างทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง มีซ้ำกัน เหลือ 12 สปีชีส์ และตัวอย่างจากบางแสน จ. ชลบุรี 10 ตัวอย่าง มีซ้ำกัน เหลือ 4 สปีชีส์ ดังนั้นได้ตัวอย่างทั้งหมด 16 สปีชีส์ ดังตารางที่ 1 ในผลการทดลอง สำหรับ voucher herbarium specimen เก็บรักษาไว้ที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

2. การสกัดสาร

สกัดตัวอย่างด้วยเมทานอล แล้วทำ partition ต่อด้วยไดคลอโรมีเทน : เอทิลอะซิเตต (1:1) ได้สารสกัดของตัวอย่างทั้งหมด 35 ตัวอย่าง

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นโดยวิธี Lettuce seed และ brine shrimp bioassay

นำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นโดยวัดอัตราการเจริญของเมล็ดผักกาดหอม และอัตราการตายของไรน้ำเค็มโดยเตรียมการทดลองดังนี้

3.1 Lettuce seed bioassay

วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเมล็ดผักกาดหอมใช้วิธีการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีของ Elakovich, S.D. และ Wooten J.W. (1991)⁶ นำเมล็ดผักกาดขาวมาแช่ 1 คืน แล้วนำมาวางลงในจาน ๆ ละ 10 เมล็ด โดยในแต่ละจานมีสำลีนุ้ไว้เท่า ๆ กัน และมีกระดาษทิชชูปิดทับอีกชั้นหนึ่ง จากนั้นหยดสารสกัดที่ละลายอยู่ในเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 mg/mL ลงบนกระดาษที่เตรียมไว้ดังกล่าว ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยแห้ง ก่อนเติมน้ำกลั่นลงไปจานละ 5 mL บันทึกผลทุก 24 ชั่วโมง โดยวัดจากส่วนที่เหนือรากจนถึงยอด เป็นเวลา 10 วัน และเติมน้ำกลั่นเพิ่มวันละ 5 mL ทำการทดลอง 5 ชุดซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับตัวควบคุม

3.2 Brine shrimp bioassay

วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่ออาร์ทีเมีย ใช้วิธีทดสอบที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Blackman, A. (2000)⁷ นำไข่ของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) มาฟักในน้ำทะเลเทียม 24 ชั่วโมง นำตัวอ่อนของอาร์ทีเมียมาทดสอบโดยหยดสารสกัดซึ่งละลายอยู่ในเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 mg/mL ลงบน

กระดาษกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 cm ปลอยตัวทำละลายระเหยแห้ง ก่อนใส่น้ำทะเลเทียมลงไป ขวดละ 5 mL แล้วจึงนำตัวอ่อนของอาร์ทีเมีย จำนวน 10 ตัวใส่ลงในแต่ละขวด รวมทั้งขวดที่มีกระดาษที่หยดเฉพาะเมทานอลอย่างเดียวน้ำทะเลเทียมเป็นตัวควบคุมการทดสอบด้วย แล้วหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง นับจำนวนตัวอ่อนของอาร์ทีเมียที่ตายในแต่ละสารสกัด ทำการทดลอง 5 ชุดซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับตัวควบคุม

4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจงสำหรับสารสกัดที่ได้

ส่งสารสกัดที่ได้ ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจง ตามที่มีให้บริการที่ห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ได้แก่

- 4.1 Human mouth carcinoma; KB
- 4.2 Breast cancer; BC
- 4.3 *Herpes simplex virus* type 1; HSV-1
- 4.4 Human small cell lung cancer; NCI-H187
- 4.5 Anti-fungal (*Candida albicans*, ATCC method)
- 4.6 Anti-tuberculosis (Alamar blue susceptibility test, MABA)
- 4.7 Anti-malarial
- 4.8 Anti-inflammatory (cox-1 และ cox-2)

5. การทำสารให้บริสุทธิ์

เลือกสารสกัดที่น่าสนใจ มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ (Flash column chromatography) และ preparative thin layer chromatography (PTLC)

6. การวิเคราะห์โครงสร้างของสาร

เมื่อได้สารบริสุทธิ์แล้ว นำไปวิเคราะห์ NMR spectroscopy และ mass spectrometry เพื่อหาโครงสร้างของสารที่ได้

7. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจงสำหรับสารบริสุทธิ์

ส่งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจงที่ BIOTEC

ผลการทดลอง

1. ผลการเก็บตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่เก็บได้

ลำดับ	ชื่อ	สถานที่	วัน/เดือน/ปี
สาหร่ายสีแดง			
1	<i>Acanthophora spicifera</i> (Vahl) Børgesen	หาดวอนนภา บางแสน	1/10/2003
2	<i>Acanthophora spicifera</i> (Vahl) Børgesen	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	1/11/2003
3	<i>Acanthophora spicifera</i> (Vahl) Børgesen	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	28/12/2003
4	<i>Gracilaria rubra</i> C.F. Chang et B.M. Xia	หาดวอนนภา บางแสน	1/10/2003
5	<i>Gracilaria</i> sp.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	1/11/2003
6	<i>Gracilaria</i> sp.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	28/12/2003
7	<i>Hypnea charoides-valentiae</i> complex	หาดวอนนภา บางแสน	1/10/2003
8	<i>Hypnea</i> sp.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	1/11/2003
9	<i>Laurencia</i> sp.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	1/11/2003
10	<i>Laurencia</i> sp.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	28/12/2003
11	<i>Solieria</i> sp.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	13/6/2003
12	<i>Solieria</i> sp.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	1/11/2003
13	<i>Solieria</i> sp.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	28/12/2003
14	<i>Solieria</i> sp.	หาดวอนนภา บางแสน	25/2/2004
สาหร่ายสีเขียว			
15	<i>Acetabularia</i> sp.	ทะเลอ่าวคู้กระเบน	24/1/2004
16	<i>Caulerpa lentillifera</i> J. Agardh	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	1/11/2003
17	<i>Caulerpa lentillifera</i> J. Agardh	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	28/12/2003
18	<i>Chaetomorpha</i> sp. *	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	1/11/2003
19	<i>Chaetomorpha</i> sp. **	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคู้กระเบน	28/12/2003
20	<i>Chaetomorpha</i> sp. ***	หาดวอนนภา บางแสน	25/2/2004
21	<i>Chaetomorpha</i> sp. ****	หาดวอนนภา บางแสน	27/2/2004
สาหร่ายสีน้ำตาล			
22	<i>Dictyota</i> sp.	หาดวอนนภา บางแสน	1/10/2003
23	<i>Dictyota</i> sp.	หาดวอนนภา บางแสน	26/3/2005
24	<i>Padina minor</i> Yamada	ทะเลอ่าวคู้กระเบน	24/1/2004
25	<i>Padina tetrastromatica</i> Hauck	หาดวอนนภา บางแสน	25/2/2004
26	<i>Sargassum oligocystum</i> Montagne	ทะเลอ่าวคู้กระเบน	28/12/2003
27	<i>Sargassum oligocystum</i> Montagne	ทะเลอ่าวคู้กระเบน	24/1/2004
28	<i>Sargassum polycystum</i> G. Agardh	หาดวอนนภา บางแสน	27/2/2004

หญ้าทะเล			
29	<i>Enhalus acoroides</i> (Linnaeus f.) Royle	ทะเลอ่าวคุ้งกระเบน	2/11/2003
30	<i>Enhalus acoroides</i> (Linnaeus f.) Royle	ทะเลอ่าวคุ้งกระเบน	24/1/2004
31	<i>Halodule pinifolia</i> (Miki) den Hartog	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคุ้งกระเบน	1/11/2003
32	<i>Halodule pinifolia</i> (Miki) den Hartog	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคุ้งกระเบน	28/12/2003
33	<i>Halodule pinifolia</i> (Miki) den Hartog	ทะเลอ่าวคุ้งกระเบน	24/1/2004
34	<i>Halophila ovalis</i> (R. Brown) Hooker f.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคุ้งกระเบน	1/11/2003
35	<i>Halophila ovalis</i> (R. Brown) Hooker f.	บ่อโครงการพระราชดำริ อ่าวคุ้งกระเบน	28/12/2003

หมายเหตุ

- * มีสาหร่าย *Cladophora* sp. และ *Laurencia* sp. ปนอยู่บ้าง แยกด้วยตาเปล่าไม่หมด
- ** มีสาหร่าย *Cladophora* sp. และ *Laurencia* sp. ปนอยู่บ้าง แยกด้วยตาเปล่าไม่หมด
- *** มีสาหร่าย *Acanthophora* sp., *Hypnea* sp., *Gracilaria* sp. และ *Solieria* sp. ปนอยู่ด้วย
- **** มีสาหร่าย *Acanthophora* sp., *Hypnea* sp. และ *Gracilaria* sp. ปนอยู่ด้วย

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัด

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ Lettuce seed bioassay ของสารสกัด

สารสกัด	อัตราการเจริญเติบโตของเมล็ดผักกาดขาว (%) ที่ความเข้มข้น (ppm)				
	control	10	100	1000	10000
<i>Acanthophora spicifera</i>	100	-	66.3	53.0	18.1
<i>Gracilaria</i> sp.	100	-	95.7	97.8	93.5
<i>Hypnea</i> sp.	100	-	100	19.2	20.6
<i>Laurencia</i> sp.	100	-	100	62.8	90.2
<i>Solieria</i> sp.	100	-	100	100	53.1
<i>Dictyota</i> sp.	100	38.5	56.8	63.6	60.2
<i>Sargassum oligocystum</i>	100	87.5	93.8	75.0	-
<i>Enhalus acoroides</i>	100	97.4	100	66.7	-
<i>Halodule pinifolia</i>	100	84.7	95.2	63.9	-

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Brine shrimp bioassay ของสาหร่าย

สาหร่าย	อัตราการรอดของไรน้ำ (%) ที่ความเข้มข้น (ppm)				
	control	10	100	1000	10000
<i>Acanthophora spicifera</i>	100	100	100	58.3	-
<i>Gracilaria</i> sp.	100	83.3	83.3	58.3	-
<i>Hypnea</i> sp.	100	-	76.4	62.1	71.4
<i>Laurencia</i> sp.	100	100	0	40.0	-
<i>Solieria</i> sp.	100	80.0	100	100	-
<i>Dictyota</i> sp.	100	33.6	50.4	76.8	-
<i>Sargassum oligocystum</i>	100	26.4	60.0	84.0	-
<i>Enhalus acoroides</i>	100	97.4	100	66.7	-
<i>Halodule pinifolia</i>	100	84.7	95.2	63.9	-

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจงของสาหร่าย

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายจาก BIOTEC

ชื่อ	Cytotoxicity IC ₅₀	HSV IC ₅₀	KB IC ₅₀	BC IC ₅₀	NCI IC ₅₀	Fungal IC ₅₀	TB MIC	Malarial EC ₅₀	Inflam.
<i>Hypnea</i> sp.	-	2.0	-	-	-	-	50	-	-
<i>Gracilaria rubra</i>	-	2.4	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acanthophora spicifera</i> *	-	4.5	-	-	-	-	100	-	-
<i>Dictyota</i> sp.	13.1	0.7	2.17	2.27	1.90	-	6.25	2.9	-
<i>Acanthophora spicifera</i> **	28.3	5.9	-	12.64	-	36.22	12.5	-	-
<i>Solieria</i> sp.	-	8.2	-	-	-	-	50	-	-
<i>Gracilaria</i> sp.	-	40.0	-	-	-	-	200	-	-
<i>Laurencia</i> sp.	-	5.3	-	-	-	-	50	-	-
<i>Caulerpa lentillifera</i>	-	15.1	-	-	-	-	100	-	-
<i>Halophila ovalis</i>	26.6	2.2	-	-	-	12.55	25	-	-
<i>Chaetomorpha</i> sp.***	-	16.0	-	17.67	-	-	100	-	-
<i>Halodule pinifolia</i>	-	6.1	-	-	-	-	50	-	-
<i>Enhalus acoroides</i>	-	3.5	-	-	-	40.46	50	-	-
<i>Sargassum oligocystum</i>	-	-	-	-	4.18	-	-	-	-
<i>Padina minor</i>	-	21.6	-	-	14.16	-	200	-	-
<i>Acetabularia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	200	-	-

หมายเหตุ * เก็บจากบางแสน ** เก็บจากจันทบุรี *** มี *Cladophora* sp. และ *Laurencia* sp. ปนอยู่บ้าง

1. IC_{50} และ MIC มีหน่วยเป็น $\mu\text{g/mL}$; $IC_{50} = 50\%$ inhibitory concentration

2. การแปลผลการทดสอบ

2.1 ความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ปกติ (cytotoxicity test against vero cells)

- final concentration ของสารที่ใช้ทดสอบเท่ากับ $50\ \mu\text{g/mL}$
- ในการแปลผลจะพิจารณาจากค่า % Cell viability ตามหลักเกณฑ์ ดังนี้
 - ถ้า % Cell viability $\geq 50\%$ รายงานผลเป็นค่า $IC_{50} > 50\ \mu\text{g/mL}$
 - ถ้า % Cell viability $< 50\%$ รายงานผลเป็นค่า IC_{50} ที่หาได้จากการทำ serial dilution
- ใช้ Ellipticine เป็น positive control; $IC_{50} = 0.4 \pm 0.1\ \mu\text{g/mL}$ สำหรับ cytotoxicity test

2.2 ฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเริมชนิดที่ 1 (Anti-Herpes simplex virus type 1)

- final concentration ของสารที่ใช้ทดสอบเท่ากับ $50\ \mu\text{g/mL}$
- ในการแปลผลจะพิจารณาจาก 2 ส่วน คือ
 - สารนั้นต้องทดสอบความเป็นพิษต่อ host cell (Vero) และได้ % cell viability $> 50\%$
 - Anti HSV-1 activity พิจารณาจากค่า % inhibition ของ HSV-1 ตามหลักเกณฑ์ ดังนี้

<u>% inhibition of HSV-1</u>	<u>Anti HSV-1 activity</u>
< 25 %	inactive
25-35 %	weakly active
> 35-50 %	moderately active
> 50%	active (ทำ serial dilution เพื่อหาค่า IC_{50})

- ใช้ Acyclovir เป็น positive control; $IC_{50} = 1.1 \pm 0.3\ \mu\text{g/mL}$ สำหรับ anti-HSV-1 test

2.3 ฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (Anti-human small cell lung cancer; anti-NCI-H187)

<u>ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)</u>	<u>Activity</u>
> 20	inactive
> 10-20	weakly active
5-10	moderately active
< 5	strongly active

- ใช้ Ellipticine; $IC_{50} = 0.35 \pm 0.5\ \mu\text{g/mL}$ เป็น positive control สำหรับ anti-NCI-H187 ทดสอบตัวอย่าง 1-13
- ใช้ Ellipticine; $IC_{50} = 0.32 \pm 0.17\ \mu\text{g/mL}$ และ Doxorubicin; $IC_{50} = 0.03 \pm 0.01\ \mu\text{g/mL}$ เป็น positive control สำหรับ anti-NCI-H187 ทดสอบตัวอย่าง 14-16

2.4 ฤทธิ์ต้านมะเร็งปาก (Anti-cancer oral human epidermal carcinoma; anti-KB): Colorimetric method; Sulforhodamine B assay (SRB)

<u>ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)</u>	<u>Activity</u>
> 20	inactive
> 10-20	weakly active
5-10	moderately active
< 5	strongly active

- ใช้ Ellipticine; $IC_{50} = 0.83 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ และ Doxorubicin; $IC_{50} = 0.15 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ เป็น positive control สำหรับ anti-KB

2.5ฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม (Anti-breast cancer; anti-BC): Colorimetric method; Sulforodamine B assay (SRB)

ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Activity
> 20	inactive
> 10-20	weakly active
5-10	moderately active
< 5	strongly active

- ใช้ Ellipticine; $IC_{50} = 0.92 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$ และ Doxorubicin; $IC_{50} = 0.13 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ เป็น positive control สำหรับ anti-BC

2.6ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ (Anti-fungal activity against *Candida albicans* (in vitro); anti-fungal):

Colorimetric method; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Activity
> 50	inactive
> 10-20	weakly active
5-10	moderately active
< 5	strongly active

- ใช้ Amphotericin B; $IC_{50} = 0.37-0.043 \mu\text{g/mL}$ เป็น positive control สำหรับ anti-fungal

2.7ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (Anti-malarial activity against *Plasmodium falciparum*, K1 strain):

Microculture radioisotope technique

- Final concentration ของสารที่ใช้ทดสอบ = $10 \mu\text{g/mL}$
- Anti-malarial activity พิจารณาจากค่า % inhibition ต่อเชื้อมาลาเรีย ตามหลักเกณฑ์ดังนี้

% inhibition	Anti-malarial activity
< 50	inactive
> 50	active (ทำ serial dilution เพื่อหาค่า IC_{50})

- ใช้ Dihydroartemisinin; $EC_{50} = 4.4 \text{ nM}$ เป็น positive control สำหรับ anti-malarial activity

2.8ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (Anti-tuberculous activity against *Mycobacterium tuberculosis* (in vitro), H37Ra): Microplate Alamar blue assay (MABA)

- ทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น $200 \mu\text{g/mL}$
 รายงานผลเป็น active แสดงค่า MIC จากการทำ two-fold dilution test
 รายงานผลเป็น inactive สารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้น $> 200 \mu\text{g/mL}$
- ใช้ Rifampicin (RMP); MIC = $0.0047 \mu\text{g/mL}$, Kanamycin (KM); MIC = $25 \mu\text{g/mL}$ และ Isoniazide (INH); MIC = $0.05 \mu\text{g/mL}$ เป็น positive control สำหรับ anti-tuberculous activity

2.9 Anti-COX-1 activity และ Anti-COX-2 activity

- ทดสอบที่ความเข้มข้น $10^{-7} - 10^{-5} \text{ g/mL}$ ทั้ง COX-1 และ COX-2 enzyme
- ทุกตัวอย่างแสดงผล inactive ที่ 10^{-5} g/mL ทั้ง COX-1 และ COX-2 enzyme