รายงานวิจัย

องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในฟองน้ำของไทย จากแนวชายฝั่งจังหวัดปัตตานี

(Chemical constituents and biologically active agents in Thai sponges from Pattani coastline)

คณะผู้วิจัย

นายอนุชิต พลับรู้การ; นายฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล;

นางสุปรียา ยืนยงสวัสดิ์

หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับการสนับสนุนจาก เงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประเภทกำหนดหัวข้อ (วิทยาศาสตร์ทางทะเล) ประจำปีงบประมาณ 2547

เมษายน 2551

บทคัดย่อ

จากการสำรวจฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลซึ่งเก็บสำรวจจากบริเวณกองหินโลซิน จ.ปัตตานี-นราธิวาส และบริเวณรอบเกาะเต่า จ. สุราษฎร์ธานี พบว่าตัวอย่างฟองน้ำ 3 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำในสกุล *Corticium* และ *Ciocalapata* (จาก จ.สุราษฎร์ธานี) และฟองน้ำสกุล *Hemigellius* (จาก จ.ปัตตานี) มีฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบที่น่าสนใจ การศึกษาองค์ประกอบในตัวอย่างฟองน้ำแต่ละชนิด สามารถแยกสกัดและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของตัวอย่างสารต่างๆ ได้ดังนี้; 4-acetoxy plakinamine B จากฟองน้ำ *Corticium* sp. พบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส ในระดับดี (IC_{50} 0.59±0.14 μM); 5,9-*epi*-dioxyergostan-3,8,17-triol และ 5,8-epi-dioxyergosterol จากฟองน้ำ *Ciocalapata* sp. พบว่ามีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในระดับดี (IC_{50} 7.1 และ 6.3 μM, ตามลำดับ); และ *(5Z,9Z)*-nonatriacontadienoic acid จากฟองน้ำ *Hemigellius* sp. ทั้งนี้ 4-acetoxy plakinamine B; 5,9-*epi*-dioxyergostan-3,8,17-triol; และ *(5Z,9Z)*-nonatriacontadienoic acid เป็นสารชนิดใหม่ที่พบเป็นครั้งแรกจากการวิจัยตามโครงการนี้

ABSTRACT

The preliminary screening for the biologically active components and chemical constituents in marine invertebrates collected from Losin Pinnacle, Pattani-Narathivat Provinces and from Koh-Tao, Surat-Thani Province showed interesting activities and chemical components in several sponge specimens, including the sponges of the genera *Corticium* and *Ciocalapata* (from Surat-Thani) and of the genus *Hemigellius* (from Pattani). The further investigation led to the isolation of the followings; 4-Acetoxy plakinamine B from *Corticium* sp., active in acetylcholinesterase inhibitory assay (IC_{50} 0.59±0.14 μM); 5,9-*epi*-dioxyergostan-3,8,17-triol and 5,8-epi-dioxyergosterol from *Ciocalapata* sp., active in antimalarial assay (IC_{50} 7.1 และ 6.3 μM, respectively); and *(5Z,9Z)*-nonatriacontadienoic acid from *Hemigellius* sp. Among these, 4-acetoxy plakinamine B; 5,9-*epi*-dioxyergostan-3,8,17-triol; and *(5Z,9Z)*-nonatriacontadienoic acid are new compounds first reported in this investigation.

สารบัญ

ตอนที่		หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	ก
	บทคัดย่อ	ข
	สารบัญตาราง	จ
	บทนำ	1
1	**อนุพันธ์สเตอรอยดอลอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสจากฟองน้ำในสกุล *Corticium***	5
	1.1. บทนำ	5
	1.2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย	6
	1.2.1 สภาวะการทดลองทั่วไป	6
	1.2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ	7
	1.2.3. การแยกสกัด	8
	1.2.4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	8
	1.3. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง	9
	1.3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง	9
	1.3.2. ฤทธิ์ทางชีวภาพ	12
2	**อนุพันธ์สเตอรอยด์เปอร์ออกไซด์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำในสกุล *Ciocalapata***	14
	2.1. บทนำ	14
	2.2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย	15
	2.2.1 สภาวะการทดลองทั่วไป	15
	2.2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ	15
	2.2.3. การแยกสกัด	16
	2.2.4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	16
	2.3. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง	17
	2.3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง	18
	2.3.2. ฤทธิ์ทางชีวภาพ	24
3	**กรดเตโมสปอนจิกจากฟองน้ำในสกุล *Hemigellius***	25
	3.1. บทนำ	25
	3.2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย	26
	3.2.1 สภาวะการทดลองทั่วไป	26
	3.2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ	26
	3.2.3. การแยกสกัด	26
	3.2.4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	27
	3.3. ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง	27
	3.3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง	27

3.3.2. ฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 29
เอกสารอ้างอิง..... 30
ผลผลิตของโครงการ..... 33

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลที่อยู่ระหว่างการพัฒนาทางคลินิก	2
2	ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **1**	11
3	ฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ของสาร **1**	13
4	ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **2**	20
5	ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **3**	23
6	ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **4**	29

บทนำ

สิ่งมีชีวิตจากทะเล โดยเฉพาะในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกซึ่งดำรงชีพแบบเกาะติดกับที่ เช่น ฟองน้ำ ปะการังอ่อน และเพรียงหัวหอม เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนายาใหม่จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีการรายงานการค้นพบสารเคมีชนิดใหม่จากสิ่งมีชีวิตจากทะเลอย่างต่อเนื่อง ประเด็นที่น่าสนใจที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลเหล่านี้ นอกเหนือไปจากการรายงานการค้นพบโครงสร้างแกนชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีการค้นพบในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยบนบกมาก่อน ซึ่งสื่อถึงกระบวนการชีวสังเคราะห์ที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตบนบกโดยเฉพาะจากพืชสมุนไพรทั่วไปอย่างสิ้นเชิง สารเคมีที่มีการรายงานส่วนหนึ่งยังเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ทั้งในด้านความแรงในการออกฤทธิ์ เป้าหมายการออกฤทธิ์ รวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งเป็นกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างไปจากกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่มีการใช้ในทางคลินิกในปัจจุบัน

จนถึงปัจจุบัน มียาที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในสถานพยาบาลทั่วไป ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล หรือมีต้นกำเนิดจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล อยู่เพียง 2 กลุ่มหลักเท่านั้น ได้แก่ ยาต้านมะเร็งกลุ่ arabinonucleoside เช่น cytarabine และ gemcitabine ซึ่งมีต้นกำเนิดจาก nucleoside จากฟองน้ำ *Tethya crypta* (Schwartsmann et al, 2001) และเปปไทด์จากหอยเต้าปูน (*Conus* peptide) ได้แก่ zinocotide ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์เลียนแบบเปปไทด์จากพิษหอยเต้าปูน *Conus magnus* (Penn and Paice, 2000)

ถึงแม้จะมียาที่ได้จากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งได้รับการอนุมัติให้ใช้ในทางคลินิกโดยทั่วไปในปัจจุบันเพียงไม่กี่รายการ แต่หากเทียบกับระยะเวลา และจำนวนของสารที่ได้จากการรายงานการศึกษาวิจัยในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยรวมทั่วไปแล้ว อัตราส่วนเพียงเล็กน้อยนี้ก็แสดงให้เห็นศักยภาพและแนวโน้มที่ดีของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลในการเป็นแหล่งที่มาของยาใหม่ และเมื่อรวมกับรายการของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลซึ่งอยู่ระหว่างการศึกษาวิจัยทางคลินิกในระยะต่าง ๆ แล้ว (ตารางที่ 1) ก็จะสามารถเห็นถึงศักยภาพที่ดีของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลในการเป็นสารต้นแบบในการพัฒนายาใหม่ได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลที่อยู่ระหว่างการพัฒนาทางคลินิก

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	สถานะการวิจัย
ecteinascidin 743 (Yondelis®)	*Ecteinascidia turbinata*	Phase III (cancer)
AE-941 (eovastat)	shark cartilages	Phase III (cancer)
dehydrodidemnin B (Aplidin®)	*Aplidium albicans*	Phase II (cancer)
bryostatin 1	*Bugula neritina*	Phase II (cancer)
soblidotin	*Dolabella auricularia*	Phase II (cancer)
synthatodin	*Dolabella auricularia*	Phase II (cancer)
kahalalide F	*Elysia rufescens*/*Bryosis* sp.	Phase II (cancer)
HTI-286	*Cymbastella* sp.	Phase II (cancer)
squalamine	*Squalus acanthias*	Phase II (cancer)
PM00104 (Zalypsis®)	*Jurunna funebris*	Phase I (cancer)
E7389	*Lissodendoryx* sp.	Phase I (cancer)
ES-285 (spisulosine)	*Spisula polynyma*	Phase I (cancer)
KRN-7000	*Agelas mauritianus*	Phase I (cancer)
discodermolide	*Discodermia dissoluta*	Phase I (cancer)
GTS-21	*Paranemertes peregrina*	Phase I (Alzheimer's disease)
CGX-1160	*Conus geographus*	Phase I (pain)
CGX-1007	*Conus geographus*	Phase I (pain)

หมายเหตุ: ดัดแปลงจาก Newman and Cragg (2004)

ประเด็นที่เป็นที่น่าสังเกตเกี่ยวกับตัวอย่างของสารจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีการนำมาศึกษาและพัฒนาเพื่อให้เป็นยาตามที่แสดงในตารางที่ 1 คือ ตัวอย่างตามที่แสดงเกือบทั้งหมดเป็นสารที่มีแนวโน้มในการนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง หรือสารเคมีบำบัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกในการออกฤทธิ์ในรูปแบบที่ใกล้เคียงกับยาต้านมะเร็ง ทั้งนี้ เราอาจพิจารณาได้ว่าเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดจาก 2 สาเหตุหลัก ในทางหนึ่งปัจจัยในด้านนโยบาย โดยเฉพาะจากการทุ่มเทงบประมาณจาก National Cancer Institute (NCI) ของสหรัฐอเมริกา เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ทิศทางของการวิจัยส่วนใหญ่มีความโน้มเอียงไปในด้านการแสวงหายาต้านมะเร็ง แต่ทางกลับกัน หากอ้างอิงถึงหลักการพื้นฐานของการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล ซึ่งเป็นที่ทราบทั่วไปว่า สารเคมีที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่เป็นกลุ่มเป้าหมายส่วนใหญ่ โดยเฉพาะจากฟองน้ำและเพรียงหัวหอมซึ่งเป็นสัตว์ที่ดำรงชีวิตแบบติดอยู่กับที่นั้น มักจะเป็นสารพิษที่สร้างเพื่อใช้ในการป้องกันตนเอง

หรือเพื่อในการจับเหยื่อที่เคลื่อนไหวได้เร็วกว่า ดังนั้น เป้าหมายและกลไกในการออกฤทธิ์ของสารเหล่านี้ส่วนใหญ่จึงมุ่งไปที่การรบกวนระบบการทำงานทางสรีรวิทยาหรือชีวเคมีของผู้ล่าหรือเหยื่อ และกลายมาเป็นทิศทางในการปรับปรุงสูตรโครงสร้างและขนาดการใช้ยาจากสารเหล่านี้ เพื่อให้เกิดการทำลายเซลล์หรือจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นหลัก

อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งหรือฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง การพัฒนาสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลเพื่อการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และทางเภสัชกรรมยังมีทิศทางในการพัฒนาไปในรูปแบบการออกฤทธิ์อื่นๆ อีก ตัวอย่างที่น่าสนใจคือ อนุพันธ์ไดเทอร์ปีนในกลุ่ม pseudopterocins จากกัลปังหา *Pseudopterogorgia elisabethae* ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์และผลต่อกลไกการเกิดการอักเสบ และในปัจจุบันมีการนำมาพัฒนาเพื่อเป็นสารลบริ้วรอยและบำรุงผิวในเครื่องสำอางของ Esteé Lauder ด้วย

จากตัวอย่างที่อ้างถึงข้างต้น เป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลในฐานะของแหล่งที่มาของยาใหม่ได้เป็นอย่างดี และเป็นที่มาของการดำเนินการวิจัยตามโครงการวิจัยเรื่อง องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในฟองน้ำของไทยจากแนวชายฝั่งจังหวัดปัตตานี ซึ่งเน้นการศึกษาวิจัยและการแสวงหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลจากแหล่งที่มาตามที่ระบุในโครงการ โดยมุ่งหาสารเคมีชนิดใหม่หรือสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน และคาดหวังว่าผลจากการศึกษาวิจัยนี้ จะนำไปสู่การได้มาซึ่งสารกลุ่มนำที่สามารถนำมาเป็นต้นแบบในการพัฒนายาใหม่ได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยเรื่อง องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในฟองน้ำของไทยจากแนวชายฝั่งจังหวัดปัตตานี ประกอบด้วย

1. เพื่อแยกสกัดและศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และ/หรือสารชนิดใหม่ที่สูตรโครงสร้างทางเคมีที่น่าสนใจจากฟองน้ำที่สำรวจพบได้ในแนวปะการังนอกชายฝั่งจังหวัดปัตตานี
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้จากฟองน้ำซึ่งได้จากผลการศึกษาตามข้อ 1

อนึ่ง สืบเนื่องจากปัญหาและอุปสรรคในการวิจัยตามที่ระบุในรายงานความก้าวหน้าของโครงการและตามแบบขยายระยะเวลาดำเนินงานของโครงการ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถเข้าไปในพื้นที่สำรวจตัวอย่าง

เพื่อเก็บรวบรวมตัวอย่างฟองน้ำเพิ่มเติมตามที่ได้ระบุในระเบียบวิธีวิจัยในข้อเสนอโครงการได้ ผู้วิจัยได้แจ้งขอปรับและเพิ่มเติมพื้นที่ในการสำรวจตัวอย่างจากเดิมที่ระบุพื้นที่เฉพาะในแนวชายฝั่งจังหวัดปัตตานี มาเป็นพื้นที่แนวชายฝั่งของจังหวัดสุราษฎร์ธานีด้วย (อ้างถึงแบบวิจัย 14.1 เพื่อขอขยายเวลาและปรับปรุงโครงการเสนอเมื่อ กรกฎาคม พ.ศ.2550)

รายงานการวิจัยฉบับนี้แบ่งเป็น 3 ส่วน ตามชนิดของตัวอย่างฟองน้ำซึ่งผู้วิจัยได้คัดเลือกตามผลการศึกษาขั้นคัดกรอง เพื่อศึกษาวิจัยและแยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจ ได้แก่ การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสจากฟองน้ำในสกุล *Corticium*; การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำในสกุล *Ciocalapata* และ การแยกสกัดและศึกษาสูตรโครงสร้างของกรดไขมันจากฟองน้ำ *Hemigellius* ทั้งนี้ กิจกรรมการวิจัยในโครงการแต่ละส่วน ประกอบด้วยกิจกรรมหลักดังนี้

- การเก็บสำรวจตัวอย่างฟองน้ำ พื้นที่เก็บสำรวจสำหรับตัวอย่างฟองน้ำในสกุล *Hemigellius* ได้จากบริเวณกองหินโลซิน จ.ปัตตานี-นราธิวาส ส่วนตัวอย่างฟองน้ำในสกุล *Corticium* และ *Ciocalapata* ได้จากบริเวณเกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี
- การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับคัดกรอง การติดตามผลการแยกสกัด และการทดสอบยืนยันผลและวิเคราะห์ความแรงในการออกฤทธิ์ ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นเป้าหมายในโครงการวิจัยนี้ ประกอบด้วย (1) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งดำเนินการภายใต้ความร่วมมือกับ รศ.ดร. กรกนก อิงคนินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร; (2) ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ดำเนินการโดยขอใช้บริการจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยกลาง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และ (3) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์มะเร็ง HeLa, MCF-7, KB, และ HT-29 เป็นเซลล์มะเร็งเป้าหมายในการทดสอบ และดำเนินการในห้องปฏิบัติการของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน ดำเนินการภายใต้ความร่วมมือกับ ดร. สมชัย บุศราวิช สถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ.ภูเก็ต
- การแยกสกัดและการศึกษาโครงสร้างทางเคมี โดยคัดเลือกตัวอย่างที่มีฤทธิ์ที่ดีจากผลการทดสอบระดับคัดกรองตามที่อ้างถึงข้างต้น และดำเนินการแยกสกัดโดยใช้การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพประกอบเพื่อติดตามส่วนของสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพตามที่ต้องการ จนกระทั่งได้สารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นๆ

ตอนที่ 1

อนุพันธ์สเตอรอยดอลอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสจากฟองน้ำในสกุล *Corticium*

1.1. บทนำ

เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase; AChE, EC 3.1.1.7) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบประสาทโคลิเนอร์จิก ณ บริเวณรอยต่อเซลล์ประสาท (cholinergic synapses) ทั้งในระบบประสาทโคลิเนอร์จิกของสมอง และในระบบประสาท-กล้ามเนื้อ (neuromuscular junctions) โดยทำหน้าที่หลักในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรลัยซิสของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน ซึ่งส่งผลให้สัญญาณประสาทที่กระตุ้นโดยสารสื่อประสาทนี้สิ้นสุด และเซลล์ประสาทหรือเซลล์กล้ามเนื้อที่รอรับสัญญาณนั้นสามารถเตรียมพร้อมต่อการรับสัญญาณรอบถัดไป

เนื่องจากบทบาทของอะซิติลโคลีนในฐานะของสารสื่อประสาทซึ่งมีความสำคัญต่อระบบทางสรีรวิทยาในแทบทุกส่วน ทำให้ AChE เข้ามามีบทบาทในฐานะของเป้าหมายการออกแบบยา โดยเฉพาะในโรคที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับความบกพร่องในระบบประสาทโคลิเนอร์จิกด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) พาร์กินสัน (Parkinson's disease) และอาการหนังตาตก (myasthenia gravis) เป็นต้น รวมไปถึงเป็นเป้าหมายของการออกแบบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ซึ่งใช้ในภาคเกษตรกรรม เช่น ยาฆ่าแมลงกลุ่มฟอสเฟต หรือแม้กระทั่งการใช้เป็นอาวุธเคมีในสงคราม

สำหรับการใช้สารยับยั้ง AChE ในผู้ป่วย AD นั้น มีพื้นฐานในการออกแบบยาจากสมมติฐานโคลิเนอร์จิก (cholinergic hypothesis) ซึ่งระบุว่า ความบกพร่องของระบบประสาทโคลิเนอร์จิกในสมอง โดยเฉพาะส่วนที่เกิดจากการขาดสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน เป็นหนึ่งในอาการแสดงของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ และอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการสร้างคราบอะมัยลอยด์ (amyloid plaque) ซึ่งเป็นหนึ่งในพยาธิสภาพหลักในสมองของผู้ป่วยจากโรค AD ดังนั้น การชดเชยปริมาณของอะซิติลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทหลักของระบบประสาทโคลิเนอร์จิกจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรค AD ที่ใกล้เคียงกับการแก้ไขจากต้นเหตุที่สุด (Francis et al, 1999) ทั้งนี้ ในปัจจุบัน ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรค AD ได้แก่ donepezil, galantamine และ rivastigmine ส่วน tacrine

ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE ชนิดแรกที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในผู้ป่วยได้นั้น ถูกเพิกถอนแล้วเนื่องจากผลความเป็นพิษต่อตับ (Eslami and Espinoza,. 2003)

ถึงแม้หลักการในการรักษาผู้ป่วยโรค AD โดยใช้ยายับยั้ง AChE จะยังคงมีข้อถกเถียงว่า เป็นเพียงการรักษาตามอาการ และผลการรักษาที่ได้โดยส่วนใหญ่ จะมีผลที่ดีอยู่ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เพียงไม่เกิน 1 ปีเท่านั้น แต่ในทางกลับกัน ก็ยังมีรายงานว่าในผู้ป่วยบางราย การใช้ยายับยั้ง AChE สามารถคงระดับผลการรักษาที่น่าพอใจได้นานกว่า 3 ปี ดังนั้น การพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง AChE จึงยังเป็นหนึ่งในเป้าหมายการออกแบบยาเพื่อใช้ในผู้ป่วย AD รวมถึงการใช้ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของระบบประสาทโคลิเนอร์จิกในรูปแบบอื่นๆ ทั้งนี้ เพื่อเพิ่มทางเลือกให้แพทย์และบุคลากรด้านสุขภาพในการรักษาและบรรเทาอาการผิดปกติดังกล่าว

สารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป็นหนึ่งในเป้าหมายของการพัฒนายาและสารใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ทั้งนี้ จนถึงปัจจุบัน มีการรายงานการศึกษาสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ จำนวนไม่น้อย ตัวอย่างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE จากธรรมชาติสามารถตรวจสอบได้จากรายงานและบทความปริทรรศน์หลายฉบับ เช่น Houghton and Howes (2005), Viegas et al (2005) และ Elgorashi et al (2006) เป็นต้น

จากผลการศึกษาในระดับการคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มฟองน้ำและเพรียงหัวหอมซึ่งได้จากการสำรวจตัวอย่างในบริเวณรอบเกาะเต่า อ.เกาะพะงัน จ.สุราษฎร์ธานี ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากตัวอย่างฟองน้ำชนิดหนึ่งในสกุล *Corticium* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ AChE และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่ดี (สารสกัดความเข้มข้น 0.1 mg/mL ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 90% และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมากกว่า 90%) จากการศึกษาเพื่อแยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในตัวอย่างฟองน้ำดังกล่าว สามารถแยกสารในกลุ่มสเตอรอยดอลอัลคาลอยด์ได้ 1 ชนิด คือ 4-acetoxy plakinamine B (**1**)

1.2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

1.2.1. สภาวะการทดลองทั่วไป

ในกรณีที่ไม่มีข้อกำหนดอื่นใด ตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้เพื่อการทดลองตลอดการวิจัยนี้ เป็นตัวทำละลายและสารเคมีระดับเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade) และใช้ในการศึกษาโดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์

เพิ่มเติมใดๆ ส่วนตัวทำละลายที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีสมรรถภาพสูง (HPLC) เป็นตัวทำละลายในระดับเพื่อ HPLC ซึ่งกรองผ่านเมมเบรนขนาด 230 นาโนเมตร (Millipore) และกำจัดก๊าซโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงก่อนใช้งาน

สเปคโตรมิเตอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ประกอบด้วย; Jasco J-180 spectropolarimeter (ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สำหรับการวัดค่าองศาการหมุนระนาบแสงจำเพาะ; Spectronic Genesys 5 spectrophotometer (ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการวัดสเปคตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต-แสงธรรมชาติ (UV); Jasco IR-810 infrared spectrometer (ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการวัดสเปคตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR); Micromass LCT mass spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการตรวจวัดแมสสเปคตรัม (MS) ทั้งระดับความไวปกติและความไวสูง; FTNMR Varian Unity Inova 500 spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการตรวจวัด เอ็น เอ็ม อาร์ สเปคตรัม (NMR) โดยใช้สัญญาณของตัวทำละลายตามระบุเป็นสัญญาณอ้างอิง

การแยกสกัดโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจล (Scharlau®; ขนาดอนุภาค 230-400 mesh) หรือ เซฟาเด็กซ์ LH-20 (GE Healthcare®) เป็นวัฏภาคอยู่กับที่ปกติ ส่วนโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ทดลองโดยเครื่อง HPLC ของ Water® 600E multisolvent delivery system ประกอบกับ Water® 484 UV detector และ Rheodyne® 7125 injector port

1.2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ

ฟองน้ำสกุล *Corticium* (วงศ์ Plakinidae) ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เก็บสำรวจจากบริเวณรอบเกาะเต่า อ. เกาะพะงัน จ.สุราษฎร์ธานี (10° 07.6′ เหนือ 99° 48.7′ ตะวันออก) การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานดำเนินการโดย ดร.สมชัย บุศราวิช สถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ.ภูเก็ต ตัวอย่างอ้างอิง (PMBC 21360) เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์ของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ. ภูเก็ต

1.2.3. การแยกสกัด

ตัวอย่างฟองน้ำหลังทำให้แห้งโดยเทคนิคการแช่เยือกแข็งหนัก 260 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเธน และเมธานอล ตามลำดับ ผลจากการคัดกรองขั้นต้น นำไปสู่การคัดเลือกสารสกัดจากชั้นเมธานอลซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง AChE สูงสุดเพื่อการศึกษาขั้นต่อไป

การสกัดแยกประกอบด้วยการแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีต่างๆ ตามลำดับ ดังนี้; คอลัมน์ซิลิกาเจล (10% เมธานอลในเอธิลอะซีเตท); เซฟาเด็กซ์คอลัมน์ (MeOH); C-18 รีเวอร์เฟสคอลัมน์ (40% น้ำในอะซิโตไนไทรล์) และ โครมาโตกราฟีผิวบาง (เมธานอล:อะซีโทน:ไดคลอโรมีเธน 1.5:1:7.5) และสามารถแยกสารตัวอย่าง 1 ได้ 1 ชนิด (2.8 มิลลิกรัม)

4-Acetoxy-plakinamine B (1); $[\alpha]_D$ +21.9° (*c* 0.0014, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 242 (4.29) nm; IR (thin film) ν_{max} 3400, 2925, 1740, 1240 cm^{-1}; ^1H และ ^{13}C NMR (C_6D_6, 500 MHz สำหรับ ^1H) ดูตารางที่ 2; EIMS *m/z* (relative intensity) 508 [M^+] (63), 493 (10), 433 (10), 164 (36), 136 (41); HR-EIMS *m/z* 508.4001 (calcd for $C_{33}H_{52}N_2O_2$ 508.4029).

1.2.4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AChE ในการวิจัยนี้ ใช้การทดสอบโดย Microplate technique ตามวิธีการทดสอบที่รายงานใน Ingkaninan et al (2006) โดยใช้สารละลายต่างๆ ตามลำดับดังนี้ 5,5′-dithiobis[2-nitrobenzoic acid] (ความเข้มข้น 3 mM) 125 μL; acetylthiocholine iodide (ความเข้มข้น 1.5 mM) 25 μL; Tris-HCl buffer (pH 8.0 ความเข้มข้น 50 μM) 50 μL; สารละลายตัวอย่างใน Tris-HCl buffer ตามความเข้มข้นต่างๆ เพื่อการทดสอบ ปริมาตร 25 μL ต่อ 1 ความเข้มข้น; สารละลายเอนไซม์ AChE จากปลาไหลไฟฟ้า (0.28 U/mL; type VI-S, EC 3.1.1.7; Sigma®) 25 μL ตรวจวัดความเข้มการดูดกลืนแสงของสารละลายสีเหลืองที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรทุก 5 วินาทีเป็นเวลา 2 นาที คำนวณค่าการยับยั้งกิจกรรมและจลนศาสตร์ของเอนไซม์โดยใช้ Prism software และเทียบความแรงการออกฤทธิ์โดยใช้ galantamine เป็นตัวอย่างอ้างอิง

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทดสอบโดยใช้วิธี sulphorhodamine B assay (Skehan et al, 1990)และใช้เซลล์มะเร็งต่อไปนี้เป็นเซลล์เป้าหมาย; MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม), KB (เซลล์มะเร็งช่องปากและหลอดอาหารส่วนต้น), HeLa (เซลล์มะเร็งปากมดลูก) และ HT-29 (เซลล์มะเร็งลำไส้

ใหญ่) วิธีการทดสอบโดยย่อประกอบด้วยการเตรียมตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงในรูปเซลล์เพาะเลี้ยงที่เรียงตัวแถวเดี่ยวในถาดหลุมขนาด 96 หลุม (จำนวนเซลล์ต่อหลุมประมาณ 2×10^3 เซลล์) เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในตัวกลางเพาะเลี้ยงตามอ้างถึงในเอกสารอ้างอิง ให้เซลล์ได้สัมผัสสารตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ล้างตัวกลางที่มีสารละลายตัวอย่างออกและเปลี่ยนเป็นตัวกลางใหม่ เพาะเลี้ยงเซลล์เป้าหมายต่ออีก 72 ชั่วโมง ตรึงเซลล์ด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติก และย้อมสีเซลล์ด้วยสารละลาย sulphorhodamine B ชะสีส่วนที่ติดเซลล์ให้อยู่ในรูปสารละลายและวัดความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร แปลผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์จากค่าความเข้มในการดูดกลืนแสงและรายงานผลในรูป IC_{50} โดยใช้ camptothecin เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง

1.3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยในระดับนำร่องซึ่งผู้วิจัยได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อคัดกรองสารสกัดจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล (เน้นสัตว์ทะเลในกลุ่มฟองน้ำและเพรียงหัวหอม) และได้คัดเลือกสารสกัดจากฟองน้ำชนิดหนึ่งในสกุล *Corticium* เพื่อแยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ผู้วิจัยสามารถแยกสกัดสารในกลุ่มสเตอรอยดอลอัลคาลอยด์ได้ 1 ชนิด ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างเป็นดังต่อไปนี้

1.3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

เมื่อใช้การทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง AChE ติดตามกระบวนการแยกสกัดสารเคมีจากฟองน้ำ *Corticium* โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีในการแยกสกัด สามารถแยกสารตัวอย่างได้ 1 ชนิด มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว (น้ำหนักสารตัวอย่างที่แยกได้ 2.8 มิลลิกรัม)

ในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของตัวอย่าง สามารถสังเกตสัญญาณโมเลกุลที่ *m/z* 508 [M^+] จากแมสสเปคตรัมในเทคนิคอิเล็กตรอนอิมแพคท์ เมื่อประกอบกับการวิเคราะห์ NMR สเปคตรัม (สัญญาณคาร์บอน 33 อะตอมและโปรตอน 51 อะตอม) และจาก MS ความแม่นยำสูง (*m/z* 508.4001) ทำให้สามารถเสนอสูตรโมเลกุลเป็น $C_{33}H_{52}N_2O_2$ (ผลคำนวณมวลโมเลกุลเป็น 508.4029) มีค่าสมมูลพันธะคู่เป็น 9 สัมพันธ์กับจำนวนพันธะคู่ 3 พันธะ หมู่คาร์บอนิล 1 พันธะ และจำนวนวงแหวน 5 วง ทั้งนี้ หมู่คาร์บอนิลข้างต้น คาดว่าเป็นหมู่เอสเทอร์ จากที่สามารถสังเกตเห็นสัญญาณใน IR สเปคตรัมที่ 1740 cm^{-1} นอกจากนั้น ยังสามารถสังเกตเห็นการดูดกลืนแสงของหมู่เอมีนปฐมภูมิได้อีก 1 หมู่ที่ 3400 cm^{-1} ด้วย

สเปคตรัม NMR ของสารตัวอย่าง **1** (ตารางที่ 2, 500 MHz สำหรับ ^1H, C_6D_6) เป็นสเปคตรัมที่มีลักษณะทั่วไปของสารประกอบสเตอรอยด์ ซึ่งสังเกตได้จากค่าเคมิคัลชิฟต์เฉพาะตัวของหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง 18 และ 19 (δ_H 0.64, s, H-18; 1.14, s, H-19; δ_C 12.3, C-18; 15.1, C-19) ร่วมกับสัญญาณของโปรตอนบนคาร์บอนแบบเมธิลีน ซึ่งรวมตัวอยู่ในช่วง 1.0 – 1.5 ppm ของสเปคตรัม ^1H NMR

สัญญาณของหมู่ฟังก์ชั่นที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของสาร **1** ประกอบด้วยสัญญาณโปรตอนของหมู่โอเลฟินแบบ *E* ที่ δ 5.49 (dd, J = 15.3, 8.9 Hz, H-22) และ 6.54 (d, J = 15.3 Hz, H-23) เมื่อประกอบกับข้อมูลจากการทดลอง HMBC และ $^1H,^1H$-COSY ทำให้สามารถสร้างส่วนของสูตรโครงสร้างส่วนของ 4-(1,3-dimethyl)-3,4-didehydropiperidinyl ซึ่งต่ออยู่บนคาร์บอนตำแหน่ง 20 ของโครงสร้างแกนแบบสเตอรอยด์ โดยมีหมู่เมธิลตำแหน่ง 21 ซึ่งสามารถสังเกตสัญญาณโปรตอนได้ที่ δ 1.14 (d, J = 5.8 Hz) ที่ต่ออยู่บนคาร์บอนตำแหน่ง 20 นี้เช่นกัน

หมู่ฟังก์ชั่นที่สำคัญอีก 2 หมู่ที่สังเกตได้จากสเปคตรัม ^1H NMR คือสัญญาณของหมู่แทนที่บนคาร์บอนตำแหน่ง 3 และ 4 ทั้งนี้ สำหรับตำแหน่งที่ 3 สัญญาณหลักประกอบด้วยสัญญาณที่ δ 2.62 (br d, J = 2.6 Hz) และที่ δ 2.19 (s) ซึ่งประกอบกันเป็นสัญญาณของหมู่เมธิลอะมิโน ส่วนสัญญาณบนตำแหน่ง 4 ประกอบด้วยสัญญาณที่ δ 5.07 (br s) และ 1.71 (s) ซึ่งเมื่อรวมกับการแปลผลจากสเปคตรัม HMBC ทำให้สามารถประกอบโครงสร้างส่วนของหมู่อะเซทอกซีซึ่งแทนที่บนคาร์บอนตำแหน่ง 4 ได้

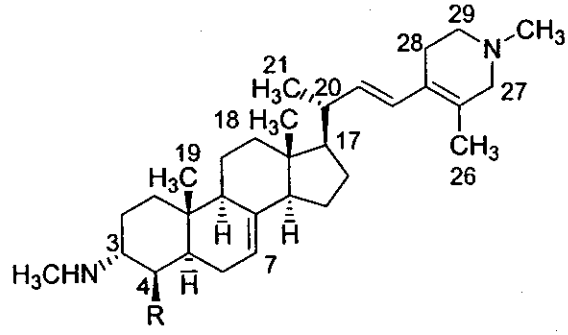
การแปลผลของส่วนโครงสร้างแกนตำแหน่งอื่นๆ ใช้การแปลข้อมูลจากสเปคตรัม $^1H,^1H$-COSY และ HMBC ซึ่งให้ได้โครงสร้างของสเตอรอยด์ที่มีแกนเป็นแบบ stigmastane และนำไปสู่ข้อสรุปว่าสูตรโครงสร้างของสาร **1** เป็นสเตอรอยดอลอัลคาลอยด์แบบ stigmastane ที่มีไนโตรเจนแทนที่ที่ตำแหน่ง 3 และ 28 และมีหมู่อะเซทอกซีแทนที่ที่ตำแหน่ง 4 ซึ่งถือเป็นโครงสร้างของสารสมาชิกใหม่ของสเตอรอยดอลอัลคาลอยด์กลุ่ม plakinamine ชื่อ 4-acetoxy-plakinamine B ตามที่แสดง (สรุปค่าเคมิคัลชิฟต์จากสเปคตรัม NMR ของสารตัวอย่าง 1 แสดงตามตาราง 2)

ตารางที่ 2. ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **1** (C_6D_6; 500 MHz สำหรับโปรตอน)[ก]

position	^{1}H (mult., *J* in Hz)	^{13}C (mult)	position	^{1}H (mult., *J* in Hz)	^{13}C (mult)
1	1.44 (m; 2H)	32.1 (CH_2)	18	0.64 (s; 3H)	12.3 (CH_3)
2	1.32 (m; 2H)	28.7 (CH_2)	19	1.14 (s; 3H)	15.1 (CH_3)
3	2.62 (br d, 2.6)	58.0 (CH)	20	2.18 (m)	41.6 (CH)
4	5.07 (br s)	74.0 (CH)	21	1.14 (d, 5.8; 3H)	21.3 (CH_3)
5	1.20 (m)	38.9 (CH)	22	5.49 (dd, 15.3, 8.9)	134.6 (CH)
6	1.72 (m); 2.12 (m)	25.8 (CH_2)	23	6.54 (d, 15.3)	125.6 (CH)
7	5.29 (br s)	118.4 (CH)	24	-	126.3 (C)
8	-	139.6 (C)	25	-	127.5 (C)
9	1.74 (m)	50.8 (CH)	26	1.61 (s; 3H)	16.4 (CH_3)
10	-	34.5 (C)	27	2.75 (br s; 2H)	60.7 (CH_2)
11	1.50 (m); 1.86 (m)	23.3 (CH_2)	28	2.37 (br s; 2H)	27.0 (CH_2)
12	1.97 (m; 2H)	39.7 (CH_2)	29	2.41 (m); 2.44 (m)	52.6 (CH_2)
13	-	43.6 (C)	*N*-CH_3-3	2.19 (s; 3H)	45.7 (CH_3)
14	1.81 (m)	55.4 (CH)	*N*-CH_3-27	2.25 (s; 3H)	34.9 (CH_3)
15[ข]	1.39 (m; 2H)	22.5 (CH_2)	$COCH_3$-4	-	169.6 (C)
16[ข]	1.50 (m; 2H)	21.3 (CH_2)	$COCH_3$-4	1.71 (s; 3H)	20.8 (CH_3)
17	1.25 (m)	56.2 (CH)			

หมายเหตุ [ก] หากไม่มีการระบุอื่นใด สัญญาณตามที่แสดงเป็นสัญญาณที่เทียบเท่ากับ 1 โปรตอนหรือ 1 คาร์บอนตามกำหนด

[ข] ค่าเคมิคัลชิฟต์อาจสลับกัน



1 ; R = $OCOCH_3$

2 ; R = H

เนื่องจากปริมาณของสารตัวอย่างที่แยกได้มีน้อยเกินกว่าที่จะสามารถวิเคราะห์สเตอริโอเคมีแบบสัมบูรณ์ได้ การเสนอคอนฟิกิวเรชั่นของสาร **1** ตามที่แสดงข้างล่างเป็นเพียงการเปรียบเทียบกับข้อมูลจากอนุพันธ์ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน และเสนอเป็นคอนฟิกิวเรชั่นแบบสัมพัทธ์ ทั้งนี้ ในส่วนโครงสร้างแกนสเตอรอยด์ ค่าเคมีคัลชิฟต์ของคาร์บอนตำแหน่ง 18 และ 19 (δ 12.3 และ 15.1 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างแกนนี้เป็นวงแหวนสเตอรอยด์ที่ต่อกันแบบ *trans* ตลอดทั้งโครงสร้าง ส่วนหมู่แทนที่บนตำแหน่ง 3 และ 4 วางตัวในตำแหน่ง axial จากค่าคงที่คัปปลิงของโปรตอนที่มีค่าน้อยกว่า 10 Hz ทั้ง 2 ตำแหน่ง การเสนอคอนฟิกิวเรชั่นในตำแหน่งที่เหลือเมื่อเทียบกับค่าเคมิคัลชิฟต์ของ plakinamine B (**2**; Rosser and Faulkner, 1984) คาดว่า สารทั้ง 2 ชนิดมีคอนฟิกิวเรชั่นสัมพัทธ์ที่ตรงกัน

1.3.2. ฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ของสาร **1** สามารถวิเคราะห์ค่า IC_{50} ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของสาร **1** ได้แก่ค่า V_{max} และ K_m ได้ตามที่แสดงในตารางที่ 3

ผลของสาร **1** ต่อการทำงานของเอนไซม์ AChE เป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่ขึ้นกับเวลา (ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์คงที่เมื่อเวลาผ่านไปนานกว่า 60 นาที) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สาร **1** ยับยั้งเอนไซม์แบบผันกลับได้ และเมื่อวิเคราะห์จลนศาสตร์ของเอนไซม์โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้ง พบว่า ค่า V_{max} ของเอนไซม์ลดลงในขณะที่ค่า K_m เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของสาร **1** (ตารางที่ 3) แสดงว่าสารตัวอย่างยับยั้งเอนไซม์ด้วยกลไกการแย่งจับแบบผสม (mixed-competitive inhibition; ผลการยับยั้งร่วมกันระหว่าง non-competitive และ competitive inhibition)

ตารางที่ 3. ฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ของสาร 1

จลนศาสตร์การยับยั้ง AChE	V_{max} (dmA.min^{-1})	K_m (μM)	IC_{50} (μM)
เมื่อไม่มีสารยับยั้งเอนไซม์	107.9±4.0	750.0±173.5	-
เมื่อมีสาร 1	47.8±0.3[n]	3678.0±419.2[n]	3.75±1.69
เมื่อมี galantamine	-	-	0.59±0.14

หมายเหตุ [n] เมื่อเพิ่มสาร 1 เป็น 7.0 μM

สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบพบว่า สารตัวอย่างมีค่าเสมือนไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้เป็นเป้าหมายในการทดสอบ (ค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ต่ำกว่า 50% ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษา)

ตอนที่ 2

อนุพันธ์สเตอรอยด์เปอร์ออกไซด์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียจากฟองน้ำในสกุล *Ciocalapata*

2.1. บทนำ

มาลาเรียเป็นหนึ่งในโรคติดต่อเขตร้อนที่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขของประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกรณีของประเทศไทย ซึ่งเชื้อก่อโรคอันได้แก่ *Plasmodium falciparum* ที่พบชุกชุมในประเทศเป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่มีรายงานการดื้อยาสูงสุด ซึ่งทำให้การป้องกันและการรักษาโรคเป็นไปได้อย่างลำบาก ทั้งนี้ ในปัจจุบัน ยาต้านมาลาเรียที่ใช้ในประเทศมี 2 กลุ่ม หลัก ได้แก่ ยาในกลุ่ม quinoline เช่น choloroquine และอนุพันธ์ และยากลุ่ม artimisinin และอนุพันธ์ อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่เกิดจากการดื้อยาของเชื้อมาลาเรียตามที่ระบุข้างต้น ซึ่งโดยมากเป็นผลที่เกิดจากการดื้อยาในกลุ่มอนุพันธ์ของ chloroquine ทำให้การคัดเลือกยาโดยบุคลากรทางการแพทย์เพื่อใช้ในการรักษามีข้อจำกัด และยังทำให้การกำหนดแผนการป้องกันโรคทำได้ยากยิ่งขึ้นด้วย (WHO, 2005; WHO, 2006)

อนุพันธ์กลุ่ม artimisinin ถือได้ว่าเป็นหนึ่งในตัวอย่างของยาที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดีในการก้าวขึ้นมาจากการใช้ยาตามภูมิปัญญาของแพทย์แผนตะวันออก จนกระทั่งเปลี่ยนมาเป็นยาที่ใช้ในทางคลินิกอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้ แหล่งที่มาและต้นกำเนิดของยาในกลุ่ม artimisinin ได้จากพืชสมุนไพรจีน คือ Qinghausu (*Artimisia annua*) และในปัจจุบัน อนุพันธ์ของ artimisinin หลายชนิดซึ่งได้รับการพัฒนาและดัดแปลงสูตรโครงสร้างเพื่อปรับปรุงการออกฤทธิ์ รวมถึงเพื่อปรับปรุงรูปแบบการใช้ยาได้อย่างเหมาะสม ได้ผ่านการรับรองให้ใช้ในทางคลินิกอย่างแพร่หลาย

ประเด็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับอนุพันธ์ artimisinin นอกเหนือจากประวัติในการพัฒนายาดังกล่าว ยังรวมไปถึงกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งถือได้ว่าเป็นกลไกการออกฤทธิ์ใหม่ที่ทำให้อนุพันธ์กลุ่ม artimisinin ยังคงเป็นยาต้านมาลาเรียที่ใช้ได้ผลในระดับดี มีปัญหาที่เกิดจากการดื้อยาของเชื้อพลาสโมเดียมน้อย และยังเป็นยาตัวเลือกหลักในกรณีของการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อพลาสโมเดียมในสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ chloroquine ได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ กลไกการออกฤทธิ์ของ artimisinin และอนุพันธ์เกิดผ่านการออกฤทธิ์เป็นตัวออกซิไดซ์ของหมู่ฟังก์ชั่นแบบเปอร์ออกไซด์ ซึ่งทำให้สามารถออกซิไดซ์อะตอมของเฟอร์รัสอันเป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดให้อยู่ในสภาพที่เป็นพิษต่อเชื้อได้ ทั้งนี้ กลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าว เป็นกลไกที่จำเพาะเจาะจงอย่างยิ่งต่อเชื้อพลาสโมเดียม แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเม็ดเลือดในมนุษย์ ซึ่งทำให้ยามี

ความเป็นพิษต่ำ และเนื่องจากยาออกฤทธิ์ต่อฮีโมโกลบิน อันเป็นแหล่งพลังงานหลักของเชื้อในระยะที่มีกิจกรรมสูงขณะที่อยู่ในเม็ดเลือด จึงทำให้ยาในกลุ่มนี้เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อออกจากร่างกายผู้ป่วย

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีการรายงานการค้นพบสารที่มีหมู่ฟังก์ชั่นแบบเปอร์ออกไซด์ โดยเฉพาะสารประกอบเทอร์ปีนอยด์และสเตอรอยด์ที่มีหมู่ฟังก์ชั่นแบบเปอร์ออกไซด์ในสัดส่วนที่สูง ตัวอย่างเช่น mycaperoxides จากฟองน้ำในสกุล *Mycale* ซึ่งเป็นอนุพันธ์ไดเทอร์ปีนที่มีรายงานฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับดี อนุพันธ์เปอร์ออกไซด์เหล่านี้ เป็นเป้าหมายที่ดีในการเป็นตัวอย่างในการศึกษาและพัฒนาสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล เพื่อนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาผลของสูตรโครงสร้าง โดยเฉพาะส่วนของหมู่เปอร์ออกไซด์ที่พบในสารตัวอย่างประเภทอื่นๆ นอกเหนือจาก artimisinin ว่าสารเหล่านี้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในรูปแบบและกลไกเช่นเดียวกันหรือไม่

จากการสำรวจตัวอย่างฟองน้ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลจากบริเวณรอบเกาะเต่า อ.เกาะพะงัน จ.สุราษฎร์ธานี ผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบด้วยเมธานอลจากฟองน้ำในสกุล *Ciocalapata* มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อพลาสโมเดียมไดในระดับดีมาก จึงได้คัดเลือกตัวอย่างฟองน้ำดังกล่าวมาศึกษาวิจัยเพื่อแยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำดังกล่าว ผลจากการแยกสกัด สามารถแยกสารในกลุ่มสเตอรอยด์เปอร์ออกไซด์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ได้ 2 ชนิด คือ 5,9-*epi*-Dioxyergostan-3,8,17-triol (**2**) และ *epi*-ergosterol 5,8-peroxide (**3**) โดยสารตัวอย่าง **2** เป็นสารชนิดใหม่ที่แยกสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็นครั้งแรกในการวิจัยนี้ ส่วนสารตัวอย่าง **3** เป็นสารที่เคยมีการรายงานมาก่อนแล้ว แต่ยังไม่เคยมีการรายงานฤทธิ์ต้านมาลาเรียมาก่อน

2.2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

2.2.1. สภาวะการทดลองทั่วไป

สภาวะการทดลองทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาวิจัยตามโครงการส่วนนี้ ทั้งในส่วนสารเคมีและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เป็นไปตามที่ได้ระบุมาแล้วในตอนที่ 1 ข้างต้น

2.2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ

ฟองน้ำสกุล *Ciocalapata* (วงศ์ Halichondridae) ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เก็บสำรวจจากบริเวณรอบเกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี (10° 07.6′ เหนือ 99° 48.7′ ตะวันออก) การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน

ดำเนินการโดย ดร.สมชัย บุศราวิช สถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ.ภูเก็ต ตัวอย่างอ้างอิง (PMBC 24607) เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์ของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ. ภูเก็ต

2.2.3. การแยกสกัด

ขั้นตอนการแยกสกัดขั้นต้นในการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำ *Ciocalapata* เป็นไปตามที่ได้ระบุในการแยกสกัดสารจากตัวอย่างฟองน้ำ *Corticium* ในตอนที่ 1 ตัวอย่างฟองน้ำหลังจากทำแห้งโดยเทคนิคการแช่เยือกแข็ง หนัก 280 กรัม ให้สารสกัดตัวอย่างจากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเธน และเมธานอล หนัก 6.8 กรัม 6.2 กรัม และ 63 กรัม ตามลำดับ

การแยกสกัดสารสกัดจากตัวทำละลายเฮกเซนซึ่งเป็นสารสกัดที่มีความแรงในการออกฤทธิ์ต้านมาลาเรียสูงสุด ประกอบด้วยการแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีต่างๆ ตามลำดับ ดังนี้; คอลัมน์ซิลิกาเจล (ตัวทำละลายเฮกเซน 100% และปรับความเป็นขั้วโดยเพิ่มอัตราส่วนไดคลอโรมีเธนและเมธานอล จนเป็นตัวทำละลายเมธานอล 50% ในไดคลอโรมีเธน); เซฟาเด็กซ์ LH20 คอลัมน์ (50% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน); คอลัมน์ซิลิกาเจล (50% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน); คอลัมน์ซิลิกาเจล (เฮกเซน:เอธิลอะซีเตต:เตตราไฮโดรฟิวแรน 8:2:1); C-18 รีเวอร์สเฟสคอลัมน์ (2% น้ำในอะซิโตไนไทรล์) และสามารถแยกสารตัวอย่าง **2** และ **3** ได้ในปริมาณ 3 และ 4 มิลลิกรัม ตามลำดับ

5,9-*epi*-Dioxyergostan-3,8,17-triol (2); $[\alpha]_D$ +15° (*c* 0.04, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 244 (2.86) nm; IR (thin film) ν_{max} 3450, 2975, 1460 cm^{-1}; ^1H และ ^{13}C NMR (C_6D_6, 500 MHz สำหรับ ^1H) ดูตารางที่ 4; ESIMS *m/z* (relative intensity) 442 $[M\text{-}H_2O]^+$ (100); HR-ESIMS *m/z* 442.3085 (calcd for $C_{28}H_{42}O_4$ 442.3083).

5,8-epi-Dioxyergosterol (3); $[\alpha]_D$ -16° (*c* 0.12, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 244 (2.68) nm; IR (thin film) ν_{max} 3500, 2975 cm^{-1}; ^1H และ ^{13}C NMR (C_6D_6, 500 MHz สำหรับ ^1H) ดูตารางที่ 5; ESIMS *m/z* (relative intensity) 442 $[M^+]$ (100).

2.2.6. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเป็นเช่นเดียวกับที่ระบุในตอนที่ 1

การทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ดำเนินการโดยขอใช้บริการจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยกลาง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งทดสอบโดยใช้หลักการติดตามความสามารถในการใช้ hypoxanthine ของเชื้อและใช้เทคนิคกัมมันตรังสีในการตรวจวัด วิธีการทดสอบโดยย่อเป็นดังนี้; เชื้อมาลาเรียที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อ *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ K1 เพาะเลี้ยงโดยใช้เม็ดเลือดแดงจากเลือดหมู่ A-บวก (5% hematocrit) และรักษาสภาพในตัวกลาง RPMI 1640 ที่มีพลาสมาจากเลือดหมู่ A-บวก (หยุดกิจกรรมในพลาสมาด้วยความร้อน) ความเข้มข้น 10%; สารละลาย HEPES 20 mM; และ 2 mM glutamine; เตรียมสารละลายตัวอย่างในตัวทำละลาย DMSO (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ไม่เกิน 1%) กระจายให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการในตัวกลางเลี้ยงเชื้อตามระบุข้างต้น เจือจางสารละลายตัวอย่างนี้ลงครั้งละเท่าตัว จนได้สารละลายตัวอย่างรวม 10 ความเข้มข้น (ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ 10 μg/mL) เพาะเชื้อ *Plasmodium falciparum* ตามระบุข้างต้นลงในสารละลายตัวอย่างทดสอบทุกความเข้มข้น (ระดับการติดเชื้อในเม็ดเลือดแดงที่ 1-1.5% parasitaemia, 1% hematocrit ในสารละลายสุดท้าย) และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศ hypoxia (5% O_2 และ 5% CO_2) นาน 72 ชั่วโมง ติดตามการอยู่รอดของเชื้อผ่านการตรวจสอบอัตราการใช้ hypoxanthine ของเชื้อโดยตรวจวัด [G-^{3}H]hypoxanthine ที่หายไปด้วยเทคนิคการตรวจกัมมันตรังสีของตริเตรียม และเปรียบเทียบความแรงในการออกฤทธิ์โดยเทียบกับสารมาตรฐาน dihydroartimisinin (IC_{50} 3.8 nM) (Desjardins et al, 1979)

2.3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยในระดับนำร่อง ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดหยาบด้วยเมธานอลจากฟองน้ำชนิดหนึ่งซึ่งเก็บสำรวจได้จากบริเวณรอบเกาะเต่า อ.เกาะพะงัน จ.สุราษฎร์ธานี มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ได้ในระดับดี ผลการศึกษาวิจัย พบว่าตัวอย่างฟองน้ำดังกล่าวอยู่ในสกุล *Ciocalapata* ซึ่งเป็นกลุ่มของฟองน้ำที่ยังมีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีไม่มากนัก จึงได้คัดเลือกตัวอย่างฟองน้ำดังกล่าวมาศึกษาวิจัยเพื่อแยกสกัดองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีร่วมกับการติดตามผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรีย ซึ่งทำให้สามารถแยกสกัดอนุพันธ์ในกลุ่มสเตอรอยดอลเปอร์ออกไซด์ที่มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียได้ 2 ชนิด สรุปผลการแยกสกัด การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมี และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด เป็นดังต่อไปนี้

2.3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

จากการแยกสกัดสารสกัดหยาบจากตัวอย่างฟองน้ำ *Ciocalapata* sp. โดยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเธน และเมธานอล พบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในระดับดี (IC_{50} 0.05 μg/mL) และเมื่อนำสารสกัดหยาบดังกล่าวมาแยกสกัดโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี สามารถแยกสารตัวอย่างได้ 2 ชนิด ได้แก่ สารตัวอย่าง **2** และ **3** น้ำหนักสารตัวอย่างที่สกัดได้ 3 และ 4 มิลลิกรัม ตามลำดับ

สารตัวอย่าง **2** มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{28}H_{44}O_5$ โดยประเมินได้จากสัญญาณโมเลกุลเสมือนในแมสสเปคตรัม (อิเล็กตรอนอิมแพคท์) ที่ *m/z* 442 ($[M-H_2O]^+$; $C_{28}H_{42}O_4$) ทั้งนี้ การวิเคราะห์มวลจากแมสสเปคตรัมความแม่นยำสูงในเทคนิคอิเล็กตอนอิมแพคท์ที่ *m/z* 442.3085 (ค่าคำนวณสำหรับมวลของ $C_{28}H_{42}O_4$ เป็น 442.3083) ให้ผลการวิเคราะห์สูตรโมเลกุลตรงตามที่เสนอข้างต้น และทำให้สามารถคำนวณค่าสมมูลพันธะคู่ของสารตัวอย่างได้เป็น 7 ทั้งนี้ จากการวิเคราะห์สัญญาณในเปคตรัม ^{13}C NMR สามารถระบุได้ว่าสารตัวอย่างมีพันธะคู่เพียง 2 พันธะ และสามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างมีระบบวงแหวนรวมทั้งสิ้น 5 วง

นอกเหนือจากสัญญาณในสเปคตรัม IR ที่แถบการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 3450 cm^{-1} ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซิลแล้ว สารตัวอย่างไม่มีหมู่แทนที่ที่สามารถสังเกตเห็นได้โดยตรงจากสเปคตรัมดังกล่าว ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการประเมินสัญญาณในสเปคตรัม NMR ทั้งจาก ^1H และ ^{13}CNMR ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่าง **2** น่าจะเป็นสารประกอบในกลุ่มสเตอรอยด์ จากการตรวจพบสัญญาณของหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง 18 และ 19 ที่ δ_H 0.93 และ 1.06 และที่ δ_C 15.8 และ 15.6 ตามลำดับ ร่วมกับสัญญาณของหมู่เมธิลีนจำนวนมากซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของโครงสร้างแกนแบบสเตอรอยด์ ในช่วง 1.5-2.3 ppm ของสเปคตรัม ^1H NMR

สัญญาณของหมู่ฟังก์ชั่นพื้นฐานของสารประกอบสเตอรอยด์ของสารตัวอย่าง **2** ที่สามารถตรวจพบในสเปคตรัม ^1H NMR ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 3 และหมู่โอเลฟินที่ตำแหน่ง 6 และ 7 โดยสามารถสังเกตสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซิลได้จากสัญญาณที่ δ 3.82 (br tt; J = 11.0, 5.0 Hz; H-3) ในสเปคตรัม ^1H NMR และที่ δ 65.9 (C-3) ในสเปคตรัม ^{13}C NMR และสัญญาณของหมู่โอเลฟินที่ δ 5.45 (d, J

= 9.6 Hz; H-7) และ 5.60 (d, J = 9.6 Hz; H-6) ในสเปคตรัม ^{1}H NMR และที่ δ 128.9 (C-7) และ 135.9 (C-6) ในสเปคตรัม ^{13}C NMR ตามลำดับ

การติดตามการคัปปลิงของสัญญาณในสเปคตรัม HMBC จากตำแหน่ง 3, 6 และ 7 ทำให้สามารถระบุตำแหน่งของสัญญาณของคาร์บอนและโปรตอนที่ตำแหน่ง 4, 5, 8 และ 9 ได้ โดยคาร์บอนของทั้ง 4 ตำแหน่งเรโซเนตที่ δ 36.1, 85.5, 64.1 และ 86.6 ตามลำดับ ประเด็นที่น่าสนใจคือ ค่าเคมิคัลชิฟต์ของสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 9 ซึ่งตรวจพบที่ 85.5 และ 86.6 ppm อันเป็นค่าเคมิคัลชิฟต์เฉพาะตัวของหมู่แทนที่แบบเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเรโซเนตในสนามต่ำกว่าสัญญาณของคาร์บอนที่ต่อกับออกซิเจนของหมู่ไฮดรอกซิลและอีเธอร์ไม่น้อยกว่า 5-10 ppm (เช่น เมื่อเทียบกับสัญญาณของคาร์บอนที่ตำแหน่ง 3, 8 และ 14 ที่ δ 65.9, 64.1 และ 74.8 ตามลำดับ) สืบเนื่องมาจากอิทธิพลของออกซิเจนที่มีความหนาแน่นอิเล็กตรอนต่ำ (positive oxygen) ของหมู่เปอร์ออกไซด์ ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า สารตัวอย่าง **2** น่าจะเป็นสารประกอบที่มีวงแหวนแบบไดออกซีแทนที่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 9 ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ข้อมูลจากค่าสมมูลพันธะคู่ที่ระบุว่าสารตัวอย่างต้องมีระบบวงแหวน 5 วง และมากกว่าระบบวงแหวนของสารประกอบสเตอรอยด์ทั่วไป

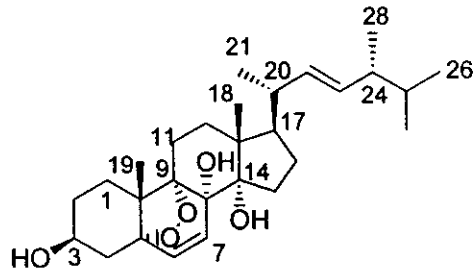
นอกเหนือจากหมู่แทนที่ที่ระบุข้างต้น ข้อมูลจากสเปคตรัม NMR ระบุว่า สารตัวอย่าง **2** มีหมู่แทนที่อื่น อีก 3 หมู่ ได้แก่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 8 และ 14 ซึ่งเป็นตำแหน่งของอัลกอฮอล์ตติยภูมิ (δ 64.1 และ 74.8 ตามลำดับ) และหมู่โอเลฟินที่ตำแหน่ง 22 และ 23 (δ 5.05, dd, J = 15.1, 8.7 Hz; และ 5.20, dd, J = 15.1, 7.8 Hz, ตามลำดับ) สำหรับการแทนที่ของหมู่เมธิลบนหมู่อัลคิลตอนปลายของสเตอรอยด์พบว่า การแทนที่ของหมู่เมธิลที่ด้านปลายของสารตัวอย่าง 2 เป็นลักษณะเฉพาะของโครงสร้างแกนแบบ ergostane โดยมีหมู่เมธิลแทนที่ด้านปลายรวม 4 หมู่ ได้แก่หมู่เมธิลที่ δ 0.87 (d, J = 6.9 Hz; H-27), 0.89 (d, J = 6.9 Hz; H-26), 0.93 (d, J = 6.9 Hz; H-21) และ 0.97 (d, J = 6.8 Hz; H-28) ตามลำดับ การประกอบหมู่แทนที่ตามระบุข้างต้นเข้ากับโครงสร้างแกนของสเตอรอยด์ และการกำหนดค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนบนโครงสร้างแกนของสเตอรอยด์ในตำแหน่งอื่นๆ อาศัยการแปลผลจากสเปคตรัม COSY และ HMBC เป็นหลัก และทำให้สามารถยืนยันข้อเสนอสูตรโครงสร้างของสารตัวอย่าง 2 ได้ว่าสารตัวอย่างดังกล่าวคือ 5,9-*epi*-dioxyergostan-3,8,14-triol และเป็นอนุพันธ์ของ ergosterol ชนิดใหม่ ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือ มีหมู่ไดออกซีแทนที่เป็นวงแหวนสะพานที่ตำแหน่ง 5 และ 9 และมีหมู่ไฮดรอกซิลแทนที่รวม 3 หมู่ ซึ่งมากกว่าสารประกอบสเตอรอยด์ทั่วไป (ข้อมูลสเปคตรัม NMR ของสารตัวอย่าง 2 สรุปในตารางที่ 4)

สำนักหอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4. ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **2** (C_6D_6; 500 MHz สำหรับโปรตอน)[n]

position	^{1}H (mult; *J* in Hz)	^{13}C (mult)
1	1.04 (br dt; 13.2, 3.2); 1.92 (br td; 13.2, 3.2)	27.9 (CH_2)
2	1.25 (m); 1.62 (m)	31.2 (CH_2)
3	3.82 (br tt; 11.0, 5.0)	65.9 (CH)
4	1.34 (m); 1.98 (ddd; 14.2, 5.0, 1.2)	36.1 (CH_2)
5	-	85.5 (C)
6	5.60 (d; 9.6)	135.9 (CH)
7	5.45 (d; 9.6)	128.9 (CH)
8	-	64.1 (C)
9	-	86.6 (C)
10	-	50.5 (C)
11	1.42 (m); 1.64 (m)	20.1 (CH_2)
12	1.40 (m); 1.62 (m)	33.8 (CH_2)
13	-	40.4 (C)
14	-	74.8 (C)
15	1.80 (m); 1.28 (m)	27.6 (CH_2)
16	1.50 (m); 1.58 (m)	26.6 (CH_2)
17	1.32 (m)	55.5 (CH)
18	0.93 (s; 3H)	15.8 (CH_3)
19	1.06 (s; 3H)	15.6 (CH_3)
20	2.02 (br q; 8.2)	39.6 (CH)
21	0.93 (d; 6.9, 3H)	21.1 (CH_3)
22	5.05 (dd; 15.1, 8.7)	135.4 (CH)
23	5.20 (dd; 15.1, 7.8)	132.6 (CH)
24	1.87 (m)	43.1 (CH)
25	1.47 (m)	33.3 (CH)
26	0.89 (d; 6.9, 3H)	19.9 (CH_3)
27	0.87 (d; 6.9, 3H)	20.2 (CH_3)
28	0.97 (d; 6.8, 3H)	17.8 (CH_3)

หมายเหตุ [n] หากไม่มีการระบุอื่นใด สัญญาณที่แสดงเทียบเท่ากับ 1 โปรตอนหรือ 1 คาร์บอนตามกำหนด



2

การศึกษาคอนฟิกิวเรชั่นของสารตัวอย่าง **2** ประกอบด้วยการวิเคราะห์คอนฟิวเรชั่นสัมพัทธ์ของโครงสร้างแกนสเตอรอยด์ และการวิเคราะห์ตำแหน่งการวางตัวของสะพานวงแหวนไดออกซี ทั้งนี้ ในกรณีของคอนฟิกิวเรชั่นสัมพัทธ์ของโครงสร้างแกนสเตอรอยด์ อาศัยการวิเคราะห์ค่าเคมิคัลชิฟต์ของหมู่เมธิล (C-18 และ C-19) ทั้งนี้ ค่าเคมิคัลชิฟต์ของคาร์บอนทั้ง 2 ตำแหน่งเป็นค่าเคมิคัลชิฟต์เฉพาะตัวของหมู่เมธิลในตำแหน่งแอกเซียลบนวงแหวนสเตอรอยด์ (δ 15.6, C-19 และ δ 15.9, C-18; ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในส่วนการวิเคราะห์คอนฟิกิวเรชั่นของสารตัวอย่าง **1** ในรายงานตอนที่ 1) คอนฟิกิวเรชั่นของวงแหวนสเตอรอยด์ที่เป็นไปได้เพื่อให้หมู่แทนที่ทั้ง 2 ตำแหน่งวางอยู่ในตำแหน่งแอกเซียลจึงควรเป็นแบบ *trans* ต่อเนื่องกันทั้ง 4 วง นอกจากนั้น เพื่อให้การเรียงตัวของวงแหวนสเตอรอยด์แบบ *trans* ในทุกตำแหน่งสามารถเป็นไปได้ การวางตัวของหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 8 และ 14 จะต้องเป็นแบบแบบแอกเซียลเช่นเดียวกับหมู่เมธิลทั้ง 2 หมู่ที่ได้วิเคราะห์แล้วข้างต้น

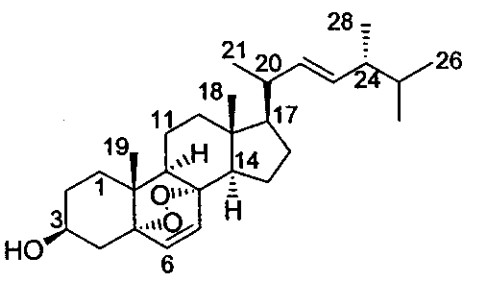
สำหรับการวิเคราะห์คอนฟิวเรชั่นของหมู่ไดออกซี อาศัยการวิเคราะห์สเปคตรัมผลต่างจากการทดลองแบบ NOE-DS ซึ่งช่วยให้สามารถสรุปได้ว่า หมู่ไดออกซีวางอยู่ใต้ระนาบของวงแหวนสเตอรอยด์ หรือวางตัวแบบ α และสัมพันธ์กับการวางตัวของหมู่ไดออกซีของ *epi*-ergosterol peroxide ซึ่งเป็นสารที่มีการรายงานมาแล้ว (โปรดดูการรายงานและการเปรียบเทียบคอนฟิกิวเรชั่นระหว่างข้อมูลของสารตัวอย่าง **3** และข้อมูลจากการตีพิมพ์)

สำหรับคอนฟิกิวเรชั่นในตำแหน่งอื่นๆ ของสูตรโครงสร้างของสารตัวอย่าง **2** เป็นไปภายใต้ข้อสมมติฐานว่า สารตัวอย่าง **2** และ **3** เป็นอนุพันธ์ของ ergosterol ซึ่งแยกสกัดได้จากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ดังนั้น คอนฟิกิวเรชั่นโดยรวมของตำแหน่งอื่นๆ ควรเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งทำให้สามารถเสนอคอนฟิกิวเรชั่นของสารตัวอย่าง **2** โดยอ้างอิงกับการวิเคราะห์ข้อมูลของสารตัวอย่าง **3** เทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาแล้วของสารดังกล่าว (โปรดดูรายละเอียดการวิเคราะห์คอนฟิกิวเรชั่นของสารตัวอย่าง **3** ในหน้า

ถัดไป) สูตรโครงสร้างที่แสดงคอนฟิกิวเรชั่นของคาร์บอนอสมมาตรของสารตัวอย่าง **2** เป็นตามที่แสดงมาแล้วข้างต้น

สารตัวอย่าง **3** เป็นของแข็งสีขาว และแยกได้พร้อมกันในขั้นตอนการสกัดสารตัวอย่าง **2** สูตรโมเลกุลของสาร **3** ที่ได้จากการวิเคราะห์แมสสเปคตรัมในเทคนิคอิเล็กตรอนอิมแพคท์ เป็น $C_{28}H_{44}O_3$ ซึ่งสัมพันธ์กับสัญญาณมวลโมเลกุลที่ 428 (M^+) ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจากสเปคตรัม NMR ของสารตัวอย่าง **2** และ **3** จะเห็นได้ว่าสารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดมีสเปคตรัมที่ตรงกันเกือบทุกประการ หรือสามารถเสนอได้ว่า สารทั้ง 2 ชนิดน่าจะเป็นอนุพันธ์ซึ่งกันและกัน

สูตรโครงสร้างส่วนที่แตกต่างกันระหว่างสารตัวอย่าง **2** และ **3** สังเกตได้จากสูตรโมเลกุลของสาร **3** ซึ่งมีจำนวนออกซิเจนน้อยกว่าสาร 2 อะตอม ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับข้อมูลจากสเปคตรัม ^{13}C NMR ของสาร 3 ซึ่งมีสัญญาณของคาร์บอนที่เรโซเนตในย่านของคาร์บอนที่ต่อกับอะตอมที่มีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูงเพียง 3 สัญญาณ ได้แก่สัญญาณที่ δ 66.2 (C-3), 78.8 (C-8) และ 81.6 (C-5) ทั้งนี้ เนื่องจากค่าเคมิคัลชิฟต์เฉพาะตัวของของคาร์บอนที่ต่อกับหมู่ไดออกซีซึ่งเรโซเนตที่สนามต่ำ หรือที่ 78.8 และ 81.6 ppm ยังคงเป็นสัญญาณที่สามารถสังเกตชัดเจน ข้อมูลตามที่สรุปข้างต้นจึงช่วยให้สามารถเสนอได้ว่า สารตัวอย่าง **3** มีหมู่ไฮดรอกซิลน้อยกว่าสารตัวอย่าง **2** รวม 2 หมู่ นอกจากนั้น เมื่อวิเคราะห์สัญญาณเรโซแนนซ์จากสเปคตรัม HMBC พบว่าสะพานไดออกซีของสาร **3** แทนที่ที่ตำแหน่ง 5 และ 8 ซึ่งต่างจากตำแหน่ง 5 และ 9 ตามที่เสนอในกรณีของสาร **2** ดังนั้น จึงสรุปและเสนอสูตรโครงสร้างของสารตัวอย่าง 3 ได้เป็น *epi*-ergosterol 5,8-peroxide ตามที่แสดง (ดูสรุปข้อมูลสเปคตรัม NMR ในตารางที่ 5) ทั้งนี้ ข้อมูลสเปคตรัมของสารตัวอย่าง **3** ตรงกับข้อมูลของ *epi*-ergosterol peroxide ตามที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว (Gunatilaka et al, 1981; Yu et al, 2006)



3

ตารางที่ 5. ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **3** (C_6D_6; 500 MHz สำหรับโปรตอน)[n]

position	^{1}H (mult; *J* in Hz)	^{13}C (mult)
1	2.06 (br td; 13.8, 3.2); 1.48 (m)	35.1 (CH_2)
2	1.66 (m); 1.43 (m)	30.5 (CH_2)
3	3.90 (br tt; 11.0, 5.5)	68.2 (CH)
4	2.03 (ddd, 13.8, 5.0, 1.4); 1.70 (m)	37.4 (CH_2)
5	-	81.6 (C)
6	5.94 (d; 8.7)	135.7 (CH)
7	6.28 (d; 8.7)	130.7 (CH)
8	-	78.8 (C)
9	1.51 (m)	51.7 (CH)
10	-	37.2 (C)
11	1.62 (m); 1.22 (m)	23.6 (CH_2)
12	1.73 (m); 0.92 (ddd; 13.8, 6.4, 2.7)	39.6 (CH_2)
13	-	44.4 (C)
14	1.54 (m)	52.0 (CH
15	1.75 (m); 1.32 (m)	21.6 (CH_2)
16	1.38 (m); 1.23 (m)	28.9 (CH_2)
17	0.98 (m)	56.2 (CH)
18	0.59 (s, 3H)	12.9 (CH_3)
19	0.66 (s, 3H)	18.2 (CH_3)
20	1.93 (br qd; 6.9, 2.3)	40.1 (CH)
21	0.99 (d; 6.9, 3H)	21.1 (CH_3)
22	5.12 (dd; 15.2, 9.2)	135.8 (CH)
23	5.24 (dd; 15.2, 7.7)	132.2 (CH)
24	1.88 (br sextet; 6.8)	43.8 (CH)
25	1.47 (m)	33.4 (CH)
26	0.89 (d; 6.8, 3H)	20.2 (CH_3)
27	0.88 (d; 6.9, 3H)	19.8 (CH_3)
28	0.97 (d; 6.9, 3H)	17.6 (CH_3)

หมายเหตุ [n] หากไม่มีการระบุอื่นใด สัญญาณที่แสดงเทียบเท่ากับ 1 โปรตอนหรือ 1 คาร์บอนตามกำหนด

การวิเคราะห์คอนฟิกิวเรชั่นของสารตัวอย่าง **3** อาศัยการเปรียบเทียบค่าการหมุนระนาบแสงของสารตัวอย่าง **3** กับข้อมูลตามที่ได้รายงานมาแล้วเช่นกัน (ค่าตามรายงานอยู่ในช่วง -25 – 26°, $CHCl_3$; Gunatilaka et al, 1981; Nam et al, 2001) คอนฟิกิวเรชั่นของคาร์บอนอสมมาตรของสาร **3** เป็นตามที่แสดงข้างต้น อนึ่ง ตามข้อเสนอในส่วนการวิเคราะห์คอนฟิกิวเรชั่นของสาร **2** เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดเป็นอนุพันธ์ที่พบในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน และแยกสกัดได้จากส่วนสกัดที่ต่อเนื่องกัน การวิเคราะห์คอนฟิกิวเรชั่น ของสาร **2** และ **3** จึงสรุปได้ว่า สารทั้ง 2 ชนิดมีคอนฟิวกิวเรชั่นโดยรวมที่สอดคล้องและสัมพันธ์กัน

2.3.2. ฤทธิ์ทางชีวภาพ

การแยกสกัดสารตัวอย่าง **2** และ **3** ตามที่ได้เสนอในข้อ 2.3.1 ข้างต้น ใช้การทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียเพื่อการติดตามสารตัวอย่างที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว ในส่วนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่สกัดได้ นอกเหนือจากการทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียเพื่อยืนยันผลการแยกสกัดและติดตามความแรงในการออกฤทธิ์แล้ว ยังได้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ประกอบด้วย ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมาลาเรียของของสารตัวอย่าง **2** และ **3** มีค่า IC_{50} เป็น 7.1 และ 6.3 μM ตามลำดับ ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ สารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษา (200 mg/mL)

ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า สารตัวอย่าง **2** และ **3** มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในระดับดี อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านมาลาเรียของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน (IC_{50} ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 0.05 μg/mL) จะเห็นได้ว่า สารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบประมาณ 10^2 เท่า นั้นคือ สารตัวอย่างที่ได้ทั้ง 2 ชนิดไม่ใช่องค์ประกอบหลักที่แสดงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบขั้นต้น ดังนั้น การศึกษาวิจัยเพิ่มเติมน่าจะสามารถทำให้แยกสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความแรงในการออกฤทธิ์ที่ดีและสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดหยาบได้ในที่สุด

ตอนที่ 3

กรดเดโมสปอนจิกจากฟองน้ำในสกุล *Hemigellius*

3.1. บทนำ

กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบบ $\Delta^{5,9}$ (ตำแหน่งหมู่โอเลฟินแทนที่ที่คาร์บอน 5 และ 9) เป็นกรดไขมันที่พบได้น้อยในธรรมชาติ และมีการกระจายตัวอย่างจำเพาะเจาะจงเฉพาะในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มฟองน้ำจากชั้น Demospongea เท่านั้น อันเป็นที่มาของชื่อกรดไขมันแบบกรดเดโมสปอนจิก (demospongic acids) ทั้งนี้ ลักษณะพิเศษที่ทำให้กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบบ $\Delta^{5,9}$ แตกต่างจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลุ่มอื่นๆ คือ ลำดับของหมู่โอเลฟินซึ่งเป็นแบบ 5Z,9Z และในกรณีที่สูตรโครงสร้างมีหมู่โอเลฟินแทนที่มากกว่า 2 หมู่ (เช่นในกรณีของกรดไขมันแบบไตรอีโนอิก และเตตราอีโนอิก) หมู่โอเลฟินที่เพิ่มขึ้นทั้งหมดจะเป็นโอเลฟินที่มีคอนฟิกิวเรชั่นแบบ *Z* ซึ่งเรียงตัวเพิ่มจากปลายคาร์บอกซิลไปหาปลายเมธิล และวางตัวสลับด้วยสะพานเอธิลีนเสมอ ในขณะที่กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบในพืชชั้นสูงและสัตว์ในไฟลัมอื่นๆ ส่วนใหญ่จะมีตำแหน่งที่เริ่มการแทนที่หมู่โอเลฟินจากปลายด้านเมธิลไปหาปลายคาร์บอกซิล และในกรณีที่มีหมู่โอเลฟินมากกว่า 1 หมู่ การวางลำดับหมู่โอเลฟินจะสลับด้วยสะพานเมธิลีน (Carballeira and Reyes, 1990; Carballeira and Negrón, 1991; Carballeira et al, 1993; Joh et al, 1997; Makarieva et al, 2002; Barnathan et al, 2003; Nechev et al, 2004)

ลักษณะพิเศษอีกประการของกรดเดโมสปอนจิกคือ ความยาวของสายโซ่อัลคิลซึ่งมีรายงานในช่วงตั้งแต่ 16 ถึง 34 คาร์บอน อันถือได้ว่าเป็นช่วงของกรดไขมันที่ขนาดค่อนข้างใหญ่เมื่อเทียบกับกรดไขมันที่ได้จากแหล่งที่มาในธรรมชาติทั่วไป ทั้งนี้ เว้นแต่ในกรณีของกรดไขมันในกลุ่มกรดมัยโคลิก ซึ่งเป็นกรดไขมันที่พบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย และมีขนาดความยาวของสายโซ่อัลคิลในช่วง 40-60 คาร์บอนแล้ว ถือได้ว่ากรดไขมันกลุ่มกรดเดโมสปอนจิกเป็นกรดไขมันจากสิ่งมีชีวิตกลุ่มเมตาซัวที่ขนาดใหญ่ที่สุดที่พบในธรรมชาติ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในขั้นต้นของสารสกัดหยาบจากฟองน้ำในสกุล *Hemigellius* ซึ่งเก็ยสำรวจได้จากแนวกองหินโลซิน นอกชายฝั่งจ.นราธิวาส-ปัตตานี ผู้วิจัยสามารถตรวจพบสัญญาณของกรดไขมันในกลุ่มกรดเดโมสปอนจิกจากสเปคตรัม NMR ของสารสกัดหยาบดังกล่าว จึงได้คัดเลือกฟองน้ำ

ดังกล่าวมาศึกษาวิจัยเพื่อแยกสกัดองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจเพิ่มเติม และทำให้สามารถแยกสกัดกรดไขมันในกลุ่มกรดเดโมสปอนจิกชนิดใหม่จากตัวอย่างฟองน้ำดังกล่าวได้ 1 ชนิด

3.2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

3.2.1. สภาวะการทดลองทั่วไป

สภาวะการทดลองทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาวิจัยตามโครงการส่วนนี้ ทั้งในส่วนสารเคมีและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ เป็นไปตามที่ได้ระบุมาแล้วในตอนที่ 1 ข้างต้น

3.2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ

ฟองน้ำสกุล *Hemigelius* (วงศ์ Niphatidae) ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เก็บสำรวจจากบริเวณกองหินโลซินนอกชายฝั่ง จ.นราธิวาสและปัตตานี เมื่อเดือนกันยายน พ.ศ.2545 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานดำเนินการโดย ดร.สมชัย บุศราวิช สถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ.ภูเก็ต ตัวอย่างอ้างอิง (PMBC 21338) เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์ของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ. ภูเก็ต

3.2.3. การแยกสกัด

ขั้นตอนการแยกสกัดขั้นต้นในการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำ *Hemigellius* เป็นไปตามที่ได้ระบุในการแยกสกัดสารจากตัวอย่างฟองน้ำ *Corticium* ในตอนที่ 1 ตัวอย่างฟองน้ำหลังจากทำแห้งโดยเทคนิคการแช่เยือกแข็ง หนัก 250 กรัม ให้สารสกัดตัวอย่างจากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเธน และเมธานอล หนัก 4.5 กรัม 3.4 กรัม และ 14 กรัม ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเธนเป็นส่วนที่มีสัญญาณของกรดเดโมสปอนจิกเป็นองค์ประกอบ การแยกสกัดส่วนสกัดดังกล่าว ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีดังนี้; คอลัมน์ Sephadex LH20 ชะด้วยเมธานอล; คอลัมน์รีเวิร์สเฟส (C-18) ชะด้วยตัวทำละลายผสม น้ำ:อะซีโตไนไทรล์:เมธานอล (1:9:90); คอลัมน์ซิลิกาเจล ชะด้วยตัวทำละลายผสม อะซีโทน (15%) ในเฮกเซน; และโครมาโตกราฟีผิวบางบนซิลิกาเจล ชะด้วยตัวทำละลายเอธิลอะซีเตต (25%) ในเฮกเซน ซึ่งทำให้สามารถแยกสารตัวอย่าง **4** ได้ในปริมาณ 7 มิลลิกรัม

***(5Z,9Z)*-Nonatriacontadienoic acid (4).** UV (MeOH) λ_{max} (log E) 233 (2.74) nm; IR (thin film) ν_{max} 3400-2400, 1720, 1620 cm^{-1}; ^1H และ ^{13}C NMR (C_6D_6, 500 MHz สำหรับ ^1H), ดูตาราง 6; NICI-MS *m/z*

575 $[M+H]^-$ (100), 434 (82), 432 (99), 420 (78), 418 (94); HR-NICI-MS *m/z* 575.5797 $[M+H]^-$ (calcd for $C_{39}H_{75}O_2$, 575.57705).

3.2.4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทดสอบโดยใช้วิธี sulphorhodamine B assay (Skehan et al, 1990) เช่นเดียวกับที่ได้บรรยายไปแล้วในตอนที่ 1 ข้างต้น

3.3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยในระดับนำร่อง ผู้วิจัยเลือกใช้เทคนิคการคัดเลือกสารสกัดตัวอย่างของฟองน้ำจากสกุล *Hemigellius* ซึ่งมีสัญญาณในสเปคตรัม NMR ที่น่าสนใจ ผลการสกัดแยกและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างเป็นดังต่อไปนี้

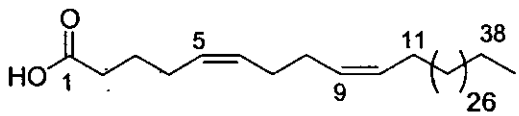
3.3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง

สารตัวอย่าง 4 ซึ่งแยกได้จากสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายไดคลอโรมีเธนของฟองน้ำ *Hemigellius* sp. มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว น้ำหนักที่แยกได้เท่ากับ 7 มิลลิกรัม มีมวลโมเลกุลที่สามารถสรุปข้อมูลได้จากแมสสเปคตรัมในเทคนิคเคมีคัลอิออไนเซชั่นแบบประจุลบเท่ากับ 574 หน่วยมวล (ตรวจพบสัญญาณที่ *m/z* 575 เทียบเท่ากับสัญญาณของ $[M+H]^-$) และสามารถสรุปสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้เป็น $C_{39}H_{74}O_2$ สูตรโมเลกุลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์แมสสเปคตรัมความแม่นยำสูงในเทคนิคเคมิคัลอิอิไนเซชั่นแบบประจุลบที่ *m/z* 575.5797 (ผลคำนวณมวลของ $C_{39}H_{75}O_2$, $[M+H]^-$ ได้เป็น 575.57705)

สูตรโมเลกุลตามที่เสนอข้างต้น ให้ผลคำนวณสมมูลพันธะคู่เป็น 3 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลจากสเปคตรัม IR ซึ่งแสดงสัญญาณการดูดกลืนแสงเฉพาะตัวของหมู่ฟังก์ชั่นหลักเพียง 2 กลุ่มคือ หมู่คาร์บอกซิลที่ 2400-3400 cm^{-1} (ร่วมกับสัญญาณหมู่คาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิกที่ 1720 cm^{-1}) และหมู่โอเลฟินที่ 1620 cm^{-1} ข้อมูลดังกล่าวร่วมกับข้อมูลจากสเปคตรัม ^{13}C NMR ทำให้สรุปได้ว่า สารตัวอย่างมีหมู่คาร์บอกซิลิก 1 หมู่ และหมู่โอเลฟิน 2 หมู่

จากสเปคตรัม ^1H NMR ของสารตัวอย่าง 4 สามารถสังเกตลักษณะเฉพาะของสัญญาณของกรดไขมัน อันได้แก่ สัญญาณของโปรตอนเมธิลีนจำนวนมากซึ่งเรโซเนตในย่าน δ 1.25-1.40 และสัญญาณของหมู่เมธิลที่ปลายโครงสร้างซึ่งเรโซเนตที่ δ 0.90 (3H; t, J = 7.3 Hz; H-39) สัญญาณหมู่ฟังก์ชั่นหลักนอกเหนือจากโครงสร้างส่วนของสายโซ่อัลคิลดังกล่าว ได้แก่สัญญาณของหมู่โอเลฟินรวม 4 โปรตอน ได้แก่

สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.27 (dtt, J = 10.7, 7.3, 1.5 Hz; H-5), 5.44 (dtt, J = 10.7, 7.3, 1.5 Hz; H-6) และ 5.48 (2H; m; H-9 และH-10) สัญญาณหมู่โอเลฟินดังกล่าวต่อเนื่องถึงกันโดยผ่านการวิเคราะห์สเปคตรัม HMBC และทำให้สามารถกำหนดตำแหน่งของหมู่โอเลฟินทั้ง 2 หมู่ได้เป็นแบบ $\Delta^{5,9}$ สะพานโพรพิลีนในตำแหน่ง 2-4 ประกอบด้วยสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.09 (2H; m; H-2), 1.53 (2H; quintet, J = 7.3 Hz; H-3) และ 1.91 (2H; br q, J = 7.3 Hz; H-4) ซึ่งต่อสัญญาณจากโปรตอนตำแหน่งที่ 5 ไปยังคาร์บอนของหมู่คาร์บอกซิลิกที่ δ 179.5 (C-1) ส่วนสะพานเอธิลีนระหว่างหมู่โอเลฟินทั้ง 2 หมู่ประกอบด้วยสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 27.5; 2C (C-7 และ C-8) ทั้งนี้ ไม่สามารถแยกสัญญาณของโปรตอนออกจากสัญญาณเมธิลีนอื่นๆ ในย่าน 1.2-1.4 ppm ได้ จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปคโตรสโกปีข้างต้น ช่วยให้เสนอสูตรโครงสร้างของสาร 4 ได้เป็น *(5Z,9Z)*-Nonatriacontadienoic acid ตามที่แสดงข้างล่างนี้ ทั้งนี้ จากสูตรโครงสร้างของสาร 4 ตามที่เสนอ สามารถสรุปได้ว่าสารตัวอย่าง 4 เป็นกรดไขมันชนิดใหม่ในกลุ่มกรดเดโมสปอนจิกซึ่งยังไม่มีการรายงานมาก่อน (ค่าเคมิคัลชิฟต์ในสเปคตรัม NMR ของสาร 4 สรุปในตารางที่ 6)



4

ประเด็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับสารตัวอย่าง 4 คือข้อมูลจากแมสสเปคตรัม ซึ่งไม่เป็นไปตามรูปแบบที่ควรได้จากการตรวจวัดมวลโมเลกุลโดยใช้เทคนิคเคมิคัลอิออไนเซชั่นแบบประจุลบ ทั้งนี้ ในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นกรดไขมันที่มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{39}H_{74}O_2$ สัญญาณมวลโมเลกุลเสมือนที่ควรตรวจพบในแมสสเปคตรัมดังกล่าว ควรเป็นสัญญาณของ $[M-H]^-$ ที่ *m/z* 573 แต่ในทางตรงข้าม สัญญาณที่ตรวจพบในกรณีของสารตัวอย่าง 4 เป็นสัญญาญที่ *m/z* 575 ซึ่งเป็นสัญญาณของ $[M+H]^-$ อย่างไรก็ตาม มวลโมเลกุลเสมือนของสารตัวอย่าง 4 ที่ยืนยันได้จากแมสสเปคตรัมความแม่นยำสูงระบุว่ามวลโมเลกุลที่เสนอเป็นสัญญาณของสารตัวอย่างตรงตามที่เสนอจริง ทั้งนี้ สำหรับสัญญาณของสารตัวอย่างที่ *m/z* 575 ตามที่สังเกตได้ในที่นี้ ผู้วิจัยเสนอว่าควรเป็นสัญญาณของสารตัวอย่างที่ถูกรีดิวซ์ที่ตำแหน่งของหมู่โอเลฟิน ทำให้ได้อนุพันธ์ที่มีไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 2 อะตอม อันจะให้สัญญาณของมวลที่เสียโปรตอนหลังจากทดลองในเทคนิคประจุลบดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 575 หน่วยมวลตามที่ได้รายงานไปแล้ว ปัจจัยจากเทคนิคในการก่อประจุเริ่มต้นโดยใช้มีเธนเป็นสารสร้างประจุ ที่อุณหภูมิการสร้างประจุที่ 150 °C และความต่างศักย์ที่ 100.0 อิเล็กตรอนโวลท์

เป็นปัจจัยที่มีการรายงานว่า สามารถเร่งให้เกิดปฏิกิริยารีดักชั่นในระหว่างกระบวนการสร้างประจุภายในระบบของเครื่องสเปคโตรมิเตอร์ได้ดีขึ้นด้วย (Vairamani et al, 1990; Murty et al, 2005)

ตารางที่ 6. ค่าเคมิคัลชิฟต์ของโปรตอนและคาร์บอนของสาร **4** (C_6D_6; 500 MHz สำหรับโปรตอน)

position	^{1}H (mult; *J* in Hz)	^{13}C (mult)
1	-	179.5, C
2	2.09 (m)	33.1, CH_2
3	1.53 (quint, 7.3)	24.6, CH_2
4	1.91 (br q, 7.3)	26.5, CH_2
5	5.27 (dtt, 10.7, 7.3, 1.5)	128.9, CH
6	5.44 (dtt, 10.7, 7.3, 1.5)	130.4, CH
7	2.08 (m)	27.51, CH_2
8	2.08 (m)	27.50, CH_2
9	5.48 (m)	130.4, CH
10	5.48 (m)	129.2, CH
11	2.09 (m)	33.9, CH_2
12-37	1.25 – 1.40 (m; 52H)	29-30, CH_2 (26C)
38	1.3 (m)	32.1, CH_2
39	0.90 (t, 7.3)	14.1, CH_3

3.3.2. ฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารตัวอย่าง **4** ผลการทดสอบพบว่า สารตัวอย่างมีค่าเสมือนไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ใช้เป็นเป้าหมายในการทดสอบ (ค่าการยับยั้งการเจริญของเซลล์ต่ำกว่า 50% ที่ระดับความเข้มข้น 200 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษา)

เอกสารอ้างอิง

Barnathan, G., Genins, E., Velosaotsy, N.E., Kornprobst, J., Al-Lihaibi, S., Al-Sofyani, A., Nongonierma, R. (2003) Phospholipids fatty acids and sterols of two *Cinachrylla* sponges from the Saudi Arabian Red Sea: Comparison with *Cinachyrella* species from other origins. Comp. Biochem. Physiol. B. 135: 297-308.

Carballeira, N.M, Negrón, V. (1991) Identification and characterization of two new methylicosadienoic acids from *Erylus formosus*. J. Nat. Prod. 54: 305-309.

Carballeira, N.M., Reyes, E.D. (1990) Novel very long chain fatty acids from the sponge *Petrosia pellasarca*. J. Nat. Prod. 53: 835-840.

Carballeira, N.M., Reyes, E.D., Shalabi, F. (1993) Identification of novel iso/anteiso nonacosadienoic acids from the phospholipids of the sponges *Chondrosia remiformis* and *Myrmekioderma styx*. J. Nat. Prod. 56: 1850-1855.

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

Elgorachi, E.E., Malan, S.F., Stafford, G.I., van Staden, J. (2006) Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enz

Eslami, M.S., Espinoza, R.T. (2003) Update in treatment for Alzheimeer;s disease part I: Primary treatments. Clin. Genet. 11: 42-48.

Francis, P.T., Palmer, A.M, Snape, M., Wilcock, G.K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. J. Neuro. Neurosurg. Psychiatry. 66: 137-147.

Gunatilaka, A.A.L., Gopichand, Y.; Schmitz, F.J., Djerassi, C. (1981) Minor and trace sterols in marine invertebrates. 26. Isolation and structure elucidation of nine new 5α,8α-epidioxy sterols from four marine organisms. J. Org. Chem. 46: 3860-3866.

Houghton, P.J., Howes, M.-J. (2005) Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's deisease. Neurosignals. 14: 6-22.

Ingkaninan, K., Changwijit, K., Suwanborirux, K. (2006) Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. J. Pharm. Pharmacol. 58: 847-852.

Joh, Y.-G., Elenkov, I.J., Stefanov, K.L, Popov, S.S., Dobson, G., Christie, W.W. (1997) Novel di-, tri-, and tetraenoic fatty acids with bis-methylene-interrupted double-bond systems from the sponge *Haliclona cinerea*. Lipids. 32: 13-17.

Makarieva, T.N., Santolova, E.A., Gorshkova, I.A., Dmitrenok, A.S., Guzii, A.G., Gorbach, V.L., Svetashev, V.I., Stonik, V.A. (2002) A new cytotoxic fatty acid (5Z,9Z)-22-methyl-5,9-tetracosadienoic acid and the sterols from the far eastern sponge *Geodinella robusta*. Lipids. 37: 75-80.

Murty, M.R.V.S., Prabhakar, S., Lakshmi, V.V.S., Vijaya Saradhi, U.V.R., Jagadeshwar Reddy, T., Vairamani, M. (2005) Mass spectral analysis of chloropicrin under negative ion chemical ionization conditions. Anal. Chem. 77: 3406-3410.

Nam, K.S., Jo, Y.S., Kim, Y.H., Hyun, J.W., Kim, H.W. (2001) Cytotoxicity activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. Life Sci. 69: 229-237.

Newman, D.J., Cragg, G.M. (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. J. Nat. Prod. 67: 1216-1238.

Nechev, J., Christie, W.W., Robaina, R., de Diego, F., Popov, S., Stefanov, K. (2004) Chemical composition of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Canary Islands. Comp. Biochem. Physiol. A. 137: 365-374.

Penn, R.D.; Paice, J.A. (2000) Adverse effects associated with the intrathecal administration of zinocotide. Pain. 85: 291-296.

Rosser, R.M., Faulkner, D.J. Two steroidal alkaloids from a marine sponge, *Plakina* sp. (1984) J. Org. Chem. 49: 5157-60.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Mons, A.; McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-1112.

Schwartsmann, G.; Brondani da Rocha, A.; Berlinck, R.G.S.; Jimeno, J. (2001) Marine organisms as a new source of new anticancer agents. Lancet Oncol. 2:221-225.

Vairamani, M., Saraswathi, M., Viswanadha Rao, G.K. (1990) Evidence of metal surface catalysed reduction of unsaturated carboxylic acid under negative ion chemical ionization. Org. Mass Spectrom. 25: 274-276.

Viegas Jr., C., Bolzani, V.S., Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M. (2005) New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. Mini-Rev. Med. Chem. 5: 915-26.

World Health Organization. (2005) Wolrd Malaria Report 2005. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

World Health Organization (2006) Guidelines for the treatment of malaria. WHO Press, Geneva: 16-66.

Yu, S., Deng, Z., van Ofwegan, L., Proksch, P., Lin, W. (2006) 5,8-Epidioxysterols and related derivatives from a Chinese soft coral *Sinularia flexibilis*. Steroids. 71: 955-959.

ผลผลิตของโครงการวิจัย

จากผลการดำเนินงานวิจัยตามที่ได้รายงานมาแล้วข้างต้น โครงการวิจัยเรื่อง องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในฟองน้ำของไทยจากแนวชายฝั่งจังหวัดปัตตานีนี้ สามารถสร้างผลผลิตในด้านต่างๆ ตามที่ได้เสนอไว้ในข้อเสนอโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

องค์ความรู้ใหม่:

ดำเนินการแยกสกัดสารจากฟองน้ำรวม 3 ชนิด จากสกุล *Corticium, Ciocalapata* และ *Hemigellius* และสามารถแยกสกัดสารชนิดใหม่ได้รวม 3 ชนิด คือ 4-acetoxy-plakinamine B, 5,9-*epi*-dioxyergostan-3,8,17-triol และ *(5Z,9Z)*-nonatriacontadienoic acid และสารที่มีการรายงานมาแล้ว 1 ชนิด คือ 5,8-*epi*-ergsterol peroxide ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่ได้ พบว่า 4-acetoxy-plakinamine B มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสในระดับดี 5,9-*epi*-dioxyergostan-3,8,17-triol และ 5,8-*epi*-ergsterol peroxide มีฤทธิ์ต้านมาลาเรียในระดับปานกลาง ทั้งนี้ สารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดข้างต้น มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่ต่ำกว่าที่สามารถตรวจวัดได้ในการศึกษานี้ ส่วน *(5Z,9Z)*-nonatriacontadienoic acid ไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นเป้าหมายในการศึกษานี้ในระดับที่น่าสนใจ

การผลิตนักศึกษา: นักศึกษาที่ทำวิทยานิพนธ์/ปริญญานิพนธ์ที่สัมพันธ์กับการวิจัยในโครงการนี้ประกอบด้วย

- ระดับปริญญาตรี; น.ส.อรพรรณ สกุลแก้ว และ น.ส.เปรมศิริ วิจารณ์ (สำเร็จการศึกษาแล้วในปีการศึกษา 2547)
- ระดับปริญญาโท; น.ส.รุสนี เล่งเจ๊ะ (สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550) และ น.ส.นภัสสร ฉันทธำรงศิริ (คาดว่าจะสำเร็จการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2550)

การผลิตผลงานทางวิชาการ: ได้ตีพิมพ์ผลงานวิจัยแล้ว 1 ฉบับ (Langjae, R., Bussarawit, S., Yuenyongsawad, S., Ingkaninan, K., Plubrukarn, A. Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge *Corticium* sp. Steroids. 2007, 72; 682-685.) และอยู่ระหว่างการจัดทำต้นฉบับเพื่อการตีพิมพ์ 1 เรื่อง (Chantathamrongsiri, N., Bussarawit, S., Yuenyongsawad, S., Plubrukarn, A., Wattanapiromsakul, C., Suwanborirux, K. Antimalarial steroidal peroxides from the sponge *Ciocalapata* sp. Steroids. 2008, 73; in preparations.)

นอกจากนั้น ผลงานวิจัยตามที่ได้รายงานไปข้างต้น ได้นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแล้ว 2 เรื่อง ได้แก่

Sakulkeo, O., Wicham, P., Bussarawit, S., Yuenyongsawad, S., Plubrukarn, A. A new (Z,Z)-5,9-fatty acid from the Thai sponge *Hemigellius* sp. 46th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. July23-27, 2005. Corvallis, OR, USA.

Langjae, R., Bussarawit, S., Yuenyongsawad, S., Ingkaninan, K., Plubrukarn, A. An acetylcholinesterase inhibiting steroidal alkaloid from the Thai sponge *Corticium* sp. 12th International Symposium on Marine Natural Products. February 4-9, 2007. Queenstown, New Zealand.