

4. ผลการแยกสาร และทำสารให้บริสุทธิ์

จากผลการทดสอบทางชีวภาพ เลือกกลุ่มตัวอย่างที่น่าสนใจมาทำการแยกต่อดังนี้

กลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาล

<i>Dictyota</i> sp.	(รายงาน)
<i>Sargassum</i> sp.	(ยังไม่เสร็จสิ้น จึงไม่รายงานในโครงการนี้)
<i>Padina</i> sp.	(ยังไม่เสร็จสิ้น จึงไม่รายงานในโครงการนี้)

กลุ่มสาหร่ายสีเขียว

<i>Caulerpa lentillifera</i>	(รายงาน)
------------------------------	----------

กลุ่มสาหร่ายสีแดง

<i>Laurencia</i> sp.	(ยังไม่เสร็จสิ้น จึงไม่รายงานในโครงการนี้)
<i>Acanthophora spicifera</i>	(ยังไม่เสร็จสิ้น จึงไม่รายงานในโครงการนี้)

กลุ่มหญ้าทะเล

<i>Enhalus acoroides</i>	(รายงาน)
<i>Halodule pinifolia</i>	(รายงาน)
<i>Halophila ovalis</i>	(รายงาน)

ผลการแยกสาร

กลุ่มหญ้าทะเล

นำหญ้าทะเลสดทั้งสามชนิดที่เก็บมาได้ คือ *Halophila ovalis*, *Halodule pinifolia* และ *Enhalus acoroides* มาแยกสกัดด้วยเมทานอล แล้วทำ partition ต่อด้วยไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตต (1:1) ได้สารสกัดของหญ้าทะเล *Halophila ovalis* (0.7015 g), *Halodule pinifolia* (10.1786 g) และ *Enhalus acoroides* (6.0646 g) พบว่าสารสกัดของหญ้าทะเล *Halophila ovalis* และ *Enhalus acoroides* ให้ผลึกสีเหลืองของกำมะถัน (1) (S_8) 19 และ 57 mg ตามลำดับ หลังจากตกผลึกในเฮกเซนจาก fraction แรกของการแยกด้วยคอลัมน์ที่มีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ

นำสารสกัดของหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* มาแยกต่อกับคอลัมน์ ได้ 8 fractions โดยมีเฮกเซนและเพิ่มโพลาริตีขึ้นด้วยการเติมเอทิลอะซิเตตในเฮกเซน ตามด้วยเอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับเป็นวัฏจักร จากนั้นนำ fraction ที่ 5 มาทำ PTLC ต่ออีก 5 ครั้ง ด้วยระบบตัวทำละลาย 5% เอทิลอะซิเตตในไดคลอโรมีเทน 3%, 5%, 3% และ 30% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน ให้ indole-3-carboxaldehyde (2) (5.5 mg) นอกจากนี้ยังแยกกลอโรฟิลล์ได้อีก 2 ตัว และแยก steroid (3) (5 mg) ได้อีก 1 ตัว จากหญ้าทะเลชนิดนี้

กลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาล

สกัดสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. ด้วยเมทานอล แล้วทำ partition ต่อด้วยไดคลอโรมีเทน และเอทิลอะซิเตต ให้สารสกัดสีเขียวคล้ำ 14.0478 g แล้วแยกด้วยคอลัมน์โดยใช้เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล เป็นวัฏจักร ตามลำดับ นำ fraction ที่ออกมาด้วยเอทิลอะซิเตต 3.7716 กรัม มาแยกต่อกับคอลัมน์อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ตัวชะเป็นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน 50% เอทิลอะซิเตตในไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ จากนั้นนำ fraction ที่ 3 (50% เอทิลอะซิเตตในไดคลอโรมีเทน) 1.3147 กรัม มาทำ PTLC 2 ครั้ง โดยใช้ไดคลอโรมีเทน และ 40% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน ตามลำดับ เป็น mobile phase ให้ fraction ที่เป็นน้ำมันสีเหลือง 66.4 mg และ fraction ที่มีสีแดง 205.1 mg แล้วนำ fraction ที่เป็นน้ำมันสีเหลือง มาทำ PTLC 2 ครั้ง โดยใช้ 40% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน และ 20% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน ตามลำดับ ให้สารบริสุทธิ์ diterpene (4) (10.1 mg) และนำ fraction ที่มีสีแดงมาทำ

ให้บริสุทธิ์ด้วย PTLC 5 ครั้ง โดยใช้ 50% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน ไคคลอโรมีเทน : เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน (5:3:2), 25%, 30% เอทิลอะซิเตตในไคคลอโรมีเทน และ 50% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน เป็น mobile phase ตามลำดับ ให้สารบริสุทธิ์ carotenoid (5) (14.5 mg)

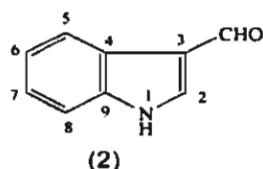
กลุ่มสารยาสีเขียว

นำสารยาสีเขียว *Caulerpa lentillifera* มาสกัดด้วยเมทานอล แล้วทำ partition ต่อด้วยไคคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตต ได้สารสกัด 2.4264 g แยกต่อด้วยคอลัมน์ ได้ 6 fractions จากนั้นนำ fraction แรก มาทำ PTLC (15% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน) ได้ 6 fractions แล้วเลือก fraction ที่สาม มาทำ PTLC ต่ออีก 2 ครั้ง ในระบบ 10% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน ทั้งสองครั้ง ได้ palmitic acid (6) (0.0147 g) จากนั้นนำ fraction ที่สองของการลงคอลัมน์ครั้งแรกมาแยกต่อด้วย PTLC 3 ครั้ง ด้วยระบบตัวทำละลาย 15%, 20% และ 15% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน ได้ fraction ที่เป็นของแข็งสีขาว นำมาตกผลึกในเฮกเซนได้ steroid (7) (6.1 mg) นอกจากนี้ยังแยกคลอโรฟิลล์ออกมาจากสารนี้ด้วย 9.5 mg

5. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร

Sulfur (1) แยกได้ในลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง ยืนยันได้จากข้อมูล GCMS ให้ m/z 256, 192, 160, 128, 96 และ 64 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ S_8

Indole-3-carboxaldehyde (2) แยกได้เป็นผงสีน้ำตาลอ่อน และมีสูตรโมเลกุลเป็น C_9H_7NO (ESI MS, m/z 146.0606 $[M+H]^+$) มี degree of unsaturation เท่ากับ 7 1H NMR แสดงอัลติไฮโดรตอนที่ δ 10.07 ppm และแสดงอะโรมาติกโปรตอน δ 7.33-8.33 ppm ^{13}C NMR และ DEPT แสดง methine carbon 6 ตัว และ quaternary carbon 3 ตัว เท่าที่ทราบสารนี้แยกได้จากหญ้าทะเลเป็นครั้งแรก

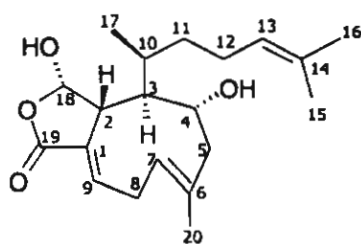


ตารางที่ 5 ^{13}C , 1H , COSY, HMBC data of Indol-3-carboxaldehyde (2) (400 MHz, δ ppm, $CDCl_3$)

No.	Carbon	Proton	COSY	HMBC
1	-	-	-	-
2	135.2 (CH)	7.85 s	-	-
3	136.6 (C)	-	-	H-2, H-5
4	119.8 (C)	-	-	H-2, H-10
5	122.0 (CH)	8.33 d	H-6	-
6	124.5 (CH)	7.33 t	H-5	H-7, H-8, H-10
7	123.1 (CH)	7.33 t	H-8	H-2, H-5, H-10
8	111.5 (CH)	7.43 d	H-7	H-6, H-7
9	128.0 (C)	-	-	-
10	185.2 (CH)	10.07 s	-	-

Steroid (3) ไม่ทราบสูตรโครงสร้างที่แน่นอน เนื่องจากสารอาจไม่บริสุทธิ์พอ จึงไม่ให้พิกัดกับ MS แต่จากข้อมูล NMR น่าจะเป็นโครงสร้างของ steroid สารนี้มีปริมาณค่อนข้างน้อยที่แยกออกมาได้ (5 mg) จึงยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์มากกว่านี้

Diterpene (4) แยกได้เป็นน้ำมันสีเหลือง และมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{30}O_4$ (ESI MS, m/z 335.2211 $[M+H]^+$) มี degree of unsaturation เท่ากับ 6 จาก ^{13}C NMR และ DEPT แสดงคาร์บอนทั้งหมด 20 ตัว และพบว่ามี methyl carbons 4 ตัว methylene carbons 4 ตัว methine carbon 8 ตัว และ quaternary carbons 4 ตัว โดยมีพันธะคู่ 4 คู่ ซึ่งเป็นหมู่คาร์บอนิลไปแล้ว 1 คู่ ข้อมูล NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของ Xenicane และตำแหน่ง C-18 ยังมี chemical shift ค่อนข้างต่ำคือ 5.88 และ 98.1 ppm จึงน่าจะต่อยูกับหมู่ไฮดรอกซี นอกจากนี้ข้อมูล NOESY ทำให้สามารถบอก relative stereochemistry ได้ว่าเป็น (2*S**, 3*S**, 4*R**, 6*E*, 9*E*, 10*R**, 18*S**)-4, 18-dihydroxy dictyolactone ซึ่งเป็นสารใหม่ที่มีหมู่ไฮดรอกซีเพิ่มขึ้นมาอีก 1 หมู่ จาก 4-hydroxydictyolactone ที่เคยแยกได้จาก *Dictyota* sp. ที่เก็บจากชายฝั่งทะเล Senegal⁶

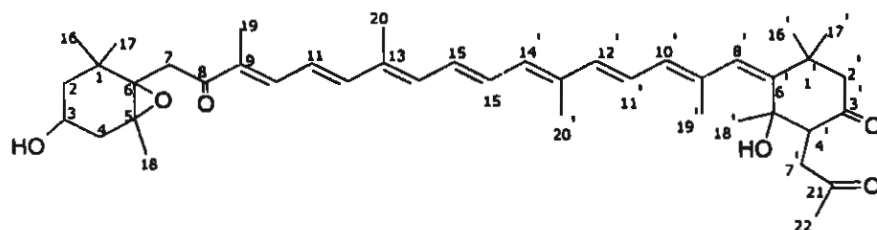


(4)

ตารางที่ 6 ^{13}C , 1H , COSY, HMBC and NOESY NMR data of dihydroxydictyolactone (4) (400 MHz, δ ppm, $CDCl_3$)

No	δ_C	δ_H	COSY	HMBC	NOESY
1	133.9 C	-	-	H-2, H-3, H-18	-
2	44.4 CH	3.19 s	H-3, H-9	H-3, H-4, H-9, H-18	H-18
3	50.0 CH	2.06 s	H-2	H-2, H-7, H-18	H-7
4	72.6 CH	4.32 t	H-5	H-2, H-3, H-5	H-5, H-17
5	49.7 CH ₂	2.18 dd, 2.37 d	H-4, H-5	H-3, H-11, H-17, H-20	H-4, H-7
6	136.3 C	-	-	H-5, H-8, H-9, H-20	H-4
7	125.2 CH	5.30 dd	H-8, H-20	H-5, H-8, H-9, H-20	-
8	29.6 CH ₂	2.98 m, 3.27 m	H-7, H-8, H-9	H-7, H-9	H-3, H-5, H-8
9	141.8 CH	7.01 d	H-2, H-8	H-8, H-20	H-7, H-9
10	32.5 CH	1.81 m	H-11, H-17	H-2, H-3, H-11, H-17	H-9
11	38.1 CH ₂	1.21 m	H-10, H-12, H-16	H-2, H-17	H-8
12	25.8 CH ₂	1.88 m	H-11, H-13	H-11, H-13	H-18
13	123.8 CH	4.99 br, t	H-12	H-12	-
14	132.0 C	-	-	-	-
15	17.7 CH ₃	1.55 s	-	-	-
16	25.6 CH ₃	1.65 s	H-11, H-17	H-11, H-17	-
17	18.2 CH ₃	1.07 d	H-10, H-16	H-10, H-16	H-4, H-18
18	98.1 CH	5.88 s	H-2, H-3	H-2, H-3	H-2, H-17
19	172.5 C	-	-	-	-
20	20.1 CH ₃	1.91 s	-	-	-

Carotenoid (5) แยกได้เป็นลักษณะแรงกวัดทูลสีแดง ที่มีสูตรโมเลกุล $C_{42}H_{56}O_6$ (APCI MS, m/z 659.4306 $[M+H]^+$) มี degree of unsaturation เท่ากับ 14 ^{13}C NMR และ DEPT แสดงคาร์บอน 42 ตัว ที่เป็น methyl carbons 11 ตัว methylene carbons 5 ตัว methine carbons 13 ตัว และ quaternary carbons 13 ตัว ซึ่งในนี้เป็นหมู่คาร์บอนิล 3 ตัว จากข้อมูล NMR สอดคล้องกับโครงสร้างของ tricyclic carotenoid ที่มี C-5 δ 66.3 และ C-6 δ 67.2 ppm ต่ออยู่กับออกซิเจนในลักษณะที่เป็น epoxide นอกจากนี้ C-3 δ 5.35, 68.2 และ C-5 δ 66.3 ppm ยังต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซีอีกด้วย



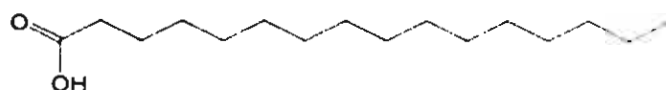
(5)

ตารางที่ 7 ^{13}C , 1H , COSY and HMBC data of carotenoid (5) (400 MHz, δ ppm, $CDCl_3$)

No	δC	δH	HMBC	COSY
1	35.2 C	-	H-16, H-17	-
2	47.1 CH_2	1.48 br, m	H-17, H-16	H-3
3	68.2 CH	5.35 t	-	H-2, H-4
4	41.6 CH_2	2.28 t	H-18	H-3
5	66.3 C	-	H-7, H-18	-
6	67.2 C	-	H-7, H-17, H-16	-
7	40.8 CH_2	3.64, 2.57 dd	H-1	H-7
8	197.9 C	-	H-10, H-7, H-19	-
9	134.5 C	-	H-19	-
10	139.2 CH	7.13 d	H-19	H-11
11	123.3 CH	6.56 d	-	H-10
12	145.1 CH	6.68 d	H-20, H-20', H-10	H-15', H-14'
13	138.1 C	-	H-14, H-12	-
14	132.5 CH	6.74 d	-	H-15
15	132.1 CH	6.24 d	H-20	H-14
16	28.1 CH_3	0.93 s	H-17	-
17	25.0 CH_3	1.01 s	H-16	-
18	21.1 CH_3	1.19 s	-	-
19	11.8 CH_3	1.91 s	H-10	-
20	12.7 CH_3	1.96 s	H-12	-
21	170.6 C	-	H-22	-
22	21.4 CH_3	2.02 s	-	-
1'	35.8 C	-	H-16', H-17'	-
2'	45.5 CH_2	1.46 br, m	H-16', H-17'	-

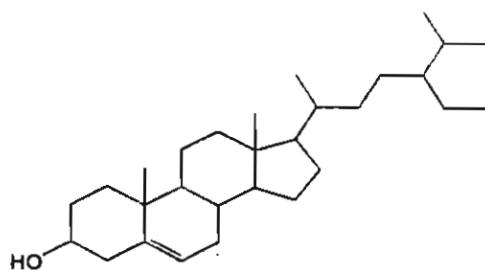
4'	64.2 CH ₂	3.78 s	H-19'	H-16',H-18',H-19'
3'	202.4 C	-	H-8	-
5'	72.6 C	-	H-18',H-8'	-
6'	117.4 C	-	H-8',H-16',H-17',H-18'	-
7'	45.3 CH ₂	1.42 br m	H-18'	-
8'	103.3 CH	6.03 s	H-19'	-
9'	132.6 C	-	H-19'	-
10'	128.5 CH	6.1 d	H-19', H-8'	H-12'
11'	129.4 CH	6.1 d	-	H-12'
12'	125.7 CH	6.62 d	-	H-10',H-11'
13'	135.4 C	-	-	-
14'	137.1 CH	6.24 d	H-14,H-12	H-12'
15'	136.7 CH	6.38 d	H-14,H-12,H-20, H-20'	H-12'
16'	29.2 CH ₃	1.36 s	H-17'	-
17'	32.1 CH ₃	1.04 s	H-16'	-
18'	31.2 CH ₃	1.33 s	H-16'	H-4'
19'	14.0 CH ₃	1.79 s	H-8'	-
20'	12.9 CH ₃	1.96 s	H-15',H-14'	-

Palmitic acid (6) แยกได้เป็นผงสีขาว มวลโมเลกุล 256 ที่ยืนยันด้วยข้อมูล GCMS m/z 256, 213, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 97, 83, 73, 60 และ 43



(6)

Steroid (7) มีมวลโมเลกุล 414 ข้อมูล GCMS m/z 414, 396, 381, 329, 303, 273, 255, 231, 213, 199, 173, 161, 145, 119, 105, 81, 69, 57 และ 43 ซึ่ง Steroid (7) นี้ปกติรู้จักกันดีในชื่อว่า β -Sitosterol ซึ่งพบในพืชส่วนใหญ่ แต่เมื่อปี ค.ศ. 1999 Chen Cheng-sheng⁹ นักวิทยาศาสตร์ชาวจีน และคณะ ได้ตีพิมพ์ผลงานการค้นพบ sterol ตัวใหม่ที่ชื่อว่า Lobophytol A ที่แยกได้จาก soft coral ซึ่งสารนี้มีโครงสร้างเป็น 24-ethylcholest-5,6-en-3 β -ol ทั้งนี้ steroid (7) ที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ไม่ได้วิเคราะห์สูตรโครงสร้างอย่างละเอียด ยังไม่ได้ระบุ stereochemistry ผู้วิจัยจึงยังไม่ต้องการระบุขณะนี้ว่าสารนี้เป็น β -Sitosterol หรือ Lobophytol A



(7)

6. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจงของสารที่แยกได้

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

compound	Cytotoxicity IC ₅₀	HSV-1 IC ₅₀	NCI-H187 IC ₅₀	KB IC ₅₀	BC IC ₅₀	TB MIC	fungal	malarial
Sulfur (1)	39.8	10.6				0.78	46.09	
Indole (2)	-	-				50	-	
Steroid (3)	38.6	5.5				6.25	-	
Diterpene (4)	-	-	-	-	-	200		-
Carotenoid (5)	-	5.0	-	-	-	-		2.9
Palmitic acid (6)	-	-				50	-	
Steroid (7)	-	-				100	-	

หมายเหตุ

1 IC₅₀ และ MIC มีหน่วยเป็น µg/mL. IC₅₀ = 50 % inhibitory concentration

2 การแปลผลการทดสอบ

2.1 ความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ปกติ (cytotoxicity test against vero cells)

- Final concentration ของสารที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 50 µg/mL
- ในการแปลผลจะพิจารณาจากค่า % Cell viability ตามหลักเกณฑ์ ดังนี้
 - ถ้า % Cell viability ≥ 50 % รายงานผลเป็นค่า IC₅₀ > 50 µg/mL
 - ถ้า % Cell viability < 50% รายงานผลเป็นค่า IC₅₀ ที่หาได้จากการทำ 2-fold serial dilution
- ใช้ Ellipticine เป็น positive control; IC₅₀ = 0.5 ± 0.2 µg/mL สำหรับ cytotoxicity test

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

- Final concentration ของสารที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 50 µg/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 2-fold serial dilution เพื่อหาค่า IC ₅₀) |

- ใช้ Acyclovir เป็น positive control; IC₅₀ = 1.9 ± 0.5 µg/mL สำหรับ anti-HSV-1 test

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

<u>ค่า IC₅₀ (µg/mL)</u>	<u>Activity</u>
> 20	inactive
> 10-20	weakly active
5-11	moderately active
< 5	strongly active

- ใช้ Ellipticine; IC₅₀ = 0.211 µg/mL และ Doxorubicin; IC₅₀ = 0.027 µg/mL เป็น positive control สำหรับ anti-NCI-H187

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

<u>ค่า IC₅₀ (µg/mL)</u>	<u>Activity</u>
> 20	inactive
> 10-20	weakly active
5-12	moderately active
< 5	strongly active

- ใช้ Ellipticine; IC₅₀ = 0.36 µg/mL และ Doxorubicin; IC₅₀ = 0.20 µg/mL เป็น positive control สำหรับ anti-KB

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

<u>ค่า IC₅₀ (µg/mL)</u>	<u>Activity</u>
> 20	inactive
> 10-20	weakly active
5-13	moderately active
< 5	strongly active

- ใช้ Ellipticine; IC₅₀ = 0.19 µg/mL และ Doxorubicin; IC₅₀ = 0.12 µg/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

<u>ค่า IC₅₀ (µg/mL)</u>	<u>Activity</u>
> 50	inactive
> 20-50	weakly active
5-20	moderately active
< 5	strongly active

ใช้ Amphotericin B; IC₅₀ = 0.37-0.043 µg/mL เป็น positive control สำหรับ anti-fungal

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

Microculture radioisotope technique

- Final concentration ของสารที่ใช้ทดสอบ = 10 µg/mL
- Anti-malarial activity พิจารณาจากค่า % inhibition ต่อเชื้อมาลาเรีย ตามหลักเกณฑ์ดังนี้

<u>% inhibition</u>	<u>Anti-malarial activity</u>
< 50	inactive
> 50	active (ทำ serial dilution เพื่อหาค่า IC ₅₀)

- ใช้ Dihydroartemisinin; IC₅₀ = 4.0-4.3 nM เป็น positive control สำหรับ anti-malarial activity
- 2.8 ทดสอบยับยั้งเชื้อวัณโรค (Anti-tuberculous activity against *Mycobacterium tuberculosis* (in vitro), H37Ra): Microplate Alamar blue assay (MABA)
 - ทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 µg/mL
 - รายงานผลเป็น active แสดงค่า MIC จากการทำ two-fold dilution test
 - รายงานผลเป็น inactive สารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้น > 200 µg/mL
 - ใช้ Rifampicin (RMP); MIC = 0.0047 µg/mL, Kanamycin (KM); MIC = 2.5 µg/mL และ Isoniazide (INH); MIC = 0.05 µg/mL เป็น positive control สำหรับ anti-tuberculous activity

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัด 9 ชนิด พอสรุปได้ดังนี้คือ

ในสภาวะที่ทำการทดลอง พบว่า สารสกัดของสาหร่ายสีแดง *Acanthophora spicifera*, *Hypnea* sp. และสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเมล็ดผักกาดขาวค่อนข้างดี ในขณะที่สาหร่ายสีแดง *Laurencia* sp., *Solieria* sp. สาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum oligocystum*, *Enhalus acoroides*, *Halodule pinifolia* ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเมล็ดผักกาดขาวปานกลางถึงอ่อน แต่สาหร่ายสีแดง *Gracillaria* sp. ไม่มีผล ส่วนผลการทดสอบอัตราการตายของไรน้ำพบว่าสาหร่ายสีแดง *Laurencia* sp. สาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. และ *Sargassum oligocystum* ให้ผลค่อนข้างดี แต่ *Acanthophora spicifera* และ *Gracillaria* sp. ให้ผลปานกลาง ส่วน *Hypnea* sp. และหญ้าทะเลให้ผลค่อนข้างน้อย

อย่างไรก็ตามแม้ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัด จะไม่ได้เป็นเครื่องชี้วัดที่แน่นอนมากเท่ากับการทดสอบฤทธิ์อย่างเฉพาะเจาะจง แต่ก็ป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ทดสอบเบื้องต้นได้เองในห้องปฏิบัติการ และเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการทดสอบฤทธิ์อย่างเฉพาะเจาะจงมาก

2. ผลของการออกฤทธิ์อย่างเฉพาะเจาะจงของสารสกัดและสารที่แยกได้พอสรุปได้ดังนี้

2.1 ทั้ง sulfur (1) และ indole-3-carboxaldehyde (2) ที่แยกได้จากหญ้าทะเล *Halophila ovalis*, *Enhalus acoroides* และ *Halodule pinifolia* แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคที่ระดับ MIC 0.78 และ 50 µg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ sulfur ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับ IC₅₀ 39.8 µg/mL และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มที่ระดับ IC₅₀ 10.6 µg/mL อีกทั้งแสดงฤทธิ์อย่างอ่อนในการยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* IC₅₀ 46.09 µg/mL ด้วย นอกจากนี้ steroid (3) ที่แยกได้จากหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริ่ม และเชื้อวัณโรค ที่ระดับ IC₅₀ 38.6, 5.5 และ 6.25 µg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลนี้กับสารสกัดจากหญ้าทะเลทั้งสามชนิด พบว่าเฉพาะ *Halophila ovalis* แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับ IC₅₀ 26.6 µg/mL ส่วนฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค กับฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคเริ่ม สำหรับสารสกัด *Halophila ovalis*, *Halodule pinifolia* และ *Enhalus acoroides* มีค่า IC₅₀ 25, 50 และ 50 กับ 2.2, 6.1 และ 3.5 µg/mL ตามลำดับ แต่ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์ให้ผลเฉพาะ *Halophila ovalis* และ *Enhalus acoroides* มีค่า

IC₅₀ 12.55 และ 40.46 µg/mL ตามลำดับ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้อาจสนับสนุนว่าหญ้าทะเลเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่ น่าสนใจที่จะศึกษาในส่วนอื่น ๆ ที่ยังไม่ได้แยกต่อไปได้อีกมาก

2.2 สำหรับ diterpene (4) ที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. เป็นสารใหม่ que แสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริม ที่ระดับ IC₅₀ 5.0 µg/mL แต่แสดงฤทธิ์อย่างอ่อนในการยับยั้งเชื้อวัณโรคที่ระดับ MIC 200 µg/mL ส่วน carotenoid (5) ที่แยกได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota* sp. เช่นกัน แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรียที่ระดับ IC₅₀ 2.9 µg/mL ในขณะที่ diterpene (4) ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย อย่างไรก็ตามสารทั้งสองนี้กลับไม่แสดง ฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม มะเร็งในช่องปาก และมะเร็งปอด ทั้ง ๆ ที่สารสกัดของสาหร่าย *Dictyota* sp. ให้ผล ยับยั้งดีมากต่อมะเร็งเต้านม มะเร็งในช่องปาก และมะเร็งปอด ที่ระดับ IC₅₀ 2.27, 2.17 และ 1.90 µg/mL ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นสารสกัดดังกล่าวยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสก่อโรคเริม ฤทธิ์ ยับยั้งเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย ที่ระดับ IC₅₀ 13.1, 0.7, 6.25 และ 2.9 µg/mL ตามลำดับ แสดงว่าสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง อาจอยู่ในส่วนอื่นที่ยังมิได้แยก หากเป็นไปได้ควรศึกษาต่อไปอีก

2.3 palmitic acid (6) และ steroid (7) ที่แยกได้จากสาหร่ายสีเขียว *Caulerpa letillifera* แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ วัณโรคที่ระดับ MIC 50 และ 100 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับสารสกัดของสาหร่ายนี้ที่ให้ผล ยับยั้งเชื้อวัณโรคที่ MIC 100 µg/mL แต่อย่างไรก็ตามสารทั้งสองที่แยกได้กลับไม่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสก่อ โรคเริม ทั้ง ๆ ที่สารสกัดของสาหร่ายดังกล่าวแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเริมที่ค่า IC₅₀ 15.1 µg/mL ดังนั้นหากศึกษา ต่ออาจได้สารที่น่าสนใจเพิ่มขึ้น

ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ (ถ้ามี)

1. ตัวอย่างที่เก็บได้บางชนิดมีน้อยเกินไป ไม่พอที่จะทำให้ได้สารที่น่าสนใจเพียงพอตามฤดูกาลที่ไปเก็บ หาก เป็นไปได้ควรมีการทำซ้ำในตัวอย่างที่น่าสนใจ เพื่อให้ได้สารที่ออกฤทธิ์เพิ่มขึ้น
2. หากเป็นไปได้ หรือมีงบประมาณเพียงพอ ควรติดตามการทดสอบการออกฤทธิ์ตั้งแต่สารสกัด และแต่ละ fractions ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ เรื่อยไปจนถึงได้สารบริสุทธิ์ จะได้มั่นใจว่าไม่มีการหลงทาง และสูญเสีย activity ในขั้นสุดท้ายที่แยกสารได้
3. ถึงแม้บางตัวอย่างที่ผลของสารสกัดออกฤทธิ์ไม่ดี แต่ก็เป็นไปได้ที่เมื่อแยกได้สารบริสุทธิ์แล้ว activity อาจ เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารบริสุทธิ์ขึ้น หรือในทางตรงกันข้าม activity อาจลดลงมากเนื่องจากสารหลายตัวร่วมกัน ออกฤทธิ์ จึงไม่ควรมองข้ามเสียทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

1. Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18,88-94.
2. Hipino, S., Choshi, T. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 66-87.
3. Rovirosa, J., Sanchez, I., Palacios, Y., Darias, J., San-Martin, A. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **1990**, 35, 131-135.
4. Watanabe, K., Miyakado, M., Ohno, N., Okada, A., Yanagi, K., Moriguchi, K. *Phytochemistry* **1989**, 28, 77-78.
5. Watanabe, K., Umeda, K., Kurita, Y., Takayama, C., Miyakado, M. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1990**, 37, 275-286.
6. Elakovich, S.D. and Wooten, J.W. *J. Chem. Ecol.* **1991**, 17, 707-733.
7. Blackman, A.J. "Practical manual KRA 305" University of Tasmania, **2000**.
8. Guella, G. and Pietra, F. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1539.
9. Cheng-sheng, C., Shi-liang, F., Min-sha, J., Long-mei, Z. *Zhongshan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* (abstract) **1999**, 38, 118-120.

ภาคผนวก

1. วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเฉพาะเจาะจง ที่ BIOTEC

1.1 Determination of anticancer assay (KB, BC)

KB (Human epidermoid carcinoma of cavity, ATCC CCL-17) and BC (Breast cancer cell line) were determined by colorimetric cytotoxicity assay that measured cell growth from cellular protein content according to Skehan et.al. (1990). Elliptine and doxorubicin were used as positive control. DMSO was used as negative control. Briefly, cells at a logarithmic growth phase were harvested and diluted to 10^5 cells/mL with fresh medium and gently mixed. Testing compounds were diluted in distil water and put into microtiter plates in total volume 200 μ L. Plates were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 72 hours. After incubation period, cells were fixed by 50% trichloroacetic acid. The plates were incubated 4 °C for 30 min, wash plates with tap water and air-dried at room temperature. The plates were stained with 0.05% sulforhodamine B dissolved in 1% acetic acid for 30 min. After staining period, SRB was removed with 1% acetic acid. Plates were air-dried before bound dye was solubilized with 10 mM Tris base for 5 min on shaker. OD was read in microtiter plate reader at wavelength 510 nm.

Skehan, P., Ritsa, S. and Dominic, S. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening" *J. Natl. Can. Inst.* 1990, 82, 1107-1112.

1.2 Determination of anticancer assay (NCI-H187)

NCI-H187 (Small cell lung carcinoma, Human) were determined by MTT assay that measured previously described in detail by Jane A. Plumb et.al. (1989). Briefly, cells were diluted to 10^5 cells/mL. Testing compounds were diluted in distil water and put into microtiter plates in total volume 200 μ L. Plates were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 5 days, 50 μ L of 2 mg/mL MTT solution (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) was added to the plate. Plates were wrapped with aluminium foil and incubated for 4 hours. After incubation period, the micro plates were spinned down at 200 x g for 5 min. MTT was then removed from the wells and the formazan crystals were dissolved in 200 μ L of 100% DMSO and 25 μ L of Sorensen glycine buffer. OD was read in microtiter plate reader at wavelength 510 nm.

Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B. "Effect of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-forman absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay" *Can. Res.* 1989, 49, 4435-4440.

1.3 Determination of anti-herpes simplex activity

Anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activity of plant or microbial extracts and synthetic compounds was tested against HSV-1 strain ATCC VR 260, using colorimetric microtiter plates assay that determined host cell growth by measuring cellular protein content, as described by Skehan et.al. (1990). The growth of host cells, vero cell line ATCC CCL-81, infected with virus and treated with extract was compared with control cells, infected with virus only. Acyclovir and DMSO were used as positive and negative control, respectively. The extracts were tested at non-cytotoxic concentrations (inhibit cell growth < 50%). Extracts that inhibit virus more than 50% were tested further to determine the concentrations that inhibit viral activity by 50% (IC_{50}).

Skehan P., Ritsa, S. and Dominic, S. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening" *J. Natl. Can. Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

1.4 Anti-tuberculosis test: Alamar blue susceptibility test (MABA)

Antimicrobial susceptibility testing was performed in 96-well microplates. Outer perimeter wells were filled with sterile water to prevent dehydration in experimental wells. Initial screened-sample dilutions were prepared in either dimethyl sulfoxide or distilled deionized water. The dissolved-screened samples were then diluted by Middlebrook 7H9 media containing 0.2% v/v glycerol and 1.0 g/L casitone (7H9GC), and subsequent two-fold dilutions were performed in 0.1 mL of 7H9GC in the microplates. Frozen inocula (*M. tuberculosis* H37Ra was grown in 100 mL of 7H9GC containing 0.005% Tween 80. Culture was incubated in 500 mL plastic flask on a rotary shaker at 200 rpm and 37 °C until they reached an optical density of 0.4-0.5 at 550 nm. Bacteria were washed and suspended in 20 mL of phosphate-buffered saline and passed through an 8 m pore size filter to eliminate clumps. The filtrates were aliquoted, stored at -80 °C) were diluted 1:100 in 7H9GC. Addition of 0.1 mL to the well resulted in final bacterial titers of about 5×10^4 CFU/mL. Wells containing sample only were used to determine whether the tested samples themselves can reduce the dye or not. Additional control wells consisted of bacteria only (B) and medium only (M). Plates were incubated at 37 °C. Starting at day 6 of incubation, 20 µL of Alamar blue solution and 12.5 µL of 20% Tween 80 were added to one B well and one M well, and plates were reincubated at 37 °C. Wells were observed at 24 hours for a color change from blue to pink. If the B wells became pink by 24 hours, reagent was added to the entire plate. If the well remained blue, additional M and B wells were tested daily until a color change occurred, at which time reagents were added to all remaining wells. Plates were then incubated at 37 °C, and results were recorded at 24 hours post-reagent addition. Visual MICs were defined as the lowest concentration of sample that prevented a color change.

Collins, L. A., Franzblau, S. G. "Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, *41*, 1004-1009.

1.5 Anti-fungal test

Candida albicans ATCC was grown on potato dextrose agar (PDA) plate at 30 °C for overnight and 3 days, respectively. Cell suspension of *C. albicans* in RPMI 1640 medium to yield 2x10⁶ CFU/mL.

Cell suspension of *C. albicans* 100 µL was added into each well. The assay microtiter plates were incubated at 37 °C further for 4 hours after that added XTT/PMS solution into each well and incubated at 37 °C further for 4 hours. Orange color developed in each well indicated the growth of test organism. The well that showed no change in color indicated antimicrobial activity of the crude extract. Amphotericin B and DMSO were positive, negative control, respectively.

1.6 Determination of antiparasmodial activity (Anti-malarial activity)

Plasmodium falciparum (K1, multi drug resistant strain) was cultivated *in vitro* according to Trager & Jensen (1976) in RPMI 1640 medium containing 20 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 32 mM NaHCO₃ and 10% heat activated human serum with 3% erythrocytes and incubated at 37 °C in an incubator with 3% CO₂. Cultures were diluted with fresh medium and erythrocytes every day according to cell growth. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* was determined by microculture radioisotope techniques based upon the methods described by Desjardins et al. (1979). Briefly, a mixture of 200 µL of 1.5% erythrocytes with 1% parasitemia at the early ring stage was pre-exposed to 25 µL of the medium containing a test sample dissolved in 1% DMSO (0.1% final concentration) for 24 hr employing the incubation conditions described above. Subsequently, 25 µL of [³H] hypoxanthine (Amersham, USA) in culture medium (0.5 µCi) was added to each well and plates were incubated for an additional 24 hr. Levels of incorporated radioactively labeled hypoxanthine indicating parasite growth were determined using the TopCount microplate scintillation counter (Packard, USA). Inhibition concentration (IC₅₀) represents the concentration which indicates 50% reduction in parasite growth. The standard sample was Dihydroartemisinin (DHA).

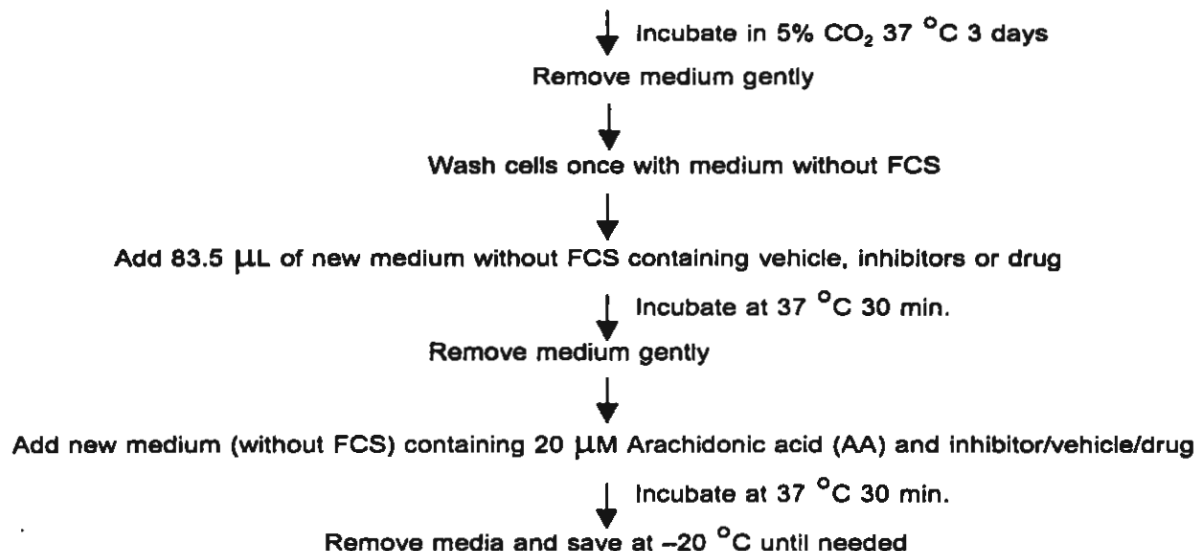
Trager, W., Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, 193 (4254), 673-675.

Desjardins, R. E., Canfield C. J., Haynes, J. D., Chulay, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979, 16, 710-718.

1.7 Anti-inflammation assay

Part 1: adding inhibitors to test PGE₂ production (mouse lung fibroblast wide type, cox-1 ko PGH-2 activity and cox-2 ko PGH-1 activity)

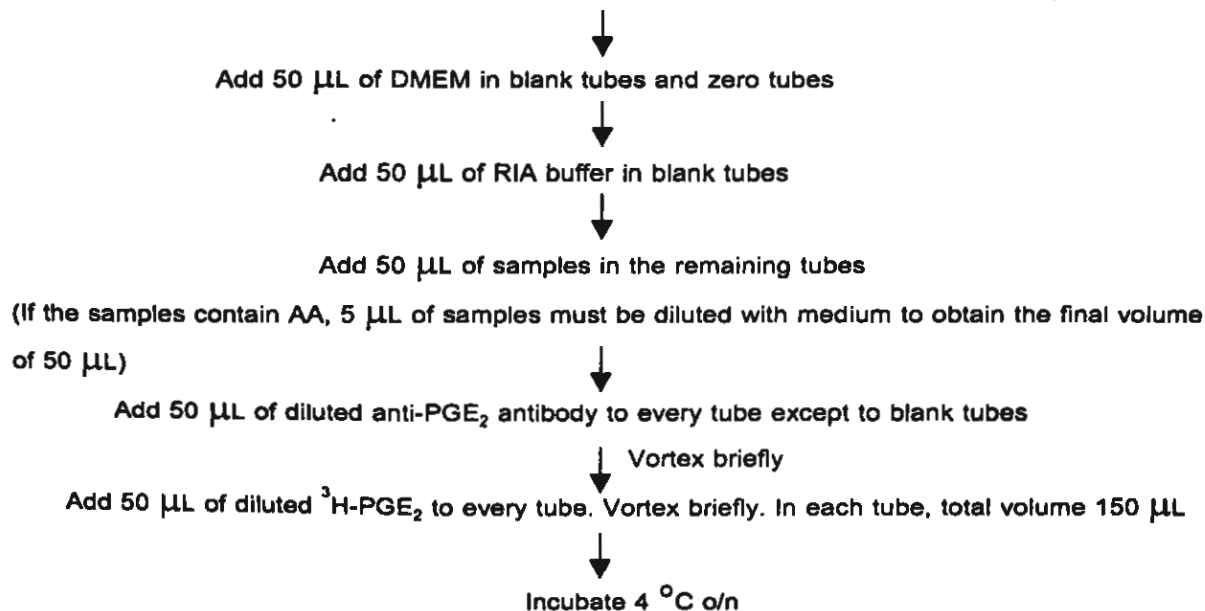
Seed cell 100,000 cells/mL at 83.5 µL well in 96 well plates. Medium with contains 10% FCS. (This is zero day)



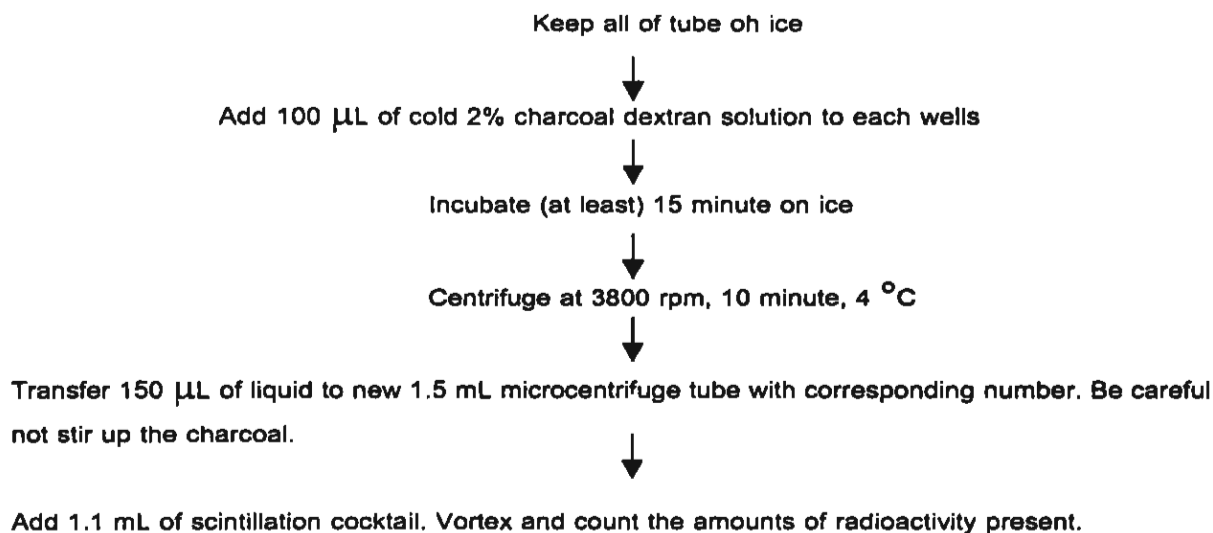
Part 2: Radioimmuno assay (RIA) of PGE₂ (tube:tube)

Day 1

Number tubes for number of samples plus 2 for blank and 2 for zero. Perform the assay on ice.



Day 2



2. การเผยแพร่ผลงานวิจัย

2.1 นิสิตปริญญาโท คือนางสาวเนาวรัตน์ กองคำ กำลังจะนำเสนอผลงานส่วนหนึ่งเกี่ยวกับหญ้าทะเล ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วทท.) ครั้งที่ 31 ระหว่างวันที่ 18-20 ตุลาคม 2548 ณ เทคโนโลยีธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา ในหัวข้อเรื่อง Secondary metabolites of the sea grasses *Halodule pinifolia*, *Enhalus acoroides* and *Halophila ovalis* from Kung Krabaen Bay

2.2 กำลังอยู่ในขั้นตอนการเขียนบทความวิจัย เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารต่อไป