



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทะเล

Ciocalapata sp. และ *Halichondria* sp.

โดย ผศ. ดร. ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล และคณะ

มิถุนายน 2552

สัญญาเลขที่ MRG5080190

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทะเล

Ciocalapata sp. และ *Halichondria* sp.

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. ดร. ฉัตรชัย วัฒนภิรมย์สกุล
2. อาจารย์ ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาสำหรับงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ ดร. สมชัย บุญราวิช สถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งและป่าชายเลน จ. ภูเก็ต สำหรับการอนุเคราะห์ตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของตัวอย่างฟองน้ำ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iv
Abstract	v
Executive Summary	1
วัตถุประสงค์	3
วิธีทดลอง	3
ผลการทดลอง	4
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	13
เอกสารอ้างอิง	14
ภาคผนวก	15
Output จากโครงการวิจัย	15

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5080190

ชื่อโครงการ: สารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทะเล *Ciocalapata* sp. และ *Halichondria* sp.

ชื่อนักวิจัย: ผศ. ดร. จัตรชัย วัฒนากิริมย์สกุล
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อาจารย์ ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail address: chatchai.w@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ: จากการศึกษาสารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทะเลในสกุล *Ciocalapata* สามารถแยกสารใหม่ในกลุ่ม isonitrile diterpenes ได้ 1 ชนิด ได้แก่ 8-isocyanoamphilecta-11(20),15-diene และสามารถแยกสารในกลุ่มเดียวกันที่เคยมีรายงานว่าแยกได้จากฟองน้ำชนิดอื่นอีก 3 ชนิด ได้แก่ 8-diisocyano-11(20)-amphilectene, 7-isocyanoamphilecta-11(20),15-diene และ 8-isocyanoamphilecta-11(20),14-diene นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารในกลุ่ม steroidal peroxides ได้อีก 2 ชนิด ได้แก่ ergosterol peroxide และ 5 α ,9 α -epidioxy-8 α ,14 α -epoxy-(22*E*)-ergosta-6,22-dien-3- β -ol ซึ่งสารในกลุ่ม isonitrile diterpenes มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ K1 ด้วยค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 0.09-1.07 μ M ในขณะที่ ค่า IC₅₀ ของสารกลุ่ม steroidal peroxide อยู่ในช่วง 6.28-7.13 μ M สำหรับการแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทะเลสกุล *Halichondria* นั้นพบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำชนิดนี้มีคุณสมบัติในการเกาะติดกับ stationary phase จึงไม่สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำชนิดนี้ได้

คำหลัก: ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Ciocalapata* *Halichondria* Isonitrile diterpene Steroidal peroxide

Abstract

Project Code: MRG5080190

Project Title: Antimalarial agents from marine sponges, *Ciocalapata* sp. and *Halichondria* sp.

Investigator: Assistant Professor Dr. Chatchai Wattanapiromsakul
Faculty of Pharmaceutical Science, Prince of Songkla University
Dr. Khanit Suwanborirux
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University

Email address: chatchai.w@psu.ac.th

Project Period: 2 Years

Abstract: A study of antimalarial agent from *Ciocalapata* sp. led to isolate new isonitrile diterpene of the amphilectane family, 8-isocyanoamphilecta-11(20),15-diene, along with three known isonitriles; 8,15-diisocyano-11(20)-amphilectene; 7-isocyanoamphilecta-11(20),15-diene; and 8-isocyanoamphilecta-11(20),14-diene. and two steroidal peroxides; ergosterol peroxide and 5 α ,9 α -epidioxy-8 α ,14 α -epoxy-(22*E*)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol. The four isonitriles were strongly active against *Plasmodium falciparum* K1 with the IC₅₀s in a range of 0.09-1.07 μ M. The steroidal peroxides were less active in the antimalarial bioassay (IC₅₀s 6.28 and 7.13 μ M, respectively). A study of antimalarial agent from *Halichondria* found that antimalarial agent was sticky with stationary phase. The isolation can not be done.

Keywords : Antimalarial, *Ciocalapata*, *Halichondria*, Isonitrile diterpene, Steroidal peroxide

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

ชื่อโครงการ : (ภาษาไทย) สารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทะเล *Ciocalapata* sp. และ *Halichondria* sp.

(ภาษาอังกฤษ) Antimalarial agents from marine sponges, *Ciocalapata* sp. and *Halichondria* sp.

ชื่อหัวหน้าโครงการ : นายฉัตรชัย วัฒนากิริมย์สกุล
หน่วยงาน: ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์
ระยะเวลาดำเนินงาน: 2 ปี (2 กรกฎาคม 2550- 1 กรกฎาคม 2552)

บทนำ

โรคมาลาเรีย เป็นโรคติดต่อที่ยังคงเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของโลก โดยเฉพาะทวีปแอฟริกา ทวีปเอเชีย โอเชียเนีย อเมริกากลางและอเมริกาใต้ การป้องกันสามารถกระทำได้โดยการขับไล่ยุง หรือหลีกเลี่ยงการถูกยุงกัด ส่วนการใช้วัคซีนในการป้องกันยังมีการพัฒนาไปไม่มากนัก สำหรับยาที่ใช้รักษาได้แก่ยาที่ได้จากธรรมชาติ หรือดัดแปลงจากธรรมชาติ เช่น quinine, chloroquine, artemisinin เป็นต้น จัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามแนวโน้มการดื้อยาของเชื้อ *Plasmodium* spp. ต่อยากลุ่มต่างๆ ดังกล่าวมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้น (Laurent and Pietra, 2006) สำหรับในประเทศไทยโรคมาลาเรียยังเป็นโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศ โดยเฉพาะในบริเวณชายแดนจังหวัดต่างๆ ที่ติดกับประเทศพม่าและกัมพูชา (สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่, 2006) แม้สถิติในการเกิดโรคนี้จะลดลงอย่างต่อเนื่องแต่ปัญหาการดื้อยาของเชื้อที่ก่อโรคกลับเป็นปัญหาสำคัญ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีทรัพยากรทางทะเลอยู่มาก โดยเฉพาะภาคตะวันออกและภาคใต้ ประกอบกับการศึกษาศักยภาพของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลพบว่าสัตว์จำพวกฟองน้ำเพรียงหัวหอม และเชื้อราสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Plasmodium* ได้ดีซึ่งสารเหล่านี้ได้แก่สารในกลุ่ม alkaloids, amino acid derivatives, endoperoxide polyketides, endoperoxide terpenoids และ isonitrile and isothiocyanate terpenoids (Laurent and Pietra, 2006) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถที่จะนำไปศึกษาต่อถึงกลไกของการออกฤทธิ์และประสิทธิภาพในการรักษาโรคมาลาเรีย จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นยารักษาโรคมาลาเรียได้

จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าสารสกัดจากฟองน้ำ *Ciocalapata* sp. ที่เก็บได้จากเกาะเต่า จังหวัดสุราษฎร์ธานี และสารสกัดจากฟองน้ำ *Halichondria* sp. ที่เก็บได้จากเกาะกระ จังหวัดนครศรีธรรมราช มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียในสายพันธุ์ที่มีการดื้อยา (*Plasmodium falciparum*, K1 strain) โดยมีค่า IC_{50} 0.8 $\mu\text{g/mL}$ และ IC_{50} 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียของฟองน้ำทั้ง 2 ชนิด ซึ่งคาดว่าจะได้ทราบข้อมูลของสารที่ออกฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทั้ง 2 ชนิดเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการค้นหาและพัฒนาการรักษาโรคมมาลาเรียต่อไปในอนาคต

วิธีทดลอง

- 1) การเก็บ การพิสูจน์เอกลักษณ์ และการเตรียมตัวอย่างฟองน้ำ
- 2) การสกัดฟองน้ำโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ
- 3) การทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียตามวิธีการของ Desjardins et al., 1979
- 4) การแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค chromatography
- 5) การหาโครงสร้างทางเคมีของสาร โดยใช้ข้อมูล spectroscopy และ optical rotation
- 6) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาสารเคมีที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทะเลในสกุล *Ciocalapata* สามารถแยกสารในกลุ่ม isonitrile diterpenes ได้ 4 ชนิด ได้แก่ 8-isocyanoamphilecta-11(20),15-diene, 8-diisocyano-11(20)-amphilectene, 7-isocyanoamphilecta-11(20),15-diene และ 8-isocyanoamphilecta-11(20),14-diene ซึ่งจากสารทั้งหมด 4 ชนิด พบว่า 8-isocyanoamphilecta-11(20),15-diene เป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนี้ยังสามารถแยกสารในกลุ่ม steroidal peroxides ได้อีก 2 ชนิด ได้แก่ ergosterol peroxide และ 5 α ,9 α -epidioxy-8 α ,14 α -epoxy-(22E)-ergosta-6,22-dien-3- β -ol ซึ่งสารในกลุ่ม isonitrile diterpenes มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ K1 ด้วยค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.09-1.07 μM ในขณะที่ ค่า IC_{50} ของสารกลุ่ม steroidal peroxide อยู่ในช่วง 6.28-7.13 μM ซึ่งฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารในกลุ่ม isonitrile diterpenes ดีกว่าสารในกลุ่ม steroidal peroxides ประมาณ 5.9- 82 เท่า สำหรับการแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำทะเลสกุล *Halichondria* นั้นพบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำชนิดนี้มีคุณสมบัติในการเกาะติดกับ stationary phase จึงไม่สามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำชนิดนี้ได้

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อแยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำ *Ciocalapata* sp. และ *Halichondria* sp.
- 2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากฟองน้ำดังกล่าว
- 3) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

วิธีทดลอง

- 1) การเก็บ การพิสูจน์เอกลักษณ์ และการเตรียมตัวอย่างฟองน้ำ

ตัวอย่างฟองน้ำจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C บางส่วนของตัวอย่างจะถูกส่งไปยังสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน จ. ภูเก็ต เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน ส่วนในการเตรียมตัวอย่างฟองน้ำเพื่อสกัดสารสำคัญนั้น ฟองน้ำที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จะถูกนำไป Freeze dry เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่แห้งและนำไปใช้ต่อไป

- 2) การสกัดฟองน้ำ

นำตัวอย่างฟองน้ำในสกุล *Ciocalapata* ที่แห้งมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายได้แก่ hexane, dichloromethane และ methanol ตามลำดับ ในการสกัดนั้นจะแช่ฟองน้ำไว้ในตัวทำละลายประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วกรองออก จากนั้นนำส่วนที่กรองไว้ไประเหยแห้ง ส่วนที่เหลือนำมาสกัดต่อ อีก 2-3 ครั้งตามความเหมาะสม หลังจากนั้นจะเปลี่ยนตัวทำละลายโดยการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น จะได้สารสกัดในชั้น hexane, dichloromethane และ methanol ตามลำดับ เก็บสารสกัดไว้ที่ -4°C จนกว่าจะนำมาใช้ ซึ่งสารสกัดทั้ง 3 ส่วนจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย สำหรับการสกัดสารจากฟองน้ำในสกุล *Halichondria* นำตัวอย่างฟองน้ำในสกุล *Halichondria* ที่แห้งมาสกัดด้วย methanol เติมน้ำผสม หลังจากนั้นนำไป partition จนได้ชั้น hexane, dichloromethane, butanol และชั้นที่เหลือคือชั้นน้ำ และนำสารสกัดทั้ง 4 ส่วน ไปทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

- 3) การทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

ฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารตัวอย่างถูกทดสอบโดย ห้องปฏิบัติการทางชีวภาพ ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) กรุงเทพฯ โดยวิธี microculture radioisotope technique ตามวิธีการของ Desjardins et al., 1979 เชื้อที่ใช้ทดสอบคือ *Plasmodium falciparum*, K1 strain ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงใน culture medium RPMI 1640 ตามวิธีการของ Trager and Jensen, 1976 ตัวอย่างจะถูกละลายโดย DMSO สารมาตรฐานที่ใช้คือ dihydroartemisinin ซึ่งการทดลองจะวัดปริมาณ ^3H -hypoxanthine การรายงานผลอยู่ในรูป IC_{50} ในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (Jongrungruangchok et al., 2004)

- 4) การแยกสารให้บริสุทธิ์

การเลือกสารสกัดที่จะนำมาแยก จะใช้ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียเป็นตัวกำหนด เลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียดี มาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทาง chromatography ชนิด

ต่างๆ เช่น thin layer chromatography และ column chromatography เป็นต้น

5) การหาโครงสร้างทางเคมีของสาร

การหาสูตรโครงสร้างทางเคมี จะใช้เทคนิคทาง spectroscopy ชนิดต่างๆ ได้แก่ UV-Visible spectroscopy, IR spectroscopy, NMR spectroscopy, Mass spectrometry, รวมทั้ง X-ray crystallography และคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพอื่นๆ

6) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ด้านมาลาเรีย

ศึกษาข้อมูลจากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้และเปรียบเทียบกับสารที่มีฤทธิ์ด้านมาลาเรียในกลุ่มที่มี โครงสร้างทางเคมีที่ใกล้เคียงกัน

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

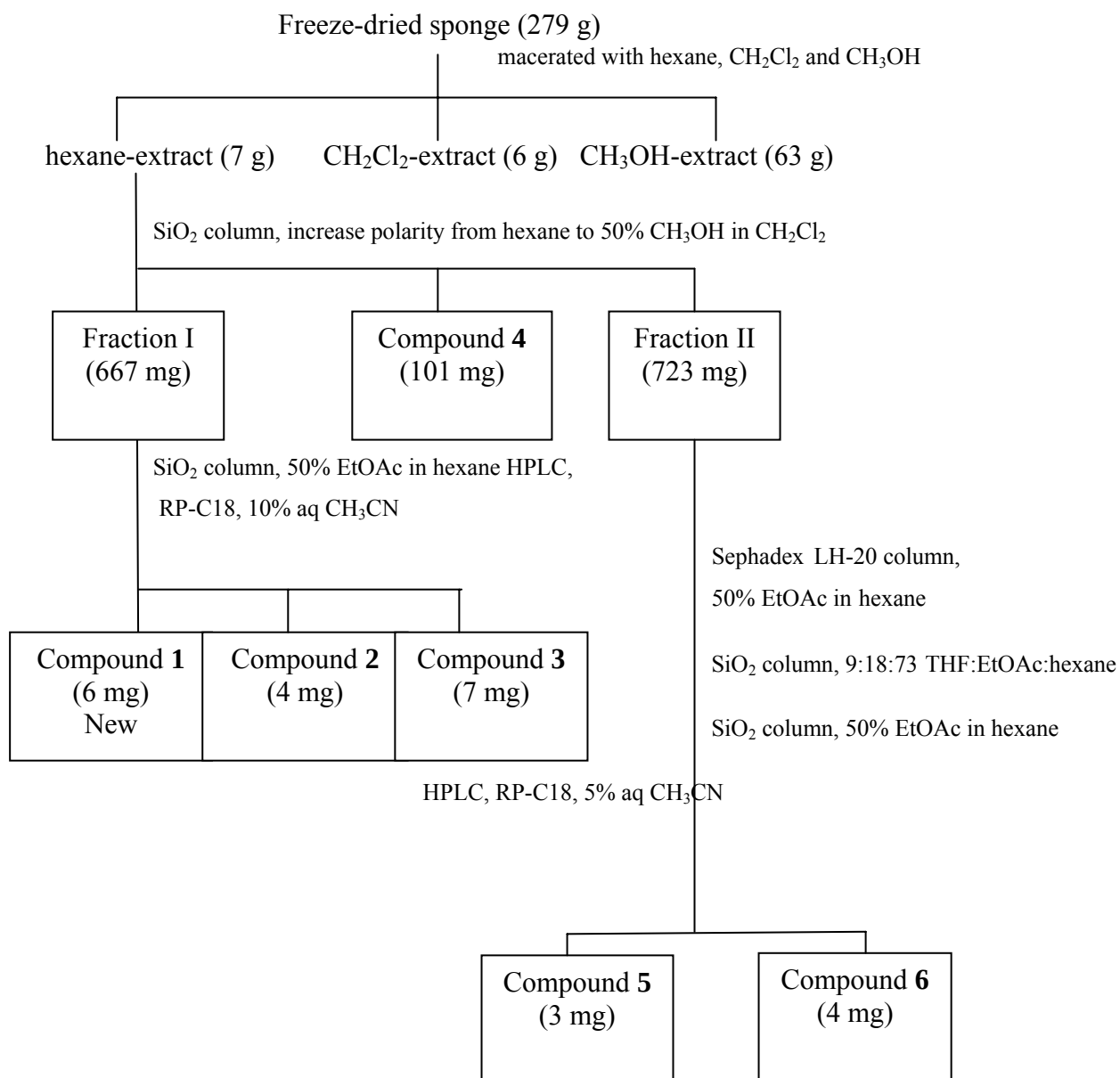
Spectrometer ที่ใช้ในการวิจัยนี้ประกอบด้วย Jasco-J-180 spectropolarimeter (ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สำหรับการหาค่า optical rotation; Spectronic Genesys 5 spectrophotometer (ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV และ visible; Jasco IR-810 infrared spectrometer (ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการวัดการดูดกลืนแสง Infrared; Micromass LCT mass spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการตรวจวัด mass spectrometry; FTNMR Varian Unity Inova 500 spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการตรวจวัด NMR spectrum; และ HPLC ของ Water® 600E multisolvent delivery system ประกอบด้วย Water® 484 UV detector

ผลการทดลอง

การสกัดและแยกสารจากฟองน้ำทะเล *Ciocalapata*

นำฟองน้ำ *Ciocalapata* 2.9 kg มาทำให้แห้งโดยวิธี freeze drying ได้ฟองน้ำแห้ง 279 g หลังจากนั้นนำไปสกัดด้วย hexane, dichloromethane และ methanol ตามลำดับ โดยน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนมีดังนี้ ส่วน hexane น้หนัก 6.79 g ส่วน dichloromethane น้หนัก 6.18 g และ ส่วน methanol น้หนัก 63.75 g นำสารสกัดทั้ง 3 ส่วนไปทดสอบฤทธิ์ด้านมาลาเรีย พบว่า ส่วน hexane มีค่า IC_{50} 0.05 ± 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน dichloromethane มีค่า IC_{50} 20.3 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$ และ ส่วน methanol พบว่า inactive

นำส่วน hexane ซึ่งมีฤทธิ์ด้านมาลาเรียที่ดีที่สุดมาแยกต่อด้วยเทคนิค vacuum liquid chromatography (VLC) และ Chromatography ชนิดต่างๆ สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 6 ชนิดดังแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1. การแยกสารเคมีจากฟองน้ำ *Ciocalapata* sp.

ข้อมูลทางเคมี-กายภาพของสารที่แยกได้

8-Isocyanoamphilecta-11(20),15-diene (1): white amorphous solid; $[\alpha]_D$ -51 (*c* 0.33; CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 244 (2.38) nm; IR (thin film) $\nu_{\max}$ 2950, 2150, 895 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) ข้อมูลในตารางที่ 1; ESIMS *m/z* (% relative intensity) 320 ([M+Na]⁺, 100). HRESIMS *m/z* 320.2338 (calcd for C₂₁H₃₁NNa, 320.2348).

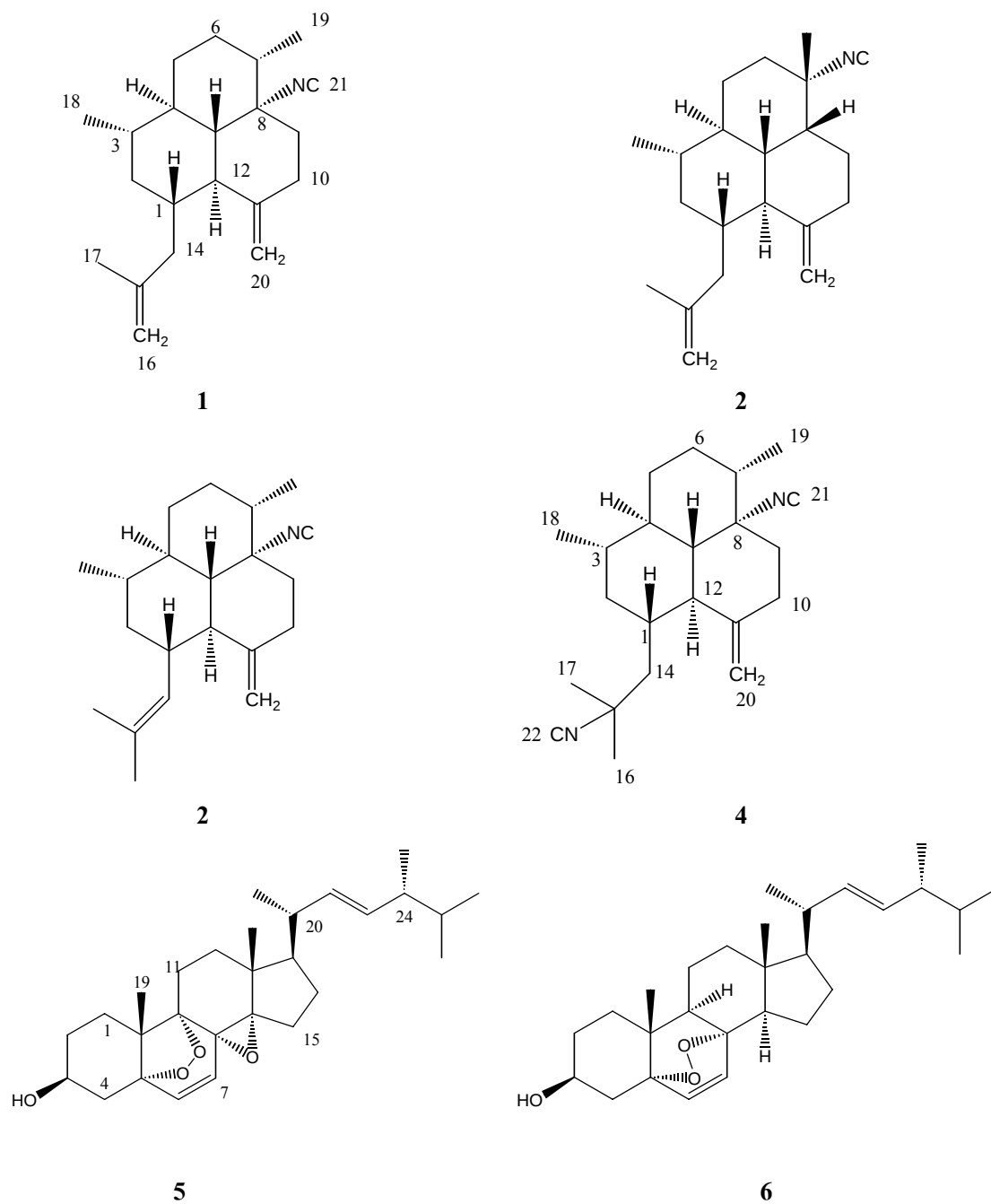
7-Isocyanoamphilecta-11(20),15-diene (2): white amorphous solid; $[\alpha]_D$ +63 (*c* 0.25; CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 244 (2.70) nm; IR (thin film) $\nu_{\max}$ 2950, 2125, 880 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) ข้อมูลในตารางที่ 2; ESIMS *m/z* (% relative intensity) 320 ([M+Na]⁺, 100), 271 (9).

8-Isocyanoamphilecta-11(20),14-diene (3): white amorphous solid; $[\alpha]_D$ -27 (*c* 0.38; CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 244 (2.57) nm; IR (thin film) $\nu_{\max}$ 2925, 2125 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) ข้อมูลในตารางที่ 3; ESIMS *m/z* (% relative intensity) 320 ([M+Na]⁺, 100), 271 (18).

8,15-Diisocyano-11(20)-amphilectene (4): white needles (hexane); $[\alpha]_D$ -56 (*c* 0.28; CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 244 (2.41) nm; IR (thin film) $\nu_{\max}$ 2925, 2150 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) ข้อมูลในตารางที่ 4; ESIMS *m/z* (% relative intensity) 347 ([M+Na]⁺, 8), 271 (30), 212 (100).

5,9-epidioxy-8,14-epoxyergosta-6,22-dien-3-ol (5): white amorphous solid; $[\alpha]_D$ +15 (*c* 0.04; CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 244 (2.86) nm; IR (thin film) $\nu_{\max}$ 3450, 3250, 2975, 2875, 1460, 1350 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) ข้อมูลในตารางที่ 5; EIMS *m/z* (% relative intensity) 442 ([M]⁺, 4), 317 (100), 107 (77); HREIMS *m/z* 442.3085 (calcd for C₂₈H₄₂O₄, 442.3083).

5,8-Epidioxyergosta-6,22-dien-3-ol (6): white amorphous solid; $[\alpha]_D$ -16 (*c* 0.38; CHCl₃); UV (CHCl₃) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 244 (2.68) nm; IR (thin film) $\nu_{\max}$ 3500, 3200, 2975, 2925 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) ข้อมูลในตารางที่ 6; EIMS *m/z* (% relative intensity) 428 ([M]⁺, 5), 396 (100), 149 (57).



ในบรรดาสารที่แยกได้ทั้งหมด สาร 8-Isocyanoamphilecta-11(20),15-diene (1) จัดเป็นสารใหม่ในกลุ่ม amphilectene diterpene และผลการทดสอบฤทธิ์ด้านมาลาเรียของสารทั้ง 6 ชนิด แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 1 NMR data of **1** (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C ; C_6D_6)

Position	^{13}C (mult.)	^1H (mult.; J in Hz)	HMBC correlation ($\text{C}\rightarrow\text{H}$)
1	33.9 (CH)	1.67 (m)	H-2, H-3, H-14
2 a	39.8 (CH_2)	1.78 (m)	H-3, H-4, H-12, H-18
b		0.58 (ddd; 13.2, 11.7, 11.5)	
3	35.9 (CH)	0.79 (m)	H-4, H-5, H-13, H-18
4	43.0 (CH)	1.13 (br dd; 10.5, 8.2)	H-3, H-6, H-13, H-18
5 a	30.0 (CH_2)	1.78 (m)	H-3, H-6, H-13
b		0.48 (dddd; 11.9, 11.4, 9.4, 3.8)	
6 a	30.1 (CH_2)	1.23 (br d; 13.4)	H-5, H-7
b		1.46 (m)	
7	40.8 (CH)	0.83 (m)	H-6, H-19
8	66.6 (C) ^a	-	H-9, H-10, H-12, H-13, H-19
9 a	39.4 (CH_2)	1.90 (m)	H-10
b		0.86 (ddd; 13.1, 11.7, 2.3)	
10 a	33.6 (CH_2)	2.34 (ddd; 13.0, 13.0, 4.4)	H-9, H-20
b		2.00 (ddd; 13.0, 2.3, 2.2)	
11	150.1 (C)	-	H-9, H-10, H-12, H-13, H-20
12	46.1 (CH)	1.93 (m)	H-1, H-13, H-14, H-20
13	55.5 (CH)	0.64 (ddt; 10.9, 9.8, 3.2)	H-4, H-6, H-12
14 a	43.0 (CH_2)	2.66 (br d; 14.7)	H-1, H-2, H-16
b		1.43 (m)	
15	144.2 (C)	-	H-1, H-16
16 a	111.5 (CH_2)	4.77 (br s)	H-14, H-17
b		4.85 (br s)	
17	22.7 (CH_3)	1.66 (s, 3H)	H-16
18	19.7 (CH_3)	0.75 (br s, 3H)	H-2
19	15.7 (CH_3)	0.82 (br s, 3H)	-
20 a	105.8 (CH_2)	4.77 (br s)	H-10, H-12
b		4.66 (d; 1.1)	
21	159.9 (C) ^a	-	-

Note; ^a t, $J = 4.2$ Hz

ตารางที่ 2 NMR data of **2** (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C ; C_6D_6)

Position	^{13}C (mult.)	^1H (mult.; J in Hz)	Position	^{13}C (mult.)	^1H (mult.; J in Hz)
1	34.9 (CH)	1.58 (m)	10 a	33.9 (CH_2)	2.24 (ddd; 14.2, 5.9, 1.6)
2 a	41.3 (CH_2)	1.84 (ddd; 13.9, 3.4, 3.4)	b		2.02 (ddd; 14.2, 9.6, 9.4)
b		0.50 (br d, 11.4)	11	148.8 (C)	-
3	39.9 (CH)	1.08 (m)	12	49.2 (CH)	1.35 (dd; 10.8, 10.6)
4	39.9 (CH)	1.42 (m)	13	45.5 (CH)	0.87 (br dd; 10.8, 10.6)
5 a	24.7 (CH_2)	1.74 (br ddd; 13.0, 7.8, 7.1)	14 a	42.3 (CH_2)	2.72 (br d; 13.7)
b		0.66 (dddd; 13.0, 6.4, 3.8, 3.2)	b		1.44 (m)
6 a	33.6 (CH_2)	1.43 (m)	15	144.3 (C)	-
b		1.06 (m)	16 a	111.7 (CH_2)	4.86 (br s)
7	59.3 (C) ^a	-	b		4.80 (br s)
8	42.3 (CH)	1.19 (m)	17	22.0 (CH_3)	1.68 (br s, 3H)
9 a	21.8 (CH_2)	1.64 (m)	18	19.4 (CH_3)	0.77 (br s, 3H)
b		1.66 (m)	19	28.7 (CH_3)	0.98 (t; 1.8, 3H)
			20 a	106.6 (CH_2)	4.86 (br s)
			b		4.67 (br s)
			21	158.5 (C) ^a	-

Note; ^a t, $J = 5.0$ Hz.

ตารางที่ 3 NMR data of **3** (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C ; C_6D_6)

Position	^{13}C (mult.)	^1H (mult.; J in Hz)	Position	^{13}C (mult.)	^1H (mult.; J in Hz)
1	37.7 (CH)	2.32 (br ddd; 10.8, 10.0, 4.3)	10 a	33.1 (CH_2)	2.43 (ddd; 13.3, 13.0, 2.0)
2 a	41.2 (CH_2)	1.47 (m)	b		2.01 (ddd; 13.3, 2.1, 2.0)
b		0.87 (m)	11	149.3 (C)	-
3	36.3 (CH)	0.88 (m)	12	46.2 (CH)	2.07 (dd; 10.8, 10.7)
4	42.9 (CH)	1.16 (br dd; 11.0, 10.6)	13	54.3 (CH)	0.64 (ddt; 11.0, 10.7, 3.6)
5 a	30.1 (CH_2)	1.78 (br d; 10.6)	14	131.8 (CH)	4.88 (br d; 8.5)
b		0.52 (dddd; 13.5, 13.2, 13.1, 4.1)	15	128.5 (C)	-
6 a	30.1 (CH_2)	1.47 (m)	16	17.8 (CH_3)	1.57 (br s, 3H)
b		1.24 (br d; 14.7)	17	25.6 (CH_3)	1.62 (br s, 3H)
7	40.7 (CH)	0.83 (m)	18	19.6 (CH_3)	0.75 (dd; 6.0, 2.1, 3H)
8	66.5 (C) ^a	-	19	15.7 (CH_3)	0.83 (br d; 6.4, 3H)
9 a	38.6 (CH_2)	1.90 (br dd; 13.0, 2.0)	20 a	107.7 (CH_2)	4.79 (br s)
b		0.85 (m)	b		4.68 (d; 1.4)
			21	159.9 (C) ^a	-

Note; ^a t, $J = 3.7$ Hz.

ตารางที่ 4 NMR data of **4** (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C ; C_6D_6)

Position	^{13}C (mult)	^1H (mult; J in Hz)	Position	^{13}C (mult)	^1H (mult; J in Hz)
1	33.3 (CH)	1.80 (m)	10 a	33.7 (CH_2)	2.25 (ddd; 13.3, 12.8, 4.1)
2 a	41.0 (CH_2)	2.08 (br d; 13.3)	b		2.00 (ddd; 13.3, 4.1, 2.7)
b		0.62 (m)	11	149.8 (C)	-
3	35.4 (CH)	1.04 (m)	12	46.1 (CH)	1.78 (m)
4	42.7 (CH)	0.76 (m)	13	55.2 (CH)	0.67 (m)
5 a	29.8 (CH_2)	1.25 (br d; 13.8)	14 a	45.5 (CH_2)	1.81 (m)
b		0.50 (dddd; 13.4, 13.2, 11.9, 4.1)	b		0.71 (m)
6 a	30.0 (CH_2)	1.74 (m)	15	56.3 (C) ^b	-
b		1.41 (dddd; 13.7, 13.2, 12.4, 3.7)	16	30.2 (CH_3)	1.05 (br s, 3H)
7	40.7 (CH)	0.84 (m)	17	31.4 (CH_3)	1.05 (br s, 3H)
8	66.7 (C) ^a	-	18	19.8 (CH_3)	0.76 (br s, 3H)
9 a	39.5 (CH_2)	1.93 (br d; 13.3)	19	15.7 (CH_3)	0.82 (d; 6.4, 3H)
b		0.88 (m)	20 a	106.5 (CH_2)	4.77 (br s)
			b		4.71 (br s)
			21	157.8 (C) ^b	-
			22	159.7 (C) ^a	-

Note; ^a t, $J = 3.7$ Hz

^b t, $J = 5.0$ Hz.

ตารางที่ 5 NMR data of **5** (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C ; C_6D_6)

Position	^{13}C (mult)	^1H (mult; J in Hz)	HMBC correlation ($\text{C} \rightarrow \text{H}$)
1 ax	27.9 (CH_2)	1.92 (br d; 13.3)	H-19
eq		1.05 (ddd; 13.3, 3.3, 3.2)	
2 ax	31.2 (CH_2)	1.26 (m)	H-4
eq		1.61 (m)	
3 ax	65.9 (CH)	3.82 (dddd; 11.0, 9.6, 5.0, 4.5)	H-4
4 ax	36.1 (CH_2)	1.34 (m)	H-6
eq		1.98 (dd; 14.2, 5.0)	
5	85.5 (C)	-	H-4, H-6
6	135.9 (CH)	5.61 (d; 9.6)	H-7
7	128.9 (CH)	5.45 (d; 9.6)	H-6
8	64.1 (C)	-	H-6, H-11
9	86.6 (C)	-	H-7, H-11, H-12, H-19
10	50.5 (C)	-	H-19
11 ax	20.1 (CH_2)	1.44 (m)	-
eq		1.64 (m)	
12 ax	33.8 (CH_2)	1.37 (m)	H-11, H-18
eq		1.67 (m)	
13	40.4 (C)	-	H-11, H-15, H-18
14	74.8 (C)	-	H-7, H-12, H-15, H-16, H-18
15 a	27.6 (CH_2)	1.80 (m)	H-16
b		1.28 (m)	
16 a	26.6 (CH_2)	1.58 (m)	-
b		1.55 (m)	
17	55.5 (CH)	1.32 (m)	H-16, H-18, H-20, H-21
18	15.8 (CH_3)	0.93 (s, 3H)	-
19	15.6 (CH_3)	1.06 (s, 3H)	-
20	39.6 (CH)	2.02 (br d; 8.2)	H-22, H-23
21	21.1 (CH_3)	0.93 (d; 6.9, 3H)	-
22	135.4 (CH)	5.07 (dd; 15.1, 8.2)	H-21, H-24
23	132.6 (CH)	5.20 (dd; 15.1, 7.8)	H-20, H-24
24	43.1 (CH)	1.86 (m)	H-22, H-23, H-26, H-27, H-28
25	33.3 (CH)	1.48 (m)	H-27
26	19.9 (CH_3)	0.89 (d; 6.8, 3H)	H-25
27	20.1 (CH_3)	0.88 (d; 6.9, 3H)	H-24
28	17.8 (CH_3)	0.97 (d; 6.9, 3H)	H-23, H-24

ตารางที่ 6 NMR data of **6** (500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C ; C_6D_6)

Position	^{13}C (mult)	^1H (mult; J in Hz)	Position	^{13}C (mult)	^1H (mult; J in Hz)
1 ax	35.1 (CH_2)	2.08 (br dd; 13.8, 3.2)	13	44.4 (C)	-
eq		1.48 (m)	14	52.0 (CH)	1.54 (br d; 7.4)
2 ax	30.5 (CH_2)	1.43 (m)	15 a	21.6 (CH_2)	1.75 (m)
eq		1.66 (m)	b		1.33 (m)
3 ax	66.2 (CH)	3.90 (dddd; 11.0, 10.6, 5.9, 5.0)	16 a	28.9 (CH_2)	1.38 (m)
			b		1.23 (m)
4 ax	37.4 (CH_2)	1.70 (m)	17	56.2 (CH)	0.98 (br d; 6.9)
eq		2.03 (br dd; 4.0, 1.9)	18	12.9 (CH_3)	0.59 (s, 3H)
5	81.6 (C)	-	19	18.2 (CH_3)	0.66 (s, 3H)
6	135.7 (CH)	5.94 (d; 8.4)	20	40.1 (CH)	1.93 (qdd; 6.9, 9.2)
7	130.7 (CH)	6.27 (d; 8.4)	21	21.1 (CH_3)	0.99 (d; 6.9, 3H)
8	78.8 (C)	-	22	135.8 (CH)	5.12 (dd; 15.1, 8.6)
9	51.7 (CH)	1.51 (m)	23	132.3 (CH)	5.24 (dd; 15.1, 7.7)
10	37.2 (C)	-	24	43.8 (CH)	1.87 (br qd; 6.9, 13.7)
11 ax	23.6 (CH_2)	1.62 (m)	25	33.4 (CH)	1.47 (m)
eq		1.21 (m)	26	20.2 (CH_3)	0.89 (d; 6.9, 3H)
12 ax	39.6 (CH_2)	1.73 (m)	27	19.8 (CH_3)	0.88 (d; 6.8, 3H)
eq		0.92 (br dd; 6.4, 2.7)	28	17.6 (CH_3)	0.97 (d; 6.9, 3H)

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียโดยวิธี microculture radioisotope technique

compound	1	2	3	4	5	6	artemisinin	dihydroartemisinin
Antimalarial	0.98	1.07	0.44	0.09	7.42	6.28	0.01	0.004
IC_{50} (μM)								

การสกัดและแยกสารจากฟองน้ำ *Halichondria*

นำฟองน้ำ *Halichondria* 2 kg มาทำให้แห้งโดยใช้วิธี freeze drying ได้ฟองน้ำแห้ง 252.3 g หลังจากนั้นนำไปสกัดด้วย methanol ได้สารสกัด 68.83 g หลังจากนั้นนำไป partition จนได้ชั้น hexane 2.80 g, dichloromethane 2.74 g, butanol 14.16 g และชั้นน้ำ 43.95 g จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียพบว่าชั้น dichloromethane และ ชั้น butanol มีฤทธิ์ antimalarial และมีค่า $\text{IC}_{50} = 0.27 \mu\text{g/ml}$ และ $2.71 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ หลังจากนั้นนำชั้น dichloromethane มาแยกพบว่าสารสกัดติดกับ stationary phase ทำให้ไม่สามารถนำสารสกัดคืนมาได้ จึงได้นำสารจากชั้น butanol มาทำการสกัดแยก พบว่าสารสกัดในชั้น butanol มีสารสกัดจริงแค่ 2.19 g น้ำหนักที่เหลือเป็นเกลือ หลังจากนั้นนำสารสกัดจากชั้น butanol มาทำ column chromatography โดยใช้ sephadex LH-20 เป็น stationary phase และ methanol เป็น mobile phase พบว่าก็ไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากผลการทดลองสามารถแยกสารได้ 2 กลุ่มคือ isonitrile diterpenes และ steroidal peroxides เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารทั้ง 2 กลุ่มพบว่าสารทั้ง 2 กลุ่มมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย แต่สารในกลุ่ม isonitrile diterpenes มีฤทธิ์ดีกว่า 5.9-82 เท่า หากเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่ม isonitrile diterpene ด้วยกันพบว่าตำแหน่ง isonitrile ไม่ว่าจะแทนที่อยู่บน C-7 หรือ C-8 สารที่ได้มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียใกล้เคียงกัน พิจารณาได้จากค่า IC_{50} ของสารชนิดที่ 1 และ สารชนิดที่ 2 และพบว่าถ้ามีหมู่ isonitrile 2 หมู่ ฤทธิ์จะดีที่สุด ซึ่งดูได้จากค่า IC_{50} ของสารชนิดที่ 4 แสดงว่าหมู่ isonitrile จำเป็นสำหรับการออกฤทธิ์ เมื่อมาศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารในกลุ่ม isonitrile diterpenes ส่วนใหญ่ ไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ปกติ (Fibroblast) ยกเว้นสารที่มีหมู่ isonitrile 2 หมู่ (สารชนิดที่ 4) ในขณะที่สาร steroidal peroxides ทั้ง 2 ชนิดแสดงฤทธิ์เฉพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ (Wattanapiromsakul et al., 2009) สำหรับงานวิจัยในอนาคตควรที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม isonitrile diterpenes และควรแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำหลายชนิด เพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียที่ดีและมีโครงสร้างหลากหลายเพื่อที่จะสามารถนำไปเป็น lead compound ในการพัฒนายารักษามาลาเรียชนิดใหม่ๆได้ เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าการดื้อยาในกลุ่ม artemisinin ซึ่งจัดเป็นยากลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้ระยะเวลาในการรักษามาลาเรียเพิ่มเกือบ 2 เท่าของระยะเวลาที่ใช้ในการรักษาเดิม ซึ่งข้อสังเกตดังกล่าวพบโดยนักวิจัยที่ทำการศึกษาระยะเวลาของการรักษาโรคมาลาเรียในกัมพูชา (BIOTEC, 2009)

เอกสารอ้างอิง

- สำนักงานสถิติ. 2006. Available: http://epid.moph.go.th/dssur/fact/malaria_fact.htm
(accessed: 2006, December 20).
- BIOTEC. 2009. Available: www.biotec.or.th/biotechnology-th/newsdetail.asp?id=5441
(accessed: 2009, June 14).
- Desjadins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents Chemother.* 16, 710-718.
- Ishiyama, H., Hashimoto, A., Fromont, J., Hoshino, Y., Mikami, Y. and Kobayashi, J. 2005. Halichonadins A-D, new sesquiterpenoids from a sponge *Halichondria* sp. *Tetrahedron* 61, 1101-1105.
- Jongrungruangchok, S., Kittakoop, P., Yongsmith, B., Bavovada, R., Tanasupawat, S., Lartpornmatulee, N. and Thebtaranonth, Y., 2004. Azaphilone pigment from a yellow mutant of the fungus *Monascus kaoliang*. *Phytochemistry* 65, 2569-2575.
- Laurent, D. and Pietra, F. 2006. Antiplasmodial marine natural products in the perspective of current chemotherapy and prevention of Malaria. *Marine Biotechnology* 8, 433-477.
- Molinski, T.F., Faulkner, D.J., Van Duyne, G.D. and Clardy, J. 1987. Three new diterpene isonitrile from a Palauan sponge of the genus *Halichondria*. *Journal of Organic Chemistry* 52, 3334-3337.
- Trager, W. and Jansen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-675.
- Wattanapiromsakul, C., Chanthathamrongsiri, N., Bussarawit, S., Yuenyongsawat, S. and Plubrukarn, A. and Suwanborirux, K. 2009. 8-Isocyanoamphilecta-11(20), 15-diene, a new antimalarial isonitrile diterpene from the sponge *Ciocalapata* sp. *Canadian Journal of Chemistry* 87, 612-618.

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัย

Wattanapiromsakul, C., Chanthathamrongsiri, N., Bussarawit, S., Yuenyongsawad, S. and Plubrukarn, A. and Suwanborirux, K. 2009. 8-Isocyanoamphilecta-11(20), 15-diene, a new antimalarial isonitrile diterpene from the sponge *Ciocalapata* sp. Canadian Journal of Chemistry 87, 612-618.