รายงานวิจัย

ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์ของเซสเตอร์เทอร์ปีนจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล: การประเมินฤทธิ์และขอบข่ายการออกฤทธิ์

(Antitubercular and cytotoxic activities of marine-derived sesterterpenes: Activity assessment and profiling)

คณะผู้วิจัย

นายอนุชิต พลับรู้การ และนางสุปรียา ยืนยงสวัสดิ์

หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับการสนับสนุนจาก เงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2550-2551

กันยายน 2551

บทคัดย่อ

จากการแยกสกัดองค์ประกอบทางเคมีจากฟองน้ำ *Hyrtios* sp. ซึ่งเก็บสำรวจจากบริเวณรอบเกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี สามารถแยกสกัดอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนในกลุ่มสกาลาเรน 2 ชนิด คือ heteronemin และ 12-epi-deacetyl-19α-acetoxy-20α-methoxyscalaran โดย 12-epi-deacetyl-19α-acetoxy-20α-methoxyscalaran เป็นสารใหม่ที่รายงานการแยกสกัดและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างเป็นครั้งแรกในการวิจัยนี้ นอกจากนั้น จากการดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรนโดยใช้ heteronemin เป็นสารตั้งต้นหลัก สามารถเตรียมอนุพันธ์สกาลาเรนได้เพิ่มอีก 9 ชนิด การทดสอบฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารตัวอย่างที่ได้จากการวิจัยนี้ ทั้งจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและจากการดัดแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมี พบว่า สารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านวัณโรคในช่วง MIC ตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{2} μM และมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (ทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ) ในช่วง IC_{50} จาก 10^{-3} μM จนถึงไม่แสดงฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (5 μg/mL)

ABSTRACT

The chemical investigation of the sponge *Hyrtios* sp., collected from the vicinity of Koh-Tao, Surat-Thani, led to the isolation of two scalarane-type sesterterpenes; heteronemin and 12-epi-deacetyl-19α-acetoxy-20α-methoxyscalaran. Particularly, the latter was proposed to be a new member of the scalarane derivatives first reported in this investigation. The chemical derivatization of the scalaranes, using heteronemin as the primary starting material, also yielded nine additional scalarane congeners. All the scalaranes, both from natural products and from chemical derivatization, were assessed for their biological activities, namely antitubercular and cytotoxic activities. The MICs for antitubercular activity of the tested samples were found in a range of 10^{-1} – 10^{2} μM, whereas the IC_{50}s for cytotoxicity, both against cancer and normal cell lines, ranged from 10^{-3} μM to virtually inactive at the highest concentration of 5 μg/mL.

สารบัญ

		หน้า
	กิตติกรรมประกาศ	ก
	บทคัดย่อ	ข
	สารบัญตาราง	ง
	สารบัญรูป	จ
	สารบัญแผนภูมิ	ฉ
1	**บทนำ**	1
	1.1. วัณโรค	3
	1.2. เซสเตอร์เทอร์ปีนและอนุพันธ์สกาลาเรน	5
	1.3. แนวความคิด และวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	8
2	**การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย**	10
	2.1. สภาวะการทดลองทั่วไป	10
	2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ	11
	2.3. การแยกสกัด	11
	2.4. การดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรน	12
	2.5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	17
3	**ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง**	19
	3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรน	19
	3.2. การดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรน	23
	3.2.1 ปฏิกิริยาไฮโดรลัยซิสของหมู่อะซีเตทและการแตกวงแหวนฟิวแรน	25
	3.2.2. การดัดแปลงหมู่แทนที่บนคาร์บอน 12	25
	3.2.3. ปฏิกิริยาพัยโรลัยซิส	25
	3.3. ฤทธิ์ทางชีวภาพ	26
4	**สรุปผลและข้อเสนอแนะ**	29
	เอกสารอ้างอิง	31
	ผลผลิตของโครงการ	35

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลที่อยู่ระหว่างการพัฒนาทางคลินิก	2
2	ค่าเคมิคัลชิฟต์ของ ^{1}H และ ^{13}C ของ **6** (500 MHz สำหรับ ^{1}H; C_6D_6).....	22
3	ฤทธิ์ต้านวัณโรค (*M. tuberculosis* $H_{37}Ra$) และความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์สกาลาเรน **1**, **2** และ **6-14**.....	27

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่าง ^{1}H -- ^{1}H (เส้นทึบ) และ ^{13}C -- ^{1}H (C → H) จากสเปคตรัม $^{1}H,^{1}H$-COSY และ HMBC ของ **6**	20
2	คอมพิวเตอร์กราฟิกแสดงสูตรโครงสร้างในคอนฟอร์เมอร์ที่เสถียรของ **6** จากการคำนวณ MM2	23

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1	การดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรน.....	24

1. บทนำ

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

จนถึงปัจจุบัน มียาที่ได้รับการอนุมัติให้ใช้ในสถานพยาบาลทั่วไป ซึ่งได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล หรือมีต้นกำเนิดจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลเพียง 2 กลุ่มหลักเท่านั้น ได้แก่ ยาต้านมะเร็งกลุ่มอะราบิโนนิวคลีโอไซด์ เช่น cytarabine และ gemcitabine ซึ่งมีพัฒนามาจากนิวคลีโอไซด์จากฟองน้ำ *Tethya crypta* (Schwartsmann et al, 2001) และยาแก้ปวด ziconotide ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์เลียนแบบเปปไทด์จากพิษหอยเต้าปูน *Conus magnus* (Penn and Paice, 2000)

ถึงแม้จะมียาที่ได้จากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งได้รับการอนุมัติให้ใช้ในทางคลินิกโดยทั่วไปในปัจจุบันเพียงไม่กี่รายการ แต่หากเทียบกับระยะเวลา และจำนวนของสารที่ได้จากการรายงานการศึกษาวิจัยในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยรวมทั่วไปแล้ว อัตราส่วนเพียงเล็กน้อยนี้ก็แสดงให้เห็นศักยภาพและแนวโน้มที่ดีของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลในการเป็นแหล่งที่มาของยาใหม่ และเมื่อรวมกับรายการของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลซึ่งอยู่ระหว่างการศึกษาวิจัยทางคลินิกในระยะต่างๆ แล้ว (ตารางที่ 1) ก็จะสามารถเห็นถึงศักยภาพที่ดีของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลในการเป็นสารต้นแบบในการพัฒนายาใหม่ได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 1. ตัวอย่างสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลที่อยู่ระหว่างการพัฒนาทางคลินิก

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา	สถานะการวิจัย
ecteinascidin 743 (Yondelis®)	*Ecteinascidia turbinata*	Phase III (cancer)
AE-941 (neovastat)	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)

จากตัวอย่างที่ได้แสดงมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าทรัพยากรชีวภาพทางทะเล โดยเฉพาะในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ฟองน้ำ และเพรียงหัวหอม เป็นทรัพยากรที่มีศักยภาพที่ดียิ่งในฐานะของแหล่งที่มายาใหม่ รวมถึงสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในทางการแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม รวมถึงสารเคมีเพื่อใช้การศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และนำไปสู่แนวคิดหลักของหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารชนิดใหม่ และสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ซึ่งเป็นกิจกรรมที่หน่วยวิจัยได้ดำเนินการมาอย่างต่อเนื่อง

รายงานการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์ของเซสเตอร์เทอร์ปีนจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล: การประเมินฤทธิ์และขอบข่ายการออกฤทธิ์ นี้ เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ดำเนินการภายในหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณเพื่อการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2550-2551 กรอบการวิจัยตาม

โครงการ ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไปในรายงานฉบับนี้ ประกอบด้วยการแยกสกัดและการศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์กลุ่มเซสเตอร์เทอร์ปีนจากฟองน้ำในสกุล *Hyrtios* การดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนเพื่อเพิ่มจำนวนสารตัวอย่างในห้องสมุดสารเคมี และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ อันได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งจะนำไปสู่การเปรียบเทียบและการสร้างแบบแผนความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีน รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ในเชิงปริมาณของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนต่อไปในอนาคต

1.1. วัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่มีความรุนแรงและถือเป็นหนึ่งในสาเหตุการเสียชีวิตอันเนื่องจากโรคติดเชื้อในอันดับต้นๆ ทั้งในระดับประเทศและในระดับโลก ทั้งนี้ จากรายงานประมาณการโดยองค์การอนามัยโลก อุบัติการณ์ของผู้ติดเชื้อวัณโรคทั่วโลก (ทั้งวัณโรคปอดและการติดเชื้อในอวัยวะอื่น) ทั้งการติดเชื้อเป็นครั้งแรกและการกลับเป็นใหม่ในปี พ.ศ. 2548 มีจำนวนสูงถึง 8.8 ล้านราย โดยในจำนวนนี้ เป็นผู้ติดเชื้อที่ตรวจพบเชื้อในเสมหะ (smear positive) สูงถึง 3.9 ล้านราย และจำนวนผู้เสียชีวิตจากวัณโรคทั่วโลกในปีดังกล่าวมีจำนวนสูงถึงกว่า 1.5 ล้านราย หรือคิดเป็นผู้เสียชีวิตอันเนื่องจากวัณโรค 24 รายต่อประชากร 100,000 คน และหากนับรวมถึงผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคซึ่งไม่แสดงอาการแต่สามารถแพร่เชื้อให้ผู้อื่นได้ จำนวนผู้ติดเชื้อวัณโรคทั่วโลกจะมีสูงถึงหนึ่งในสามของประชากรโลกทั้งหมด (WHO, 2008a)

สำหรับประเทศไทย ซึ่งถือเป็นอันดับที่ 17 ของประเทศที่มีอุบัติการณ์การติดเชื้อจากวัณโรคสูงสุดในระดับโลกตามรายงานโดยองค์การอนามัยโลก อุบัติการณ์ผู้ติดเชื้อใหม่ในประเทศไทยใน พ.ศ. 2549 (ทั้งวัณโรคปอดและการติดเชื้อในอวัยวะอื่น) มีจำนวน 90,252 ราย ในจำนวนดังกล่าวคิดเป็นผู้ติดเชื้อที่ตรวจพบเชื้อในเสมหะจำนวน 39,617 ราย และมีผู้เสียชีวิตอันเนื่องจากการติดเชื้อวัณโรคในปีดังกล่าวจำนวน 12,710 ราย ปัจจัยที่ทำให้จำนวนผู้ติดเชื้อและผู้เสียชีวิตจากวัณโรคในประเทศไทยมีจำนวนสูงมากดังที่ระบุข้างต้นส่วนหนึ่งสืบเนื่องจากการติดเชื้อแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเอดส์และผู้ติดเชื้อ HIV ทั้งนี้ ตามรายงานข้างต้นอุบัติการณ์ของผู้ป่วยโรคเอดส์และมีการติดเชื้อวัณโรคแทรกซ้อน (รวมวัณโรคในทุกอวัยวะ) มีจำนวน 9,961 ราย และจำนวนผู้เสียชีวิตอันเนื่องจากการติดเชื้อแทรกซ้อนดังกล่าวคิดเป็น 2,435 ราย (WHO, 2008b)

ในปัจจุบัน แนวทางการป้องกันและรักษาการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค ยังคงจำกัดอยู่เพียงแค่การใช้วัคซีนป้องกัน (BCG) และการใช้ยา ซึ่งมีเพียง 5 รายการ ได้แก่ isoniazid; rifampicin; streptomycin; ethambuthol และ pyrazinamide อย่างไรก็ตาม เนื่องจากลักษณะเฉพาะของ *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญช้า และมีระยะฟักตัวและการติดเชื้อแอบแฝงเป็นเวลานาน ทำให้การรักษาด้วยยาดังกล่าวต้องใช้เวลานานถึง 6-9 เดือน โดยใช้ยาร่วมกันมากกว่า 1 รายการ เพื่อให้สามารถกำจัดเชื้อจากผู้ป่วยจนหมด แนวทางการรักษาดังกล่าวเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยวัณโรคส่วนหนึ่งหยุดใช้ยากลางคัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเชื้อก่อโรคไปเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multidrug resistant tuberculsis; MDR-TB) และทำให้การกำหนดแผนการรักษาในกรณีของผู้ที่กลับมาติดเชื้อซ้ำทำได้ยากยิ่งขึ้น เนื่องจากแพทย์ต้องหันไปเลือกใช้ยาตัวแทนที่มีอาการไม่พึงประสงค์และมีความเป็นพิษสูงขึ้น

ความต้องการแนวทางการรักษาและยาต้านวัณโรคชนิดใหม่ เพื่อใช้ทดแทนแนวทางการรักษาตามมาตรฐานในกรณีที่ผู้ป่วยไม่สามารถใช้ยาต้านวัณโรคกลุ่มหลักที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งรวมถึงกรณีของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ MDR-TB เป็นปัจจัยที่นำไปสู่การศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนายาต้านวัณโรคชนิดใหม่ทั้งจากการสังเคราะห์ และจากแหล่งที่มาในธรรมชาติ รวมถึงการวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านวัณโรคชนิดใหม่ และค้นหาเป้าหมายการออกฤทธิ์ชนิดใหม่สำหรับประกอบการพัฒนายาต้านวัณโรค อันได้แก่เอนไซม์และโปรตีนที่มีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น ซึ่งทำให้มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับประเด็นต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการอย่างมากโดยเฉพาะในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา รวมถึงมีการรายงานสรุปในบทความปริทัศน์ที่น่าสนใจหลายฉบับ ทั้งนี้ เพื่อลดความซ้ำซ้อนของเอกสารอ้างอิงซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับรายงานการวิจัยนี้โดยตรง ผู้วิจัยของดเว้นการระบุรายละเอียดดังกล่าวในรายงานฉบับนี้ อย่างไรก็ตาม ผู้ที่สนใจสามารถติดตามสรุปการวิจัยสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านวัณโรคและแนวคิดใหม่เกี่ยวกับการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ต้านวัณโรคได้จากบทความปริทัศน์ดังต่อไปนี้; Copp, 2003; Smith et al, 2004; และ Pauli et al, 2005

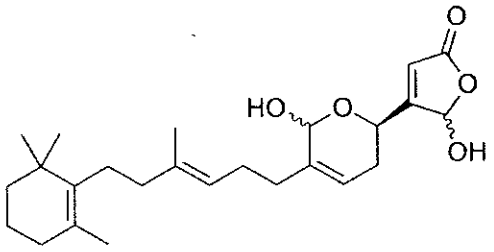
1.2. เซสเตอร์เทอร์ปีนและอนุพันธ์สกาลาเรน

สารกลุ่มเซสเตอร์เทอร์ปีน (sesterterpenes) เป็นอนุพันธ์เทอร์ปีนอยด์ที่พบค่อยข้างน้อยในธรรมชาติเมื่อเทียบกับอนุพันธ์เทอร์ปีนอยด์อื่นๆ ทั่วไป ยิ่งไปกว่านั้น แหล่งที่มาของเซสเตอร์เทอร์ปีนในธรรมชาติส่วนใหญ่ก็มีความแตกต่างจากแหล่งที่มาของเทอร์ปีนอยด์อื่นๆ ทั้งนี้ ในขณะที่แหล่งที่มาของอนุพันธ์เทอร์ปีนอยด์กลุ่มอื่นๆ จากธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นพืช ตั้งแต่กลุ่มพืชที่มีระบบท่อลำเลียงแทบทุกชนิดไปจนถึงกลุ่มพืชที่มีวิวัฒนาการต่ำกว่าพืชที่มีท่อลำเลียง เช่น มอสและสาหร่าย สำหรับในกรณีของเซสเตอร์เทอร์ปีนนั้น แหล่งที่มาหลักของอนุพันธ์กลุ่มนี้ในธรรมชาติ กลับได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ในไฟลัม Porifera หรือฟองน้ำ

ถึงแม้ว่าอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนจะพบได้ไม่บ่อยนัก ในทางกลับกัน สารกลุ่มนี้นับเป็นสารกลุ่มที่มีความน่าสนใจอย่างยิ่งกลุ่มหนึ่ง ทั้งในทางเคมีและทางชีววิทยา ตัวอย่างเช่น ในการจัดเรียงสูตรโครงสร้างของเซสเตอร์เทอร์ปีนนั้น โครงสร้างของอนุพันธ์กลุ่มนี้มีความหลากหลายสูงมากเมื่อเทียบกับจำนวนของสมาชิกในกลุ่ม โครงสร้างทางเคมีของเซสเตอร์เทอร์ปีนมีรูปแบบการปิดวงแหวนที่แตกต่างกัน ตั้งแต่อนุพันธ์ซึ่งมีลักษณะเกือบเป็นสายโซ่เปิดและมีวงแหวนเพียง 1 วง ไปจนถึงโครงสร้างที่มีการปิดวงแหวนแบบ tetracarbocyclic และ pentacarbocyclic ทั้งนี้ การปิดวงแหวนที่แตกต่างกันนี้ สะท้อนให้เห็นถึงความหลากหลายของเอนไซม์ที่ทำหน้าเร่งปฏิกิริยาการปิดวงแหวนในสัตว์ที่เป็นผู้ผลิต รวมไปถึงกระบวนการเชื่อมต่อของหน่วยไอโซพรีนที่เป็นองค์ประกอบก็มีลักษณะที่น่าสนใจเช่นกัน เนื่องจากเป็นการเชื่อมต่อหน่วยไอโซพรีนแบบหัวไปท้าย (head-to-tail) ไปจนครบทั้งโครงสร้าง แทนที่จะเป็นการต่อแบบหัวต่อท้ายเพียงครั้งเดียวก่อนจะต่อแบบท้ายไปท้าย (tail-to-tail) อย่างที่พบในอนุพันธ์เทอร์ปีนอยด์ขนาดใหญ่อื่นๆ

ส่วนในประเด็นของฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น อนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนส่วนใหญ่เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างของเซสเตอร์เทอร์ปีนที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจชนิดหนึ่งคือ manoalide ซึ่งเป็นเซสเตอร์เทอร์ปีนกลุ่มที่มีวงแหวนแบบ monocarbocyclic (manoalide-type sesterterpenes) แรกสกัดได้จากฟองน้ำ *Luffariella variabilis* และเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยผ่านกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ phospholipase A2 (Kobayashi et al, 1994) ทั้งนี้ ถึงแม้ในขณะนี้ จะยังไม่มีการนำ manoalide มาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาต้านการอักเสบ แต่ manoalide ก็ยังมีศักยภาพในการเป็นเครื่องมือประกอบการศึกษาวิจัยด้าน

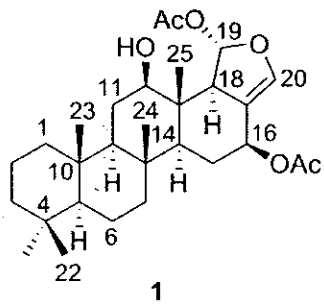
การวิเคราะห์กลไกด้านการอักเสบที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง นอกจากนั้น อนุพันธ์อื่นของ manoalide ก็ยังมีการรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นต้น



manoalide

สำหรับอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนในกลุ่มสกาลาเรน (scalaranes) ซึ่งเป็นจุดสนใจหลักของรายงานการวิจัยฉบับนี้ เป็นอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่ง แหล่งที่มาหลักของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนจากธรรมชาติ มีเฉพาะจากในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจากทะเลโดยเฉพาะจากฟองน้ำในอันดับ Dictyoceratida เช่น ฟองน้ำจากสกุล *Hyrtios* (Crews and Bescansa, 1986; Doi et al, 1993; Kobayashi et al, 1994; Ryu et al, 1996; Ledroit et al, 2004); *Hyatella* (Karuso et al, 1989; Hernández-Guerrero et al, 2006; Somerville et al, 2006); *Phyllospongia* (Rao et al, 1991; Li et al, 2007); *Smenospongia* (Rho et al, 2004); และ *Spongia* (Nam et al, 2006) นอกจากนั้น ยังมีรายงานการสกัดและศึกษาสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรนจากทากทะเล ซึ่งคาดว่าสะสมสารตัวอย่างผ่านการกินฟองน้ำในกลุ่มที่กล่าวมาข้างต้นเป็นอาหารอีกด้วย (Fontana et al, 1999; Gavagnin et al, 2004) ผู้ที่สนใจสามารถติดตามสรุปตัวอย่างของอนุพันธ์สกาลาเรนที่มีการรายงานจากแหล่งต่างๆ ได้ในวิทยานิพนธ์โดย Wonganuchitmeta (2003) และ Jaisamut (2008)

อนุพันธ์สกาลาเรนที่เป็นจุดสนใจของโครงการวิจัยนี้ คือ heteronemin (**1**) ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุพันธ์สกาลาเรนชนิดแรกๆ ที่มีการรายงานการค้นพบในธรรมชาติ ทั้งนี้ แหล่งที่มาของ heteronemin ที่มีการรายงานเป็นครั้งแรก คือฟองน้ำ *Heteronema erecta* (Kazlauskas et al, 1976; Kashman and Rudi, 1977) และยังมีการรายงานการแยกสกัดสารตัวอย่างดังกล่าวจากฟองน้ำชนิดอื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นจากฟองน้ำในสกุลต่างๆ ที่ได้รายงานไปแล้วข้างต้น



1

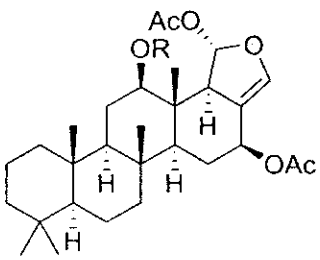
heteronemin เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับที่ดีถึงดีมาก ฤทธิ์ทางชีวภาพของ **1** ที่มีการรายงานจนถึงปัจจุบัน ส่วนใหญ่เป็นฤทธิ์ที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์เคมีบำบัด เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Doi et al, 1993; Kobayashi et al, 1994; Ryu et al, 1996; Nam et al, 2006) และฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Ledroit et al, 2004) รวมถึงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (El Sayed, 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในขณะที่ฤทธิ์ทางชีวภาพของ **1** ตามที่ได้ยกตัวอย่างไปแล้วข้างต้น แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะพัฒนาต่อไปเป็นสารกลุ่มนำเพื่อใช้เป็นยาต้านเชื้อจุลชีพหรือยาเคมีบำบัดอื่นๆ ได้เป็นอย่างดี ในทางกลับกัน **1** ก็มีข้อด้อยที่สำคัญคือระดับความเป็นพิษของสารตัวอย่าง ทั้งนี้จากรายงานผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จะพบว่าค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มะเร็งตายร้อยละ 50 (IC_{50}) อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงหรือสูงกว่าความแรงในการออกฤทธิ์เป็นสารต้านจุลชีพ ตัวอย่างเช่น จากรายงานโดย Wonganuchitmeta et al (2004) ค่า IC_{50} ของ **1** ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตามที่ใช้ในรายงานดังกล่าว (MCF-7, HeLa, HT-29, KB) อยู่ในช่วง 0.2-0.5 μM ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. tuberculosis* (MIC) ประมาณ 10 เท่า (3 μM)

ถึงแม้ว่า ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของ **1** ตามที่ได้รายงานไปข้างต้น จะเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้ไม่มีการศึกษาวิจัยถึงรูปแบบและกลไกการออกฤทธิ์ของ **1** โดยละเอียด แต่จากรายงานโดย El Sayed et al (2000) ระบุว่า สูตรโครงสร้างพื้นฐานของ **1** ยังคงมีศักยภาพและความเป็นไปได้ในการพัฒนาผ่านกระบวนการดัดแปลงสูตรโครงสร้างเพื่อลดระดับความเป็นพิษ และปรับปรุงความแรงในการออกฤทธิ์และความจำเพาะเจาะจงในการออกฤทธิ์ นอกจากนั้น จากรายงานของ Crews and Bescansa (1976) ได้ตั้งข้อสังเกตว่า หมู่แทนที่ของโครงสร้างแบบสกาลาเรน โดยเฉพาะหมู่แทนที่รอบโครงสร้างส่วนฟิวแรน/ฟิวรา-นอลอาจเป็นหมู่แทนที่ซึ่งมีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์ของ **1** และอนุพันธ์สกาลาเรนอื่นๆ ได้

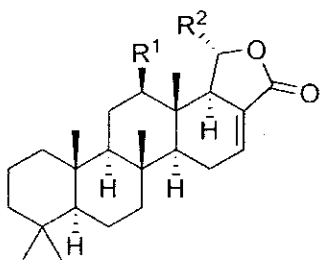
1.3. แนวความคิด และวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

จากที่ได้ระบุมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่า heteronemin และอนุพันธ์สกาลาเรนเป็นกลุ่มของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่มีศักยภาพ และยังมีความน่าสนใจที่จะคัดเลือกมาศึกษาวิจัยเพื่อหารูปแบบและกลไกการออกฤทธิ์โดยละเอียด ทั้งนี้ ถึงแม้ระดับความจำเพาะเจาะจงและการเลือกออกฤทธิ์ของ **1** จะไม่อยู่ในระดับดี แต่องค์ความรู้ที่เกิดขึ้นจากการศึกษารูปแบบการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์สกาลาเรนอื่นๆ น่าจะสามารถนำไปสู่ข้อสรุปเกี่ยวกับการคัดเลือกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรค หรือสารเคมีบำบัดอื่นๆ รวมถึงแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากทรัพยากรทางชีวภาพในทะเลไทยในฐานะของแหล่งที่มาของสารใหม่และสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาในหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ผู้วิจัยสามารถแยกสกัดอนุพันธ์สกาลาเรนและได้รายงานความแรงในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคของสารอนุพันธ์สกาลาเรนรวม 5 ชนิดได้แก่ **1**; heteronemin acetate (**2**); 12-deacetyl-12-epi-19-deoxyscalarin (**3**); 12-epi-19-deoxyscalarin (**4**) และ12-deacetoxy-scalarin acetate (**5**) (Wonganuchitmeta et al, 2003)



1; R = H
2; R = Ac



3; R^1 = OH, R^2 = H
4; R^1 = OAc, R^2 = H
5; R^1 = H, R^2 = OAc

ประเด็นที่น่าสนใจที่ได้จากข้อสรุปตามรายงานการวิจัยดังกล่าวคือ สารตัวอย่างทั้ง 5 ชนิดที่ได้รายงานข้างต้น มีความแรงและระเบียนในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน (ช่วง MIC ของการยับยั้งเชื้อวัณโรค 3-150 μM, ช่วง IC_{50} ของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 0.2 μM จนถึงเทียบเท่ากับไม่มีฤทธิ์) นอกจากนั้น จากสูตรโครงสร้างของสารตัวอย่างทั้ง 5 ชนิด ผู้วิจัยพบว่าการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของสารตัวอย่างเพียงบางตำแหน่ง มีผลต่อความแรงของการออกฤทธิ์และความจำเพาะเจาะจงของการออกฤทธิ์อย่างชัดเจน

ผลจากการศึกษาวิจัยข้างต้น เป็นที่มาของโครงการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์ของเซสเตอร์เทอร์ปีนจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล: การประเมินฤทธิ์และขอบข่ายการออกฤทธิ์ โดยได้กำหนดวัตถุประสงค์เชิงกิจกรรมของโครงการวิจัยดังต่อไปนี้

1. เพื่อเตรียมและศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีน เพื่อเติมเต็มข้อมูลในห้องสมุดสารเคมีของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนกลุ่มดังกล่าว
2. เพื่อศึกษาและประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนที่ได้ตามวัตถุประสงค์ข้อ 1 โดยเน้นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นเป้าหมายหลัก
3. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ท่างชีวภาพของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนที่ได้ และสร้างขอบข่ายฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ที่ได้ตามวัตถุประสงค์ข้อ 1

2. การทดลองและระเบียบวิธีวิจัย

2.1. สภาวะการทดลองทั่วไป

ในกรณีที่ไม่มีข้อกำหนดอื่นใด ตัวทำละลายเพื่อการแยกสกัดโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี และสารเคมีที่ใช้เพื่อการทดลองตลอดการวิจัยนี้ เป็นตัวทำละลายและสารเคมีระดับเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade) และใช้ในการศึกษาโดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมใดๆ ส่วนการสกัดแยกโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจล (Scharlau®; ขนาดอนุภาค 230-400 mesh) เป็นวัฏภาคอยู่กับที่ปกติ

ในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาเคมี ทดลองภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจนที่แห้งในภาชนะซึ่งผ่านการอบที่ 150-200 °C และเผาในเปลวไฟจากตะเกียงบุนเซนซ้ำก่อนเริ่มปฏิกิริยา เครื่องแก้วและภาชนะอื่นๆ ในการเตรียมปฏิกิริยา เป็นเครื่องแก้วที่ผ่านการอบที่ 150-200 °C หรือเป็นภาชนะใช้ครั้งเดียวและปิดกันอากาศ ตัวทำละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาเคมีผ่านเตรียมให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมก่อนใช้งานดังต่อไปนี้; เตตราไฮโดรฟิวแรน (THF) กลั่นจากระบบที่มีโลหะโซเดียม-เบนโซฟีโนน และเก็บรักษาเหนือ 4A molecular sieve; พัยริดีน กลั่นจากระบบที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเก็บรักษาเหนือโซเดียมไฮดรอกไซด์; ไดคลอโรมีเธนและอะซีโทไนไทรล์ กลั่นจากระบบที่มีแคลเซียมไฮไดรด์ และเก็บรักษาเหนือ 4A molecular sieve

สเปคโตรมิเตอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ประกอบด้วย; Jasco P-1020 spectropolarimeter (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการวัดค่าองศาการหมุนระนาบแสงจำเพาะ; Shimadzu UV-160A spectrophotometer (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) สำหรับการวัดสเปคตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต-แสงธรรมชาติ (UV); FTS FT-IR spectrophotometer (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ 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

2.2. ตัวอย่างฟองน้ำ

ฟองน้ำสกุล *Hyrtios* (วงศ์Thoractidae) ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เก็บสำรวจเมื่อเมษายน 2549 จากบริเวณรอบเกาะเต่า อ.เกาะพะงัน จ.สุราษฎร์ธานี (10° 07.6′ เหนือ 99° 48.7′ ตะวันออก) ลักษณะทั่วไปของตัวอย่างเมื่อนำขึ้นถึงผิวน้ำ ตัวอย่างฟองน้ำเป็นฟองน้ำที่ไม่มีรูปทรงแน่นอน พื้นผิวภายนอกขรุขระ เหนียวเหมือนแผ่นหนัง และเป็นปุ่มหนามขนาดเล็กกระจายทั่วไป สีภายนอกเป็นสีเทา-กากี เนื้อเยื่อภายในสีเหลือง-กากี เนื้อเหนียว ตัดผ่านได้ยาก และมีองค์ประกอบของทรายแทรกในเนื้อเยื่อซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสกุล

การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของตัวอย่างฟองน้ำ ดำเนินการโดย ดร.สมชัย บุศราวิช สถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ.ภูเก็ต ตัวอย่างอ้างอิง (PMBC 24608) เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์ของสถาบันวิจัยทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่ง และป่าชายเลน จ.ภูเก็ต

2.3. การแยกสกัด

ตัวอย่างฟองน้ำหลังทำให้แห้งโดยเทคนิคการแช่เยือกแข็งหนัก 101 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเมธานอล สารสกัดจากเมธานอลที่ได้หลังเตรียมเป็นสารสกัดแห้งแล้ว นำมาสกัดโดยเทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งทำให้ได้สารสกัดจากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเธน และเมธานอล ตามลำดับ การแยกสกัดในขั้นต่อไป เลือกเฉพาะสารสกัดจากเฮกเซนและไดคลอโรมีเธน ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นอนุพันธ์สกา-ลาเรน

การสกัดแยกสารสกัดจากเฮกเซนโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล (เฮกเซน:เอธิล-อะซีเตท:อะซีโทน 7:2:1) ทำให้สามารถแยก heteronemin (317 mg) ได้โดยตรงหลังการตกผลึกซ้ำในตัวทำละลายผสมเฮกเซน:เอธิลอะซีเตท (5;1) ส่วนสกัดจากโครมาโตกราฟีในขั้นตอนข้างต้น เมื่อรวมและแยกสกัดต่อโดยผ่านซิลิกาเจล (เฮกเซน:เอธิลอะซีเตท เพิ่มอัตราส่วนต่อเนื่องจาก 7:1 เป็น 1:1) ทำให้สามารถแยกได้สารประกอบ **6** (5 mg)

การสกัดแยกสารสกัดจากไดคลอโรมีเธนผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล (เฮกเซน:เอธิลอะซีเตท:อะซีโทน 7:2:1) ตามด้วยการตกผลึกในสภาวะเดียวกับที่ระบุข้างต้น ทำให้สามารถแยก heteronemin ได้เพิ่มอีก 1.398 g

12-epi-Deacetyl-19α-acetoxy-20α-methoxyscalaran (6). ของแข็งสีขาว; $[\alpha]_D$ +7.1 (*c* 0.21, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 208 (4.47), 218 (4.45) nm; IR (neat) ν_{max} 3444, 1734 cm^{-1}; ^1H และ ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500 MHz สำหรับ ^1H), ดูตาราง 2; HRESIMS: *m/z* $[M+Na]^+$ 483.3071 (คำนวณสำหรับ $C_{28}H_{44}O_5Na$ 483.3087).

2.4. การดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรน

heteronemin ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการดัดแปลงสูตรโครงสร้างอนุพันธ์สกาลาเรนในการวิจัยนี้ ได้จากการสกัดจากฟองน้ำ *Hyrtios* sp. ตามที่ได้ระบุข้างต้นใน 2.3. และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลทางสเปคโตรสโกปีตามที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Wonganuchitmeta et al, 2004) ระดับความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างอยู่ในระดับที่ไม่สามารถตรวจพบสัญญาณของสารปนเปื้อนได้ด้วยเทคนิคเอ็นเอ็มอาร์สเปคโตรสโกปี

12-Deacetyl-12-epi-scalaradial (7). เติม BF_3·OEt_2 (180 μL; 1.43 mmol) และน้ำประมาณ 2-3 หยดลงในสารละลายของ **1** (350 mg; 0.72 mmol) ใน MeCN (15 mL) ที่ 0 °C คนสารละลายที่ได้ที่ 0 °C ประมาณ 5-10 นาที แล้วเติมสารละลาย $NaHCO_3$ สกัดของผสมที่ได้ด้วย EtOAc และทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ SiO_2 (hexane:EtOAc:acetone 7:2:1) ซึ่งทำให้ได้ **7** (267 mg; 96%) พร้อมกับ **8** ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง; คุณสมบัติทางกายภาพ ของแข็งสีขาว; $[\alpha]_D$ +15.5 (*c* 0.13, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 225 (4.56) nm; IR (neat) ν_{max} 1745, 1704, 1233 cm^{-1}; ^1H (500 MHz; C_6D_6) δ_H 0.47 (br d, *J* = 12.5 Hz; H-9), 0.57 (dd; *J* = 11.5, 5.0 Hz; H-14), 0.61 (s; 3H; H-24), 0.63 (m; H-1a), 0.65 (dd; *J* = 8.5, 2.0 Hz; H-5), 0.69 (s; 3H; H-23), 0.74 (s; 3H; H-25), 0.80 (s; 3H; H-22), 0.87 (s; 3H; H-21), 1.12 (m; H-2a), 1.12 (ddd; *J* = 12.5, 7.0, 3.5 Hz; H-7a), 1.15 (ddd; *J* = 13.0, 11.5, 7.5 Hz; H-11a), 1.31 (m; H-3a), 1.34 (m; H-3b), 1.35 (m; H-7b), 1.38 (m; H-2b), 1.43 (ddd; *J* = 13.0, 4.0, 3.5 Hz; H-11b), 1.53 (m; H-6a), 1.56 (m; H-1b), 1.57 (m; H-6b), 1.68 (ddd; *J* = 14.0, 5.0, 2.0 Hz; H-15a), 1.72 (ddd; *J* = 14.0, 11.5, 2.5 Hz; H-15b), 3.00 (br s; H-18), 3.28 (dd; *J* = 11.5, 4.0 Hz; H-12), 6.14 (dd; *J* = 5.0, 2.5 Hz; H-16), 9.15 (s; H-20), 10.02 (d; *J* = 3.0 Hz; H-19); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 10.0 (C-25), 16.6 (C-23), 17.1 (C-24), 18.3 (C-2), 18.8 (C-6), 21.4 (C-22), 23.4 (C-15), 27.3 (C-11), 33.3 (C-4), 33.5 (C-21),

37.4 (C-8), 37.4 (C-10), 40.0 (C-1), 41.3 (C-3), 42.4 (C-7), 43.7 (C-13), 52.9 (C-14), 56.3 (C-5), 57.9 (C-9), 60.7 (C-18), 80.8 (C-12), 139.8 (C-17), 151.3 (C-16), 192.2 (C-20), 202.7 (C-19); HREIMS *m/z* $[M]^+$ 386.2818 (คำนวณสำหรับ $C_{25}H_{38}O_3$ 386.2821).

12-Deacetyl-12,18-di-epi-scalaradial (8). ของแข็งสีขาว; $[\alpha]_D$ +172.6 (*c* 0.15, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 226 (3.86) nm; IR (neat) ν_{max} 1732, 1718, 1264 cm^{-1}; ^1H (500 MHz; C_6D_6) δ_H 0.50 (dd, *J* = 9.5, 2.0 Hz; H-9), 0.53 (dd; *J* = 9.5, 2.0 Hz; H-5), 0.56 (m; H-1a); 0.57 (m; H-7a), 0.59 (s; 3H; H-24), 0.68 (s; 3H; H-25), 0.70 (s; 3H; H-23), 0.80 (s; 3H; H-22), 0.86 (s; 3H; H-21), 1.11 (m; H-3a), 1.15 (m; H-6a), 1.18 (m; H-11a), 1.26 (m; H-11b), 1.29 (dd; *J* = 11.0, 5.5 Hz; H-14), 1.33 (m; H-7b), 1.35 (m; H-6b), 1.36 (m; H-3b), 1.37 (m; H-2a); 1.46 (br d; *J* = 13.5 Hz; H-1b), 1.55 (qt; *J* = 13.5, 4.0 Hz; H-2b), 1.65 (m; H-15a), 1.90 (dt; *J* = 20.5, 5.5 Hz; H-15b), 3.31 (dd; *J* = 11.0, 4.0 Hz; H-12), 3.89 (br s; H-18), 6.21 (dd; *J* = 5.0, 2.5 Hz; H-16), 9.21 (s; H-20), 10.00 (d; *J* = 2.5 Hz; H-19); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 15.9 (C-25), 16.8 (C-24), 16.9 (C-23), 18.2 (C-6), 18.3 (C-2), 21.5 (C-22), 23.9 (C-15), 27.0 (C-11), 33.3 (C-4), 33.3 (C-21), 37.3 (C-8), 37.4 (C-10), 39.8 (C-1), 41.0 (C-7), 42.1 (C-3), 43.5 (C-13), 48.0 (C-14), 55.3 (C-18), 55.9 (C-5), 58.0 (C-9), 75.5 (C-12), 137.9 (C-17), 151.2 (C-16), 192.0 (C-20), 202.0 (C-19); HREIMS: *m/z* $[M]^+$ 386.2803 (คำนวณสำหรับ $C_{25}H_{38}O_3$ 386.2821).

12-Deacetyl-12-epi-deoxoscalarin (9). เติมสารละลาย LAH (2.0 M ใน THF, 0.6 mL; 0.59 mmol) ลงในสารละลาย **7** (38 mg; 0.098 mmol) ใน THF (10 mL) และรีฟลักซ์สารละลายที่ได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เติม EtOAc (20 mL) ตามด้วยน้ำ (10 mL) ขณะคนสารละลายอย่างรุนแรง ระเหยไล่ตัวทำละลายและทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ของ SiO_2 (hexane:EtOAc 7:3) ซึ่งทำให้ได้ **9** (4 mg; 11%); คุณสมบัติทางกายภาพ ของแข็งสีขาว $[\alpha]_D$ +77.0 (*c* 0.17, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 207 (3.88), 224 (3.69), 273 (3.24) nm; IR (neat) ν_{max} 3400, 1453, 1394 cm^{-1}; ^1H (500 MHz; C_6D_6) δ_H 0.77 (dd; *J* = 11.0, 2.5 Hz; H-5), 0.78 (m; H-1a), 0.78 (s; 3H; H-22), 0.81 (s; 3H; H-25), 0.82 (s; 3H; H-21), 0.85 (m; H-3a), 0.87 (m; H-9), 0.89 (s; 3H, H-23), 0.90 (s; 3H; H-24), 1.00 (d; *J* = 11.0, 6.0 Hz; H-14), 1.11 (m; H-7a), 1.33 (m; H-2a), 1.34 (m; H-7b), 1.38 (m; H-6a), 1.42 (q; *J* = 12 Hz; H-11a), 1.50 (m; H-2b), 1.58 (m; H-6b), 1.66 (m; H-3b), 1.69 (m; H-11b), 1.70 (m; H-1b), 1.98 (m; H-15a), 2.04 (m; H-

15b), 2.19 (br s; H-18), 3.50 (dd; J = 12.0, 4.0 Hz; H-12), 4.18 (br d; J = 12.0 Hz; H-20a), 4.50 (d; J = 12.0 Hz; H-20b), 5.25 (d; J = 6.5 Hz; H-19), 5.48 (br s; H-16); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 8.7 (C-25), 16.5 (C-23), 17.0 (C-24), 18.1 (C-2), 18.6 (C-6), 21.3 (C-22), 22.1 (C-15), 25.8 (C-11), 33.3 (C-4), 33.4 (C-21), 37.4 (C-8), 37.4 (C-10), 39.9 (C-13), 39.9 (C-1), 39.9 (C-13), 41.6 (C-3), 42.1 (C-7), 53.3 (C-14), 56.5 (C-5), 58.8 (C-9), 60.8 (C-18), 68.7 (C-20), 81.2 (C-12), 99.5 (C-19), 117.2 (C-16), 135.0 (C-17); HRESIMS: *m/z* $[M+Na]^+$ 411.2866 (คำนวณสำหรับ $C_{25}H_{40}O_3Na$ 411.2875)

Heteronemin acetate (2). คนสารละลายของ **1** (30 mg; 0.06 mmol) และ Ac_2O (2 mL; 21.2 mmol) ใน pyridine (1 mL) นาน 18 ชั่วโมง ระเหยไล่ตัวทำละลายและแยกสกัดตัวอย่างโดยโครมาโตกราฟีผ่านคอลัมน์ SiO_2 (hexane:EtOAc 7:3) ซึ่งทำให้ได้ **2** (26 mg; 79%); คุณสมบัติทางกายภาพ ของแข็งสีขาว $[\alpha]_D$ -155.9 (*c* 0.32, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 212 (4.48) nm; IR (neat) ν_{max} 1741, 1237, 1023 cm^{-1}; ^{1}H (500 MHz; C_6D_6) δ_H 0.47 (m; H-7a), 0.55 (m; H-9), 0.57 (s; 3H; H-24), 0.58 (m; H-14),0.61 (m; H-5), 0.62 (s; 3H; H-23), 0.71 (m; H-1a), 0.76 (s; 3H; H-22), 0.87 (s; 3H; H-21), 0.93 (s; 3H; H-25), 1.17 (m; H-2a), 1.17 (m; H-3a), 1.22 (m; H-11a), 1.25 (m; H-15a), 1.28 (m; H-6a), 1.32 (m, H-3b), 1.34 (m; H-2b), 1.37 (m; H-1b), 1.46 (m; H-7b), 1.48 (m; H-6b), 1.67 (m; H-11b), 1.69 (s; 3H; 16-OCOCH_3), 1.70 (s; 3H; 19-OCOCH_3), 1.97 (s; 3H; 12-OCOCH_3), 2.00 (ddd; J = 12.0, 7.5, 2.0 Hz; H-15b), 2.59 (br s; H-18), 4.67 (dd; J = 11.2, 4.4 Hz; H-12), 5.48 (dd; J = 11.0, 6.0 Hz; H-16), 6.21 (t; J = 2.0 Hz; H-20), 7.08 (d; J = 2.0; H-19); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 10.0 (C-25), 16.4 (C-23), 17.3 (C-24), 18.2 (C-2), 18.8 (C-6), 20.5 (16-OCOCH$_3$), 20.6 (16-OCOCH$_3$), 21.2 (12-OCOCH$_3$), 21.3 (C-22), 24.0 (C-11), 27.8 (C-15), 33.3 (C-4), 33.4 (C-21), 37.4 (C-8), 37.8 (C-10), 39.7 (C-1), 40.8 (C-13), 41.4 (C-7), 42.2 (C-3), 54.6 (C-14), 56.1 (C-5), 57.6 (C-9), 62.3 (C-18), 69.3 (C-16), 82.2 (C-12), 98.8 (C-19), 113.6 (C-17), 136.2 (C-20), 169.3 (16-OCOCH$_3$), 169.7 (19-OCOCH$_3$), 169.9 (12-OCOCH$_3$); HRESIMS: *m/z* $[M+Na]^+$ 553.3121 (คำนวณสำหรับ $C_{31}H_{46}O_7Na$ 553.3142).

12-epi-Scalaradial (10). สภาวะปฏิกิริยาอะเซติเลชั่นของ **7** (23 mg; 0.059 mmol) เป็นเช่นเดียวกับที่บรรยายในขั้นตอนการเตรียม **2** การเตรียมสารบริสุทธิ์ใช้โครมาโตกราฟีผ่านคอลัมน์ SiO_2 (hexane:EtOAc 17:3) ซึ่งทำให้ได้ **10** (8 mg; 31%); คุณสมบัติทางกายภาพ ของแข็งสีขาว $[\alpha]_D$ +46.5 (*c* 0.28, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 210 (3.14), 223 (3.18) nm; IR (neat) ν_{max} 1735, 1241 cm^{-1}; ^{1}H (500 MHz; C_6D_6)

δ_H 0.45 (ddd; J = 16.5, 13.5, 3.5 Hz; H-7a), 0.61 (m; H-14), 0.61 (s; 3H; H-24), 0.62 (dd; J = 12.0, 2.5 Hz; H-5), 0.65 (s; 3H; H-23), 0.69 (m; H-9), 0.75 (m; H-1a), 0.78 (s; 3H; H-22), 0.85 (s; 3H; H-25), 0.87 (s; 3H; H-21), 1.08 (m; H-3a), 1.10 (m; H-6a), 1.15 (ddd; J = 13.0, 12.0, 12.0 Hz; H-11a), 1.28 (m; H-7b), 1.32 (m; H-3b), 1.35 (m; H-2a), 1.39 (m; H-6b), 1.47 (m; H-2b), 1.51 (m; H-1b), 1.65 (ddd; J = 15.5, 12.0, 3.0 Hz; H-15a), 1.68 (ddd; J = 15.5, 4.0, 3.5 Hz; H-15b), 1.78 (s; 3H; 12-OCOCH_3), 1.85 (ddd; J = 13.0, 4.5, 2.0 Hz; H-11b), 2.97 (br d; J = 2.0 Hz; H-18), 4.75 (dd; J = 12.0, 4.5 Hz; H-12), 6.05 (dd; J = 4.0, 3.0 Hz; H-16), 9.09 (s; H-20), 9.85 (d; J = 4.0 Hz; H-19); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 11.0 (C-25), 16.6 (C-23), 16.9 (C-24), 18.2 (C-6), 18.7 (C-2), 20.9 (12-OCOCH_3), 21.4 (C-22), 23.3 (C-15), 23.7 (C-11), 33.3 (C-21), 33.4 (C-4), 37.3 (C-8), 37.4 (C-10), 39.6 (C-1), 41.1 (C-13), 41.2 (C-3), 42.0 (C-7), 52.8 (C-14), 56.2 (C-5), 57.2 (C-9), 60.2 (C-18), 81.7 (C-12), 139.4 (C-17), 151.2 (C-16), 169.6 (12-OCOCH$_3$), 191.7 (C-20), 199.0 (C-19); HRESIMS: *m/z* $[M+Na]^+$ 451.2837 (คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{40}O_4Na$, 451.2877).

12-Oxoheteronemin (11). เติม **1** (50 mg, 0.10 mmol) ลงในของผสมของ PCC/SiO_2 (1:1; 43 mg, 0.20 mmol ของ PCC) ใน CH_2Cl_2 (5 mL) และคนของผสมที่ได้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2.5 ชั่วโมง กรองของผสมผ่าน celite และล้างด้วย Et_2O (50 mL) ทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ SiO_2 (hexane:EtOAc:acetone 7:2:1) ซึ่งทำให้ได้ **10** (49 mg; 98%); คุณสมบัติทางกายภาพ ของแข็งสีขาว; $[\alpha]_D$ +2.4 (*c* 0.15, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 220 (4.41) nm; IR (neat) ν_{max} 3485, 1736, 1242, 752 cm^{-1}; ^{1}H (500 MHz; C_6D_6) δ_H 0.46 (dd; J = 12.0, 2.5 Hz; H-5), 0.52 (m; H-1a), 0.53 (s; 3H; H-23), 0.55 (s; 3H; H-24), 0.69 (dd; J = 14.0, 2.5 Hz; H-9), 0.73 (s; 3H; H-22), 0.76 (s; 3H; H-25), 0.84 (s; 3H; H-21), 0.85 (dd; J = 12.0, 2.5 Hz; H-14), 1.00 (m; H-3a), 1.04 (m; H-6a), 1.23 (m; H-6b), 1.23 (m; H-15a), 1.25 (m; H-2a), 1.28 (m; H-7a), 1.29 (m; H-1b), 1.31 (m, H-3b), 1.37 (m; H-7b), 1.41 (m; H-2b), 1.69 (s; 3H; 19-OCOCH_3), 1.78 (s; 3H; 16-OCOCH_3), 1.95 (dt; J = 6.5, 2.5 Hz; H-15b), 2.05 (t; J = 14.0 Hz; H-11a), 2.12 (dd; J = 14.0, 2.5 Hz; H-11b), 3.06 (d; J = 1.0 Hz; H-18), 5.43 (m; H-16), 6.26 (dd; J = 2.0, 1.0 Hz; H-20), 7.11 (d; J = 2.0; H-19); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 13.1 (C-25), 15.3 (C-23), 16.6 (C-24), 18.0 (C-2), 18.6 (C-6), 20.5 (19-OCOCH$_3$), 20.7 (16-OCOCH$_3$), 21.3 (C-22), 27.8 (C-15), 33.2 (C-4), 33.3 (C-21), 35.1 (C-11), 37.7 (C-8), 37.9 (C-10), 39.2 (C-1), 41.1 (C-7), 42.0 (C-3), 50.0 (C-13), 54.4 (C-9), 55.9 (C-

5), 56.0 (C-14), 56.8 (C-18), 69.2 (C-16), 99.4 (C-19), 113.0 (C-17), 137.0 (C-20), 169.3 (19-$OCOCH_3$), 169.3 (16-$OCOCH_3$), 213.1 (C-12); HREIMS: *m/z* $[M-C_2H_4O_2]^+$ 426.2788 (คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{38}O_4$ 426.2770).

12-Deacetyl-12-oxo-scalaradial (12). สภาวะของปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ **7** (30 mg; 0.130 mmol) เป็นเช่นเดียวกับที่รายงานการเตรียม **11** การเตรียมตัวอย่างให้บริสุทธิ์อาศัยโครมาโตกราฟีผ่านคอลัมน์ SiO_2 (hexane:EtOAc:acetone 7:2:1) ซึ่งทำให้ได้ **12** (26 mg; 87%); คุณสมบัติทางกายภาพ ของแข็งสีขาว; $[\alpha]_D$ +90.2 (*c* 0.12, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 223 (5.02) nm; IR (neat) ν_{max} 1702 cm^{-1}; ^1H (500 MHz; C_6D_6) δ_H 0.39 (m; H-1a), 0.51 (m; H-5), 0.54 (s; 3H; H-23), 0.58 (s; 3H; H-24), 0.72 (dd, *J* = 11.4, 2.1 Hz; H-9), 0.75 (s; 3H; H-22), 0.83 (s; 3H; H-21), 0.85 (m; H-14), 0.87 (s; 3H; H-25), 1.01 (m; H-3a), 1.12 (m; H-7a), 1.17 (m; H-6a), 1.21 (m; H-2a), 1.26 (m; H-7b), 1.31 (m; H-1b), 1.38 (m; H-3b), 1.45 (m; H-2b), 1.47 (m; H-6b), 1.58 (m; H-15a), 1.72 (m; H-15b), 2.00 (t; *J* = 4.1 Hz; H-11a), 2.18 (dd; *J* = 4.2, 2.0 Hz; H-11b), 3.70 (br d; *J* = 1.7 Hz; H-18), 6.02 (br t; *J* = 2.7 Hz; H-16), 9.14 (s; H-20), 10.76 (d; *J* = 1.9 Hz; H-19); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 15.1 (C-25), 15.6 (C-23), 16.2 (C-24), 18.0 (C-2), 18.5 (C-6), 21.4 (C-22), 23.1 (C-15), 33.2 (C-21), 33.4 (C-4), 35.0 (C-11), 37.1 (C-8), 37.7 (C-10), 39.2 (C-1), 41.0 (C-7), 42.0 (C-3), 53.3 (C-13), 53.9 (C-18), 54.6 (C-14), 56.1 (C-5), 58.5 (C-9), 142.0 (C-17), 148.8 (C-16), 191.5 (C-20), 200.2 (C-19), 212.6 (C-12); HREIMS: *m/z* $[M]^+$ 384.2668 (คำนวณสำหรับ $C_{25}H_{36}O_3$ 384.2664)

ปฏิกิริยาพัยโรลัยซิสของ 1. ไล่อากาศออกจากภาชนะบรรจุ **1** (30 mg, 0.061 mmol) โดยการแทนที่ด้วยไนโตรเจนแห้ง และให้ความร้อนที่ 220 °C นาน 2.5 นาที เมื่อครบกำหนด ปล่อยให้ตัวอย่างเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง และสกัดแยกตัวอย่างผ่านคอลัมน์ SiO_2 (hexane:EtOAc 4:1) ซึ่งทำให้แยกได้ **13**, **14** และ **8** (4 mg, 16%; 2 mg, 8%; และ 4 mg, 17%, ตามลำดับ).

Scalarafuran (13). ของแข็งสีขาว; $[\alpha]_D$ +8.6 (*c* 0.21, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 206 (3.50), 278 (2.90) nm; IR (neat) ν_{max} 1457, 1265 cm^{-1}; ^1H (500 MHz; C_6D_6) δ_H 0.49 (m; H-1a), 0.49 (dd; *J* = 12.5, 2.0 Hz; H-14), 0.53 (m; H-3a), 0.60 (dd; *J* = 12.5, 2.0 Hz; H-5), 0.67 (s; 3H; H-24), 0.71 (s; 3H; H-23), 0.82 (s; 3H; H-22), 0.85 (m; H-9), 0.90 (s; 3H; H-21), 1.11 (m; H-7a), 1.14 (m; H-11a), 1.18

(m; H-15a), 1.18 (s; 3H; H-25), 1.32 (m; H-11b), 1.35 (m; H-7b), 1.40 (m: H-2a), 1.43 (m: H-6a), 1.51 (m; H-1b), 1.53 (m; H-3b), 1.60 (m; H-2b), 1.67 (s; 3H; 16-OCOCH_3), 1.68 (m; H-6b), 2.09 (ddd; J = 12.0, 7.5, 2.0 Hz; H-15b), 3.27 (br d; J = 11.0 Hz; H-12), 5.97 (dd; J = 12.0, 2.0 Hz; H-16), 7.48 (t; J = 1.5 Hz; H-20), 7.80 (d; J = 2.0 Hz; H-19); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 16.3 (C-24), 17.5 (C-23), 18.3 (C-2), 18.8 (C-6), 18.9 (C-25), 20.9 (16-OCOCH_3), 21.4 (C-22), 25.0 (C-15), 27.8 (C-11), 33.3 (C-4), 33.5 (C-21), 37.3 (C-8), 37.5 (C-10), 39.9 (C-1), 40.4 (C-13), 41.4 (C-3), 42.4 (C-7), 53.8 (C-9), 56.4 (C-5), 58.1 (C-14), 68.3 (C-16), 79.2 (C-12), 121.8 (C-18), 135.3 (C-17), 137.8 (C-19), 139.6 (C-20), 170.5 (16-OCOCH$_3$); HREIMS: m/z [M]$^+$ 428.2965 (คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{40}O_4$ 428.2986).

16-Deacetyl-15,16-dehydroscalarafuran (14). ของแข็งสีขาว; $[\alpha]_D$ +15.3 (c 0.21, $CHCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 208 (3.41), 218 (3.44), 273 (2.46) nm; IR (neat) ν_{max} 3443, 1735, 1046 cm^{-1}; ^{1}H (500 MHz; C_6D_6) δ_H 0.60 (dd; J = 12.5, 2.5 Hz; H-5), 0.61 (m; H-1a), 0.61 (dd; J = 13.0, 2.0 Hz; H-9), 0.65 (m; H-6a), 0.65 (m; H-7a), 0.74 (s; 3H; H-23), 0.82 (s; 3H; H-22), 0.85 (s; 3H; H-21), 0.85 (s; 3H; H-24), 1.08 (s; 3H; H-25), 1.13 (m; H-11a), 1.24 (m; H-2a), 1.31 (m; H-3a), 1.38 (m; H-6b), 1.40 (m; H-2b), 1.42 (m; H-11b), 1.49 (m; H-3b), 1.53 (m; H-1b), 1.70 (m; H-7b), 1.81 (t; J = 3.3 Hz; H-14), 3.62 (br d; J = 8.5 Hz; H-12), 5.68 (dd; J = 9.5, 3.0 Hz; H-15), 6.43 (dd; J = 9.5, 3.0 Hz; H-16), 7.09 (d; J = 1.5 Hz; H-20), 7.71 (d; J = 1.5 Hz; H-19); ^{13}C NMR (125 MHz; C_6D_6) δ_C 16.3 (C-23), 16.3 (C-25), 18.1 (C-2), 18.6 (C-24), 18.9 (C-6), 21.5 (C-22), 27.9 (C-11), 33.3 (C-4), 33.5 (C-21), 36.9 (C-8), 37.5 (C-10), 39.9 (C-1), 40.9 (C-13), 41.0 (C-7), 42.3 (C-3), 56.5 (C-5), 56.9 (C-14), 57.9(C-9), 78.3 (C-12), 119.5 (C-16), 121.5 (C-17), 127.4 (C-15), 133.4 (C-18), 136.1 (C-20), 136.6 (C-19); HREIMS: m/z [M]$^+$ 368.2710 (คำนวณสำหรับ $C_{25}H_{36}O_2$ 368.2715).

2.5. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดำเนินการศึกษาวิจัยตามโครงการวิจัยนี้ ประกอบด้วยการศึกษาฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้ สำหรับในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคตามที่จะได้รายงานต่อไป ขอรับบริการจากหน่วยปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพกลาง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ

แห่งชาติ วิธีการทดสอบซึ่งดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ใช้วิธีการทดสอบโดยเทคนิค microtiter-plate alamar blue assay ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อมัยโคแบคทีเรีย (Collins and Franzblau, 1997) โดยเพาะ *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Ra$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7H9GC (0.1 mL; ปริมาณเชื้อในขั้นสุดท้าย 5×10^4 CFU/mL) สารตัวอย่างเพื่อทดสอบละลายใน 7H9GC (ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายร่วม) และเจือจางครั้งละ 2 เท่าด้วย 7H9GC เริ่มต้นจาก 200 μg/mL บ่มเชื้อที่ 37 °C นาน 4 วัน แล้วเติมสารละลาย 10% alamar blue (20 μL) และ tween80 (20 μL) บ่มเชื้อต่อที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง ติดตามการเปลี่ยนสีของสารละลายจากน้ำเงินเป็นชมพูเปรียบเทียบระหว่างสารละลายที่มีเชื้อและสารละลายที่ไม่มีเชื้อ และใช้ isoniazid, rifampicin และ kanamycin เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC) คือความเข้มข้นสุดท้ายที่สารละลายตัวอย่างยังคงสีน้ำเงิน หรือไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพู

ในการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดำเนินการทดสอบโดยใช้ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากช่องปากเป็นตัวแทนของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติตามลำดับ และใช้ camptothecin เป็นสารต้านมะเร็งมาตรฐานเพื่อการอ้างอิง โดยใช้วิธี sulphorrhodamine B assay (Skehan et al, 1990) ในการทดสอบ วิธีการทดสอบโดยย่อ ประกอบด้วยการนำเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษาจากเดิมซึ่งอยู่ในรูปของเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย (cell suspension culture) ที่ทราบจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงแน่นอนแล้ว (ตรวจสอบโดยวิธี MTT assay และใช้ cell cytometer เพื่อนับจำนวน) มาเพาะเลี้ยงในถาดหลุมจนกระทั่งเซลล์เพาะเลี้ยงเรียงตัวและเกาะผนังของหลุมเป็นชั้นเดียว (monolayer cell culture; จำนวนเซลล์ต่อหลุมประมาณ 2×10^3 เซลล์)เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในตัวกลางเพาะเลี้ยงตามอ้างถึงในเอกสารอ้างอิง ให้เซลล์ได้สัมผัสสารตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ล้างตัวกลางที่มีสารละลายตัวอย่างออกและเปลี่ยนเป็นตัวกลางใหม่ เพาะเลี้ยงเซลล์เป้าหมายต่ออีก 72 ชั่วโมง ตรึงเซลล์ด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติก และย้อมสีเซลล์ด้วยสารละลาย sulphorhodamine B ชะสีส่วนที่ติดเซลล์ให้อยู่ในรูปสารละลายและวัดความเข้มของการดูดกลืนแสงที่ 492 nm แปลผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์จากค่าความเข้มในการดูดกลืนแสงและรายงานผลในรูป IC_{50}

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยตามโครงการ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์ของเซสเตอร์เทอร์ปีนจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล: การประเมินฤทธิ์และขอบข่ายการออกฤทธิ์ นี้ ประกอบด้วยกิจกรรมการวิจัยใน 3 ส่วนหลัก ได้แก่ การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนกลุ่มสกาลาเรนจากฟองน้ำ *Hyrtios* sp. การดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรนโดยใช้ heteronemin เป็นสารตั้งต้นเพื่อเพิ่มจำนวนชนิดของอนุพันธ์สกาลาเรนที่โครงการวิจัยนี้ และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่ได้ทั้งจากการแยกสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและจากการดัดแปลงโครสร้างทางเคมี ซึ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. tuberculosis* $H_{37}Ra$ และการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง อันได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเยื่อบุช่องปาก

3.1. การแยกสกัดและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรน

การแยกสกัดอนุพันธ์สกาลาเรนที่ใช้ในการวิจัยนี้ ใช้ตัวอย่างฟองน้ำ *Hyrtios* sp ซึ่งได้จากการเก็บสำรวจตัวอย่างสัตว์ทะเลจากบริเวณรอบเกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี สารสกัดจากฟองน้ำที่ใช้ในการศึกษาได้จากการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและไดคลอโรมีเธน

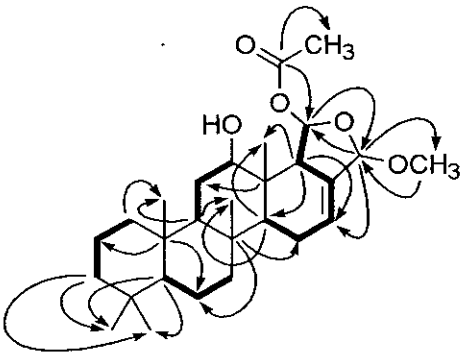
สาร **1** แยกได้จากสารสกัดเฮกเซนและจากสารสกัดไดคลอโรมีเธนโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี (ซิลิกาเจล; เฮกเซน:เอธิลอะซีเตท:อะซีโทน 7:2:1) ตามด้วยการตกผลึกซ้ำ ปริมาณที่สกัดได้สำหรับสาร **1** ทั้งจากสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเธน รวม 1.71 g (คิดเป็นร้อยละ 1.69 ของน้ำหนักตัวอย่างฟองน้ำหลังเตรียมแห้ง) การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของ **1** โดยการวิเคราะห์ทางสเปคโตรสโกปีเปรียบเทียบกับข้อมูลทางสเปคโตรสโกปีตามรายงานที่มีมาก่อนนี้ สามารถสรุปได้ว่า **1** คือ heteronemin (Wonganuchitmeta et al, 2004)

สาร **6** แยกได้จากสารสกัดเฮกเซน หลังจากที่แยกสาร **1** ตามขั้นตอนที่ระบุข้างต้น ตามด้วยการรวบรวมส่วนสกัดส่วนที่เหลืออยู่เพื่อแยกซ้ำด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (ซิลิกาเจล; เฮกเซน:เอธิลอะซีเตท 7:3 ไปเป็น 1:1) ทำให้ได้ **6** รวม 5 mg (คิดเป็นร้อยละ 0.005 ของน้ำหนักฟองน้ำ)

สูตรโมเลกุลของ **6** ตามที่สามารถสรุปได้จากสัญญาณของ $[M+Na]^+$ ที่ *m/z* 483 ในแมสสเปคตรัมแบบ ESI คือ $C_{28}H_{44}O_5$ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สัญญาณในแมสสเปคตรัมความไวสูงซึ่งให้สัญญาณ $[M+Na]^+$ ที่ *m/z* 483.3081 (คำนวณสำหรับ $C_{28}H_{44}O_5Na$ 483.3087) สูตรโมเลกุลตามที่เสนอให้ค่าสมมูล

พันธะคู่เป็น 7 ทั้งนี้ตามข้อมูลจากสเปคตรัม NMR (δ_C 121.8, C-16; 135.8, C-17; และ 171.0, C-26) และจากสเปคตรัม IR (ν 1734 cm^{-1}) แสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่างมีจำนวนหมู่โอเลฟิน 1 หมู่และหมู่เอสเทอร์ 1 หมู่ ทำให้สามารถเสนอได้ว่า สารตัวอย่างมีจำนวนระบบวงแหวนรวม 5 วง

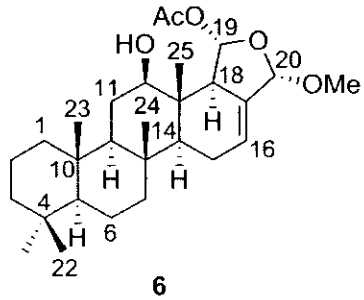
เมื่อเปรียบเทียบสเปคตรัม NMR ของสาร **1** และ **6** ร่วมกับการวิเคราะห์สเปคตรัมในเทคนิค $^1H,^1H$-COSY และ HMBC (รูปที่ 1) ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสาร **6** เป็นอนุพันธ์สกาลาเรนเช่นเดียวกับ **1** และ ช่วยให้สามารถเสนอสูตรโครงสร้างแกนของ **6** ในรูปของอนุพันธ์เตตราซัยคลิกเซสเตอร์เทอร์ปีนซึ่งประกอบด้วยคาร์บอนในตำแหน่งที่ 1 ถึง 18 พร้อมกับหมู่เมธิลซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของเซสเตอร์เทอร์ปีนในกลุ่มสกาลาเรนทั้ง 5 หมู่ (C-21 – C-25) การวิเคราะห์เรโซแนนซ์จากสเปคตรัม NMR ในเทคนิค HMBC ยังช่วยให้สามารถกำหนดตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชั่นหลักซึ่งแทนที่บนโครงสร้างแกนนี้ อันได้แก่หมู่โอเลฟินที่ C-16 และ C-17 (δ_H 5.79, dd, J = 6.5, 3.0 Hz, H-16; และ δ_C 121.8, C-16; 135.8, C-17) และหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-12 (δ_H 3.38, dd, J = 12.0, 4.5 Hz, H-12; และ δ_C 80.5, C-12)



รูปที่ 1. ความสัมพันธ์ระหว่าง ^1H – ^1H (เส้นทึบ) และ ^{13}C – ^1H (C ⟶ H) จากสเปคตรัม $^1H,^1H$-COSY และ HMBC ของ **6**

ข้อมูลจากสเปคตรัม HMBC และ $^1H,^1H$-COSY ช่วยให้กำหนดตำแหน่งของคาร์บอนแบบอะซีทาล (δ 99.6, C-19; และ 104.6, C-20; การคัปปลิงบนสเปคตรัม HMBC จาก C-16, C-17, C-18, และ C-19 ไปยัง H-20, และจาก C-20 ไปยัง H-19) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของวงแหวนเตตราไฮโดรฟิวแรนที่ต่อขยายโครงสร้างจากวงแหวน D ผลจากการวิเคราะห์สเปคตรัม HMBC ระบุหมู่แทนที่บนคาร์บอนทั้ง 2 ตำแหน่งของวงแหวนฟิวแรนดังกล่าว เป็นหมู่อะซีทอกซีซึ่งแทนที่บนคาร์บอนตำแหน่ง 19 (δ_H 2.04, s, 3H, 19-OCOC*H*$_3$; δ_C 171.0, 19-OCOCH$_3$; และ 21.3, 19-OCOCH$_3$) และหมู่เมธอกซีบนคาร์บอนตำแหน่ง 20 (δ_H 3.32, s, 3H, 20-OC*H*$_3$; δ_C 54.6, 20-OCH$_3$) จากการวิเคราะห์สเปคตรัมของ **6** ทำให้สามารถเสนอสูตร

โครงสร้างได้เป็น 12-epi-deacetyl-19α-acetoxy-20α-methoxyscalaran ซึ่งเป็นสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรนชนิดใหม่ที่รายงานเป็นครั้งแรกตามโครงการวิจัยนี้ ข้อมูลจากสเปคตรัม NMR ตามระบุข้างต้น สรุปตามตารางที่ 2



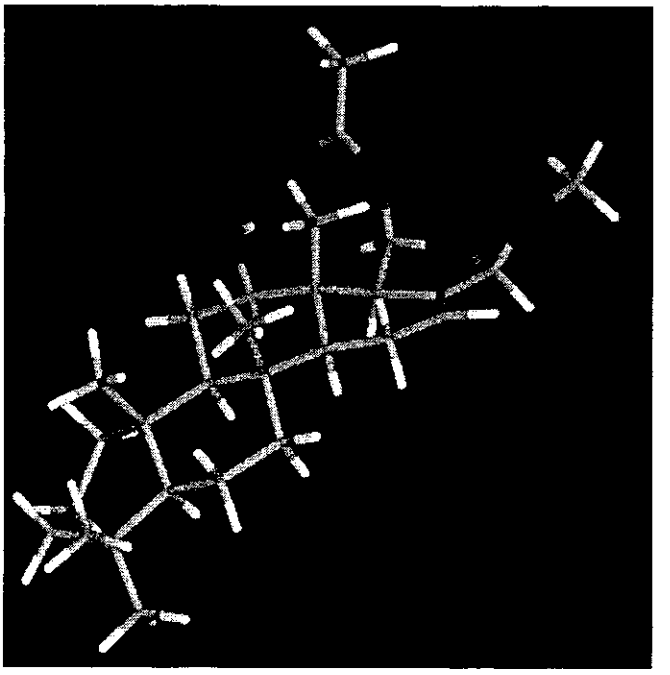
6

การวิเคราะห์คอนฟิกิวเรชั่นแบบสัมพันธ์ของ **6** ในส่วนโครงสร้างแกนเตตราคาร์โบซัยคลิก เสนอเป็นคอนฟิกิวเรชั่นของวงแหวนแบบทรานซ์ต่อเนื่องกันทั้ง 4 วง ทั้งนี้ โดยอาศัยผลการวิเคราะห์ค่าเคมิคัลชิฟต์ของหมู่เมธิลที่ตำแหน่ง 22 ถึง 25 ซึ่งเป็นค่าเฉพาะตัวของหมู่เมธิลแบบแอกเซียลที่จุดเชื่อมต่อระหว่างวงแหวน (δ 21.3, C-22; 16.5, C-23; 17.3, C-24; และ 8.8, C-25, ตามลำดับ; Crews and Bescansa, 1986) และกำหนดตำแหน่งวางตัวของหมู่เมธิลทั้ง 4 หมู่ข้างต้นในตำแหน่ง β เช่นเดียวกับ **1** ซึ่งเป็นโครงสร้างต้นแบบของสกาลาเรนที่ได้จากแหล่งในธรรมชาติเดียวกัน ส่วนการวิเคราะห์คอนฟิกิวเรชั่นของวงแหวนฟิวแรน อาศัยการวิเคราะห์ผลการทดลองแบบ nOe-ds ซึ่งแสดงการคัปปลิงแบบไดโพลาร์ระหว่างโปรตอนในตำแหน่ง 19, 20 และ 25 และแสดงให้เห็นว่าโปรตอนทั้ง 3 ตำแหน่งวางในระนาบเดียวกัน คือ ระนาบ β (อ้างอิงตามผลการวิเคราะห์คอนฟิกิวเรชั่นของหมู่เมธิลตำแหน่ง 25) ในลักษณะเดียวกัน ผลของการคัปปลิงแบบไดโพลาร์ระหว่างโปรตอนตำแหน่ง 12, 14 และ 18 ทำให้สามารถระบุได้ว่าโปรตอนทั้ง 3 ตำแหน่งวางอยู่ในระนาบเดียวกันคือ ตำแหน่ง α (อ้างอิงถึงตำแหน่งของโปรตอน 14 ซึ่งวางอยู่ในระนาบ α ตามคอนฟิกิวเรชั่นของวงแหวนแบบทรานซ์) การคัปปลิงแบบอัลลิลิกระหว่าง H-16 และ H-18 (J = 3 Hz) และการหายไปของการคัปปลิงในลักษณะเดียวกันระหว่าง H-16 และ H-20 ช่วยให้สรุปคอนฟอร์เมชั่นของโปรตอนบนตำแหน่ง 18 ได้ว่าเป็นแบบแอกเซียล ในขณะที่โปรตอนตำแหน่ง 20 เป็นแบบซูโดอิเควทอเรียล ทั้งนี้ คอนฟอร์เมชั่นของโปรตอนทั้ง 2 ตำแหน่งตามที่เสนอ สอดคล้องกับผลการคำนวณ MM2 ของ **6** (รูปที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นค่าประมาณมุมอัลลิลิกของ H-18 ที่ 154° และมุมอัลลิลิกของ H-20 ที่ 72°

ตารางที่ 2. ค่าเคมิคัลชิฟต์ของ ^{1}H และ ^{13}C ของ **6** (500 MHz สำหรับ ^{1}H; C_6D_6)

ตำแหน่งที่	^{1}H (mult)[a]	^{13}C (mult)
1	0.81 (m); 1.56 (m)	39.9 (CH_2)
2	1.29 (m); 1.45 (m)	18.0 (CH_2)
3	1.07 (dt, *J* = 3.5, 13.0 Hz); 1.24 (m)	41.3 (CH_2)
4	-	33.3 (C)
5	0.72 (dd; *J* = 14.0, 2.0 Hz)	56.4 (CH)
6	1.26 (m); 1.40 (m)	18.5 (CH_2)
7	0.85 (m); 1.51 (m)	42.0 (CH_2)
8	-	37.3 (C)
9	0.86 (m)	58.6 (CH)
10	-	37.5 (C)
11	1.33 (m); 1.64 (m)	27.6 (CH_2)
12	3.38 (dd; *J* = 12.0, 4.5 Hz)	80.5 (CH)
13	-	39.2 (C)
14	1.15 (dd; *J* = 11.0, 5.5 Hz)	53.1 (CH)
15	1.95 (m); 2.08 (m)	22.4 (CH_2)
16	5.79 (dd; *J* = 6.5, 3.0 Hz)	121.8 (CH)
17	-	135.8 (C)
18	2.81 (t; *J* = 3.0 Hz)	56.8 (CH)
19	6.45 (d; *J* = 3.0 Hz)	99.6 (CH)
20	5.09 (s)	104.6 (CH)
21	0.78 (s; 3H)	33.2 (CH_3)
22	0.74 (s; 3H)	21.3 (CH_3)
23	0.78 (s; 3H)	16.5 (CH_3)
24	0.83 (s; 3H)	17.3 (CH_3)
25	0.69 (s; 3H)	8.8 (CH_3)
19-O$COCH_3$	-	171.0 (C)
19-OCOCH_3	2.04 (s; 3H)	21.3 (CH_3)
20-OCH_3	3.32 (s; 3H)	54.6 (CH_3)

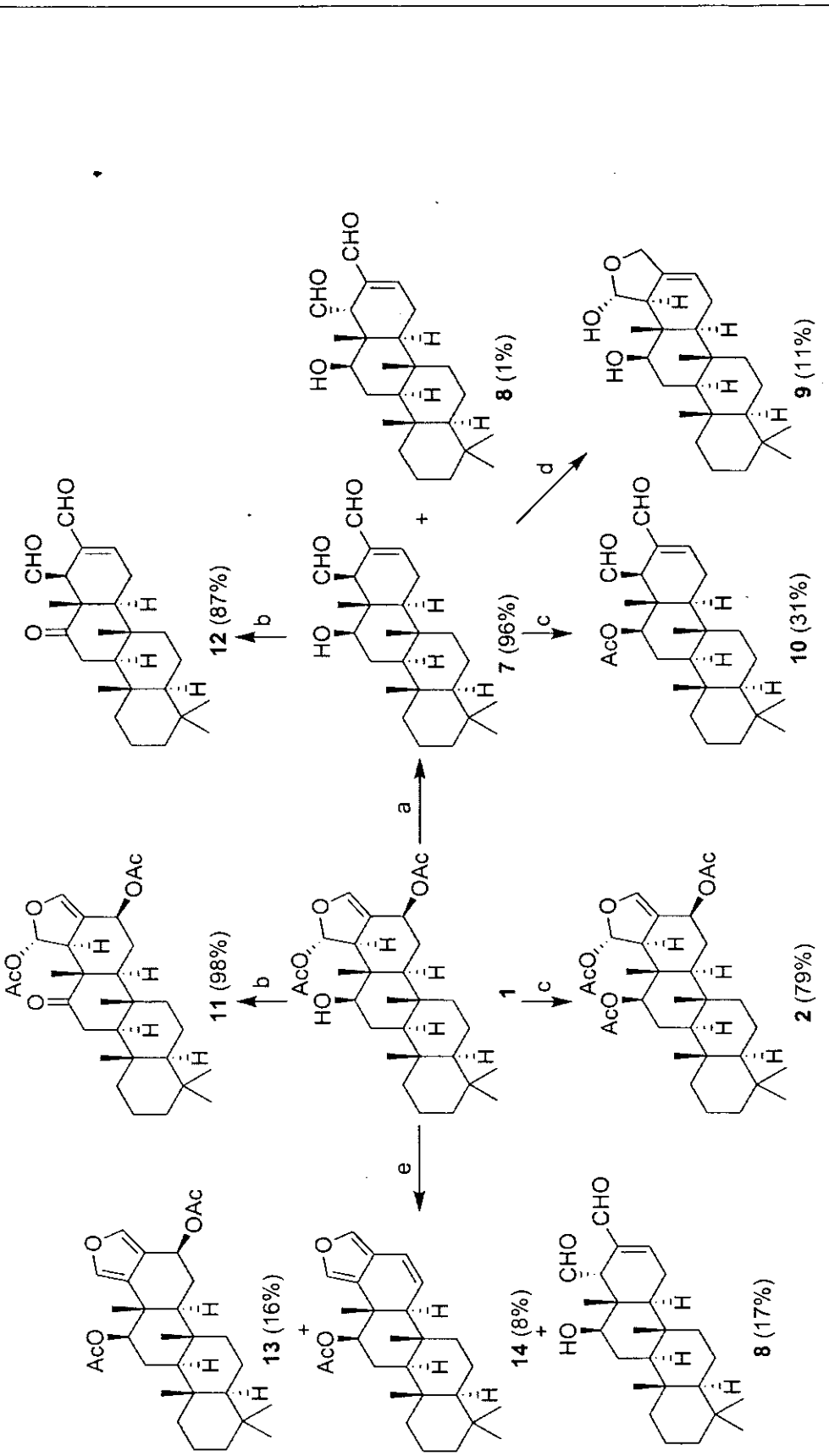
หมายเหตุ [a] ถ้าไม่มีการระบุเพิ่มเติมเป็นอื่น สัญญาณโปรตอนตามที่แสดงเป็นสัญญาณเทียบเท่ากับ 1 H



รูปที่ 2. คอมพิวเตอร์กราฟิกแสดงสูตรโครงสร้างในคอนฟอร์เมอร์ที่เสถียรของ **6** จากการคำนวณ MM2

3.2. การดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรน

เพื่อให้จำนวนชนิดของสารตัวอย่างอนุพันธ์สกาลาเรนเพิ่มขึ้นจากที่สามารถแยกสกัดได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และมีมากพอสำหรับการสร้างระเบียนของสูตรโครงสร้างและความแรงในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ผู้วิจัยเลือกการดัดแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์สกาลาเรนมาประกอบ โดยใช้ heteronemin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักทางเคมีจากฟองน้ำ *Hyrtios* sp. และสามารถแยกสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ในปริมาณมากเป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการดัดแปลงสูตรโครงสร้าง ปฏิกิริยาเคมีที่ใช้ในการดัดแปลงโครงสร้างของ **1** ตามที่จะรายงานต่อไป สรุปตามแผนภูมิที่ 1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ที่ได้จากการดัดแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมีทั้งหมด ใช้เทคนิคทางสเปคโตรสโกปีร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลกับผลการรายงานของสารตัวอย่างทั้งหมดที่มีมาก่อนหน้านี้ (Kazlauskas et al, 1976; Walker et al, 1980; Crews & Bescansa, 1986; Fontana et al, 1999; Gavagnin et al, 2004).



สารเคมีและสภาวะของปฏิกิริยา (a) $BF_3.OEt_2$, wet MeCN, 0 °C; (b) PCC/SiO_2, CH_2Cl_2, rt; (c) Ac_2O, pyridine, rt; (d) LAH, THF, Δ; (e) neat, 220 °C.

แผนภูมิที่ 1. การดัดแปลงสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์สกาลาเรน

3.2.1. ปฏิกิริยาไฮโดรลัยซิสของหมู่อะซีเตทและการแตกวงแหวนฟิวแรน

จากสูตรโครงสร้างของ **1** ผู้วิจัยคาดหมายในช่วงเริ่มต้นว่า การดัดแปลงโครงสร้างที่สามารถดำเนินการและประสบผลสำเร็จได้โดยง่าย ได้แก่การไฮโดรไลซ์หมู่อะซีเตทที่ตำแหน่ง 16 และ 19 โดยการเลือกใช้สภาวะมาตรฐานสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรลัยซิสของเอสเทอร์ (K_2CO_3 ใน MeOH, รีฟลักซ์) หรือปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นทั่วไป (NaCN ใน THF) แต่เนื่องจากความไม่คงตัวของหมู่อะซีทาลของ **1** ทำให้สารตัวอย่างถูกทำลายอย่างรวดเร็วในทุกสภาวะปฏิกิริยาตามระบุข้างต้น ปฏิกิริยาไฮโดคลัยซิสของหมู่อะซีเตทที่ให้ผลผลิตที่น่าพอใจในการวิจัยนี้ เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ $BF_3.OEt_2$ ในอะซีโทไนไทรล์ที่ชื้นและเย็น (Askin et al, 1987) ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลซ์หมู่อะซีเดท ตามด้วยการแตกวงแหวนฟิวแรนอย่างต่อเนื่องทันทีเป็นอนุพันธ์ไดอัลดีไฮด์ **7** ในผลผลิตที่น่าพอใจ (>95%) ทั้งนี้ ในกรณีที่เปิดโอกาสให้ปฏิกิริยาดำเนินไปนานกว่า 1 ชั่วโมง พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจมีการเปลี่ยนคอนฟิกิวเรชั่นสืบเนื่องจากปฏิกิริยาอิพิเมอไรเซชั่นไปเป็นอนุพันธ์ **8** ได้บ้าง แต่ผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาข้างเคียงดังกล่าวอยู่ในปริมาณต่ำมาก (<5%)

ในทางกลับกัน เมื่อผู้วิจัยทดลองรีดิวซ์อนุพันธ์ไดอัลดีไฮด์ **7** เพื่อให้ได้อนุพันธ์ในรูปไตรออล โดยใช้ลิเธียมอะลูมินัมไฮไดรด์ (LAH) เป็นสารรีดิวซ์ (Kuehne et al, 1988) พบว่าปฏิกิริยารีดักชั่นไม่สามารถเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ และเกิดปฏิกิริยาแข่งขันจากการปิดวงแหวนฟิวแรน ซึ่งทำให้ได้อนุพันธ์ฟิวรานอล **9** กลับคืน

3.2.2. การดัดแปลงหมู่แทนที่บนคาร์บอน 12

จากสาร **1** และ **7** ที่ได้จากปฏิกิริยาตามระบุข้างต้น ผู้วิจัยสามารถใช้สารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดเป็นสารตั้งต้นเพื่อการดัดแปลงโครงสร้างในขั้นตอนต่อไปได้หลากหลายขึ้นโดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาที่คล้ายกัน ทั้งนี้จากปริมาณสารตั้งต้นที่มีอยู่ สามารถดัดแปลงโครงสร้างได้ใน 2 ทิศทาง โดยเน้นการดัดแปลงหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-12 ได้แก่ การดัดแปลงหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-12 ไปเป็นหมู่อะซีเตทโดยใช้อะซิติกแอนไฮไดรด์ในพัยริดีน จาก **1** ไปเป็นอะซีเตท **2** และจาก **7** ไปเป็นอะซีเตท **10** และการออกซิไดซ์หมู่ไฮดรอกซิลไปเป็นหมู่คาร์บอนิลด้วยพัยริดิเนียมคลอโรโครเมต (PCC) จาก **1** ไปเป็น **11** และจาก **7** ไปเป็น **12**

3.2.3. ปฏิกิริยาพัยโรลัยซิส

เพื่อเพิ่มความหลากหลายของวงแหวนฟิวแรน ผู้วิจัยเลือกใช้ปฏิกิริยาพัยโรลัยซิสเพื่อดัดแปลงสูตรโครงสร้างจากในรูปเตตราไฮโดรฟิวแรนไปเป็นวงแหวนฟิวแรนที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกที่สมบูรณ์ (Kazlauskas et al, 1976) ทั้งนี้ โดยการใช้สภาวะของพัยโรลัยซิสที่ปราศจากอากาศ (non-oxidative pyrolysis) ทำให้สามารถแยกผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ **1** ในความร้อนสูงได้ 3 ชนิด คือ อนุพันธ์ฟิวแรน **13** และ **14** และอนุพันธ์ไดอัลดีไฮด์ **8**

3.3. ฤทธิ์ทางชีวภาพ

ฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นจุดสนใจของโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ฤทธิ์ต้านวัณโรค (ขอใช้บริการจากศูนย์พันธุวิศกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดยใช้เชื้อ *M. tuberculosis* $H_{37}Ra$ เป็นเชื้อเป้าหมาย และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้เซลล์มะเร็ง MCF-7 (breast adenocarcinoma) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากช่องปากมนุษย์ เป็นเซลล์เป้าหมาย ผลการทดสอบอนุพันธ์สกาลาเรนที่ได้ตามโครงการวิจัยนี้ ทั้งจากการแยกสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และจากการดัดแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมี เป็นตามที่แสดงในตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 จะเห็นว่า อนุพันธ์สกาลาเรนที่มีฤทธิ์ต้านวัณโรคและมีความแรงในการออกฤทธิ์ในระดับดี ได้แก่ อนุพันธ์ **11**, **1** และ **2** (MIC 0.23, 3 และ 3 μM ตามลำดับ) ส่วนตัวอย่างที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ในกรณีของเซลล์มะเร็ง MCF-7 ตัวอย่างที่มีความแรงในการออกฤทธิ์สูง ได้แก่ อนุพันธ์ **14**, **7**, **11**, **13** และ **9** (IC_{50} 9, 13, 17, 18 และ 18 nM ตามลำดับ) ส่วนเซลล์ปกติ ตัวอย่างที่สามารถแสดงฤทธิ์ได้ ได้แก่ อนุพันธ์ **11**, **10**, **1** และ **2** (IC_{50} 0.9, 1, 5 และ 16 μM ตามลำดับ) ค่าความแรงในการออกฤทธิ์ตามที่รายงานข้างต้น (เว้นแต่ในกรณีของสาร **11** ซึ่งมีความแรงในการออกฤทธิ์ที่สูงมากในทุกการทดสอบ) แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์สกาลาเรนส่วนใหญ่ มีความแรงในการออกฤทธิ์ที่ค่อนข้างจำเพาะ และมีแนวโน้มที่สามารถเลือกออกฤทธิ์กับเซลล์แบคทีเรียหรือเซลล์มะเร็งได้อย่างเจาะจง นอกจากนั้น ความแตกต่างของการออกฤทธิ์ยังแสดงให้เห็นว่า การปรับเปลี่ยนหมู่แทนที่ในบางตำแหน่งมีผลต่อการออกฤทธิ์และความจำเพาะเจาะจงของการออกฤทธิ์อย่างเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านวัณโรค (*M. tuberculosis* $H_{37}Ra$) และความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์สกาลาเรน **1, 2** และ **6-14**

สารตัวอย่าง	antitubercular	cytotoxicity (IC_{50})	
	(MIC; μM)	MCF-7 (nM)	human fibroblast (μM)
1	3	157	5.25
2	3	612	16.09
6	54	315	inactive[a]
7	64	13	inactive[a]
8	8	122	inactive[a]
9	257	18	inactive[a]
10	58	474	0.91
11	0.23	17	1.26
12	130	43	inactive[a]
13	14	18	inactive[a]
14	135	9	inactivea
isoniazid	0.02	0.25 mM	-
rifampicin	0.04	1.5 μM	-
kanamycin	2.58	-	-
camptothecin	-	0.72	0.45

หมายเหตุ [a] อัตราการอยู่รอดของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นสูงสุด 5 μg/mL

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของอนุพันธ์สกาลาเรนตามที่รายงานข้างต้น ถึงแม้จำนวนตัวอย่างที่แสดงจะมีจำนวนจำกัด และทำให้ยังไม่สามารถสร้างข้อสรุปที่แน่นอนได้ แต่ก็ยืนยันข้อสมมติฐานเบื้องต้นตามที่ระบุในรายงานของ Crews and Bacansa (1986) ว่า หมู่แทนที่ที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบซึ่งวางอยู่รอบๆ วงแหวนฟิวแรน น่าจะเป็นหมู่ที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ ทั้งนี้ เห็นได้จากการที่อนุพันธ์ที่มีหมู่อะซีเตทแทนที่บนคาร์บอนตำแหน่ง 19 และบนตำแหน่ง 16 ทั้งหมดต่างมีฤทธิ์ต้านวัณโรคในระดับดี อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผลของการออกฤทธิ์ที่สัมพันธ์กับหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 19 ทั้งจากการทดสอบฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้ ตำแหน่งที่ 19 จึงอาจไม่ใช่ตำแหน่งที่เหมาะสมต่อการเลือกมาเป็นเป้าหมายในการดัดแปลงสูตรโครงสร้างเพื่อการพัฒนาอนุพันธ์สกาลาเรนในอนาคต และในทางกลับกัน การเพ่งเล็งไปที่ตำแหน่ง 16 หรือการดัดแปลงโครงสร้างด้านขวาสุดของอนุพันธ์สกาลาเรน อาจนำไปสู่ผลสำเร็จที่น่าสนใจมากกว่า

ประเด็นที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือ แนวโน้มความปลอดภัยของอนุพันธ์สกาลาเรนในกรณีที่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาสูตรโครงสร้าง ถึงแม้ว่าอนุพันธ์สกาลาเรนส่วนหนึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่สูงม้าก (เช่น สาร **11**, **1** และ **2**) ก็ยังคงเห็นได้ว่า สารตัวอย่างส่วนหนึ่งไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบเลย ผลการทดสอบในเซลล์ปกติดังกล่าวถือได้ว่าเป็นการยืนยันความเป็นไปได้ในการพัฒนาอนุพันธ์สกาลาเรนที่มีความเป็นพิษต่ำได้เช่นกัน

4. สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยตามโครงการ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์ของเซสเตอร์เทอร์ปีนจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล: การประเมินฤทธิ์และขอบข่ายการออกฤทธิ์ นี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยใน 3 กิจกรรมหลักได้แก่ การแยกสกัดและการศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนในกลุ่มสกาลาเรนจากฟองน้ำ *Hyrtios* sp. การดัดแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์สกาลาเรนโดยใช้ heteronemin เป็นสารตั้งต้นหลัก และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ อันได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ของอนุพันธ์สกาลาเรนที่ได้จากกิจกรรมทั้งสองข้างต้น

จากการสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีของฟองน้ำ *Hyrtios* sp. ซึ่งสำรวจได้จากบริเวณรอบเกาะเต่า จ.สุราษฎร์ธานี ผู้วิจัยสามารถแยกอนุพันธ์เซสเตอร์เทอร์ปีนกลุ่มสกาลาเรน ได้ 2 ชนิด จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยการเปรียบเทียบข้อมูลกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ และการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปคโตรสโกปีของสารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด พบว่าสารตัวอย่างที่แยกสกัดได้ คือ heteronemin (**1**) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักทางเคมี และ 12-epi-deacetyl-19α-acetoxy-20α-methoxyscalaran (**6**) โดย **6** เป็นอนุพันธ์สกาลาเรนชนิดใหม่ที่แยกและรายงานการศึกษาสูตรโครงสร้างและการวิเคราะห์สเตอริโอเคมีเป็นครั้งแรกในการวิจัยนี้ ลักษณะพิเศษของสาร **6** คือ เป็นสกาลาเรนที่มีวงแหวนเตตราไฮโดรฟิวแรนซึ่งมีคาร์บอนแบบอะซีทาลทั้ง 2 ตำแหน่ง (C-19 และ C-20) ซึ่งพบได้ไม่บ่อยนักในอนุพันธ์สกาลาเรนทั่วไป

นอกจากการแยกสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติแล้ว ผู้วิจัยยังได้คัดเลือก **1** ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีปริมาณสูงมีเป็นสารตั้งต้นในการดัดแปลงสูตรโครงสร้างโดยใช้ปฏิกิริยาเคมี ซึ่งทำให้อนุพันธ์สกาลาเรนอื่นๆ เพิ่มอีก 9 ชนิด ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่างที่ได้ทั้งจากการแยกสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และจากการดัดแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมี พบว่า สารตัวอย่างส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{2} μM และมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติในช่วงของ IC_{50} ตั้งแต่ 10^{-3} μM จนถึงเทียบเท่ากับไม่มีฤทธิ์ช่วงความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์สกาลาเรนที่ได้ ถึงแม้จะมีข้อจำกัดจากจำนวนข้อมูลที่มีในระเบียน ซึ่งทำให้ยังไม่สามารถยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ที่แน่นอนได้ แต่ข้อมูลที่ได้รับจากระเบียนของผลการทดลองก็มากเพียงพอที่จะเสนอแนวโน้มและศักยภาพของอนุพันธ์

สกาลาเรน ในการนำมาเป็นเป้าหมายเพื่อการศึกษาวิจัยและการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์อื่นๆ ที่สัมพันธ์กับการออกฤทธิ์แบบเคมีบำบัด นอกจากนั้น จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์สกาลาเรนส่วนหนึ่งไม่มีความเป็นพิษในระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่การพัฒนาอนุพันธ์สกาลาเรนที่มีความปลอดภัยและสามารถใช้ในสิ่งมีชีวิตได้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Askin, D., Angst, C., Danishefsky, S. 1987. An approach to the synthesis of bactobolin and the total synthesis of *N*-acetyllactinobolamine: Some remarkably stable hemiacetals. J. Org. Chem. 52: 622-635.

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

Copp, B.R. 2003. Antimycobacterial natural products. Nat. Prod. Rep. 20: 535-557.

Crews, P., Bescansa, P. 1986. Sesterterpenes from a common marine sponge, *Hyrtios erecta*. J. Nat. Prod. 49: 1041-1052.

Doi, Y., Shigemori, H., Ishibashi, M., Mizobe, F., Kawashima, A., Nakaike, S., Kobayashi, J. 1993. New sesterterpenes with nerve growth factor synthesis-stimulating activity from the Okinawan marine sponge *Hyrtios* sp. Chem. Pharm. Bull. 41: 2190-2191.

El Sayed, K.A., Bartyzel, P., Shen, X., Perry, T.L, Zjawiony, J.K., Hamann, M.T. 2000. Marine natural products as antituberculosis agents. Tetrahedron. 56: 949-953.

Fontana, A., Cavaliere, P., Ungur, N., D'Souza, L., Parameswaram, P.S., Cimino, G. 1999. New scalaranes from the nudibranch *Glossodoris atromarginata* and its sponge prey. J. Nat. Prod. 62: 1367-1370.

Gavagnin, M., Mollo, E., Docimo, T., Guo, Y., Cimino, G. 2004. Scalarane metabolites of the nudibranch *Glossodoris rufomarginata* and its dietary sponge from the South China Sea. J. Nat. Prod. 67: 2104-2107.

Hernández-Guerro, C.J., Zubía, M.J., Ortega, J.L., Carballo, J.L. 2006. Sesterterpene metabolites from the sponge *Hystella intestinalis*. Tetrahedron. 62: 5392-5400.

Jaisamut, S. 2008. Antitubercular activity profiling of terpenoid derivatives from the Thai sponge *Hyrtios* sp. Master Thesis. Prince of Songkla University. Songkhla, Thailand.

Karuso, P., Cambie, R.C., Bowden, B.F., Bergquist, P.R. 1989. Chemistry of sponges VI. Scalarane sesterterpenes from *Hyatella intestinalis*. J. Nat. Prod. 52: 289-293.

Kashman, Y., Rudi, A. 1977. The ^{13}C NMR spectrum and stereochemistry of heteronemin. Tetrahedron. 33: 2997-2998.

Kazlauskas, R., Murphy, P.T., Quinn, R.J., Wells, R.J. 1976. Heteronemin, a new scalarin type sesterterpene from the sponge *Heteronema erecta*. Tetrahedron Lett. 17: 2631-2634.

Kobayashi, M., Okamoto, T., Hayashi, K., Yokoyama, N., Sasaki, T., Kitagawa, I. 1994. Marine natural products XXXII. Absolute configurations of C-4 of the manoalide family, biologiocally active sesterterpenes from the marine sponge *Hyrtios erecta*. Chem. Pharm. Bull. 42: 265-270.

Ledroit, V., Debitus, C., Ausseil, F., Raux, R., Menou, J.-L., Hill, B. T. 2004. Heteronemin as a protein farnesyl transferase inhibitor. Pharm. Biol. 42: 454-456.

Li, H., Amagata, T., Tenney, K., Crews, P. 2007. Additional scalarane sesterterpenes from the sponge *Phyllospongia papyracea*. J. Nat. Prod. 70: 802-807.

Nam, S.., Ko, H., Shin, M., Ham, J., Chin, J., Kim, Y., Kim, H., Shin, K., Choi, H., Kang, H. 2006. Farnesoid X-activated receptor antagonists from a marine sponge *Spongia* sp. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16: 5398-5402.

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.

Pauli, G.F., Case, R.J., Inui, T., Wang, Y., Cho, S., Fischer, N.H., Franzblau, S.G. 2005. New perspectives on natural products in TB drug research. Life Sci. 78: 485-494.

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

Rao, C.B., Kalidindi, R.S.H.S.N., Trimurtulu, G., Rao, D.V. 1991. Metabolites of Porifera, part III. New 24-methylscalaranes from *Phyllospongia dendyi* of the Indian Ocean. J. Nat. Prod. 54: 364-371.

Rho, J., Lee, H., Shin, H., Ahn, J., Kim, J., Sim, C., Shin, J. 2004. New sesterterpenes from the sponge *Smenospongia* sp. J. Nat. Prod. 67: 1748-1751.

Ryu, G., Matsunaga, S., Fusetani, N. 1996. Three new cytotoxic sesterterpenes from the marine sponge *Hyrtios* cf. *erectus*. J. Nat. Prod. 59: 515-517.

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.

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.

Smith, C.V., Sharma, V., Sacchettini, J.C. 2004. TB drug discovery: Addressing issues of persistence and resistance. Tuberculosis. 84: 45-55.

Somerville, M.J., Hooper, J.N.A., Garson, M.J. 2006. Mooloolabenes A-E, norsesterterpenes from the Australian sponge *Hyattella intestinalis*. J. Nat. Prod. 69: 1587-1590.

Walker, R.P., Thompson, J.E., Faulkner, D.J. 1980. Sesterterpenes from *Spongia idia*. J. Org. Chem. 45: 4976-4979.

Wonganuchitmeta, S. 2003. Antitubercular agents from Thai sponge *Brachiaster* sp. Master Thesis. Prince of Songkla University. Songkhla, Thailand.

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

World Health Organization. 2008a. Tuberculosis. Available at

http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104en/print/html. accessed on July 5, 2008.

World Health Organization. 2008b. Global Tuberculosis Control. Available at

http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/tha/pdf. accessed on July 5, 2008.

ผลผลิตของโครงการวิจัย

จากผลการดำเนินงานวิจัยตามที่ได้รายงานมาแล้วข้างต้น โครงการวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและความเป็นพิษต่อเซลล์ของเซสเตอร์เทอร์ปีนจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล: การประเมินฤทธิ์และขอบข่ายการออกฤทธิ์ นี้ สามารถสร้างผลผลิตในด้านต่าง ๆ ตามที่ได้เสนอไว้ในข้อเสนอโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

องค์ความรู้ใหม่:

ดำเนินการแยกสกัดสารจากฟองน้ำ *Hyrtios* sp. และสามารถแยกสกัดสารได้ 2 ชนิด คือ heteronemin และ 12-epi-deacetyl-19α-acetoxy-20α-methoxyscalaran โดย 12-epi-deacetyl-19α-acetoxy-20α-methoxyscalaran เป็นสารชนิดใหม่ที่รายงานเป็นครั้งแรกในการวิจัยนี้ นอกจากนั้น ยังได้ดัดแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์สกาลาเรน ซึ่งทำให้ได้อนุพันธ์ชนิดต่าง ๆ อีก 9 ชนิด และได้ทดสอบฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารตัวอย่างทั้งหมด ผลการศึกษาแสดงให้เห็นแนวโน้มของการนำอนุพันธ์สกาลาเรนไปศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรโครงสร้างสำหรับใช้เป็นสารเคมีบำบัด/สารต้านจุลชีพต่อไปในอนาคต

การผลิตนักศึกษา:

นักศึกษาที่ทำวิทยานิพนธ์ที่สัมพันธ์กับการวิจัยในโครงการนี้ ประกอบด้วย

- ระดับปริญญาโท; นายสุนันต์ ใจสมุทร (สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2551)
- ระดับปริญญาเอก; นายสุริยัน เต็งใหญ่ (คาดว่าจะสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2553)

การผลิตผลงานทางวิชาการ:

จัดทำต้นฉบับเพื่อการตีพิมพ์ 1 เรื่อง (Jaisamut, S., Thengyai, S., Yuenyongsawad, S., Karalai, C., Plubrukarn, A., Suwanborirux, K. Structure-activity relationship of antitubercular scalaranes: Heteronemin revisited. Pure App. Chem. 2008.) ขณะนี้ อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณา

นอกจากนั้น ผลงานวิจัยตามที่ได้รายงานไปข้างต้น ได้นำเสนอในที่ประชุมวิชาการแล้ว 3 เรื่อง ได้แก่

Jaisamut, S., Thengyai, S., Yuenyongsawad, S., Karalai, C., Plubrukarn, A., Suwanborirux, K. Structure-activity relationship of antitubercular scalaranes: eteronemin revisited. IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products ICOB-6 & ISCNP-26, Charlottetown, Canada, July 13-18,2008.

Jaisamut, S., Plubrukarn, A. Antitubercular marine-derived sesterterpenoid derivatives. PP10. The 1st Seminar on Bioactive Natural Products from Marine Organisms and Endophytic Fungi, and the JSPS 2nd Medicinal Chemistry Seminar of Asia/Africa Science Platform Program, Phuket, October 26-27, 2007.

Jaisamut, S., Yuenyongsawad, S., Plubrukarn, A. Derivatization of marine-derived antitubercular sesterterpenes, Gordon Research Conference, Marine Natural Products. Ventura Beach Marriott, Ventura, USA. February 24-29. 2008.

การขยายกิจกรรมการวิจัย:

จากผลการวิจัยตามที่รายงานมาข้างต้น นำไปสู่การพัฒนาข้อเสนอโครงการวิจัยเพื่อขอรับการสนับสนุนจากงบประมาณรายจ่าย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2553 เรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของเซสเตอร์เทอร์ปีนที่มีฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล ขณะนี้ อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณาข้อเสนอโครงการ (งบประมาณตามข้อเสนอโครงการ 920,000.- บาท)