



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีของเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp.

ทางชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย

(Chemical constituents of tunicate *Eudistoma* sp. in the East coast of Thailand)

โดย

นศภ.ณัฐสิทธิ์	เสงี่ยมพงษ์	56210046
นศภ.จิณณพัฑ	เนตรนิยม	56210107
นศภ.จินทภา	กนกวรรณกาญจน์	56210109
นศภ.ชนกันต์	อินทร์บรรลือ	56210157

โครงการวิจัยเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรปริญญาบัณฑิตปีการศึกษา 2560

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีของเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp.

ทางชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย

(Chemical constituents of tunicate *Eudistoma* sp. in the East coast of Thailand)

โดย

นสภ.ณัฐสิทธิ์	เสงี่ยมพงษ์	56210046
นสภ.จิณณพัต	เนตรนิยม	56210107
นสภ.จินทภา	กนกวรรณกาญจน์	56210109
นสภ.ชนกันต์	อินทร์บรรลือ	56210157

โครงการวิจัยเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรปริญญาบัณฑิตปีการศึกษา 2560

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

เพรียงหัวหอม (tunicates, ascidians) เป็นสัตว์ทะเลชนิดหนึ่งที่พบการกระจายตัวอยู่ทั่วโลก เนื่องจากเพรียงหัวหอมเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตแบบเกาะติดจึงจำเป็นต้องสร้างสารเคมีเพื่อป้องกันตัวจากอันตรายต่างๆ ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้สนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเพรียงหัวหอมเป็นจำนวนมาก จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าเพรียงหัวหอมมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถพัฒนาเป็นสารต้นแบบ (lead compound) และมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ที่พบบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทยโดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2560

เรื่อง องค์ประกอบทางเคมีของเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ทางชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|-----------------------------|--------------------|
| 1. นสภ.ณัฐสิทธิ์ เสี่ยมพงษ์ | รหัสนิสิต 56210046 |
| 2. นสภ.จิณณพัต เนตรนิยม | รหัสนิสิต 56210107 |
| 3. นสภ.จินทภา กนกวรกาญจน์ | รหัสนิสิต 56210109 |
| 4. นสภ.ชนกันต์ อินทร์บรรลือ | รหัสนิสิต 56210157 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ญ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์
2. ญ.ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวิระ

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ทางชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้ใช้เพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ที่เก็บจากเชือกกระชังเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี โดยนำตัวอย่างมาลดขนาด แล้วหมักด้วย MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ hexane, dichloromethane, butanol และน้ำ แล้วนำสารสกัดขึ้น dichloromethane ไปแยกด้วย vacuum chromatography โดยใช้ 100%hexane และ 5%MeOH/CH₂Cl₂ ถึง 50%MeOH/CH₂Cl₂ สามารถรวม fraction ได้ 10 fractions (EUD 1-10) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Thin layer chromatography (TLC) เพื่อหา fraction ที่น่าสนใจมาทำการแยกต่อ โดย fraction ที่น่าสนใจ คือ EUD 2 นำมาแยกด้วยด้วย sephadex LH20 โดยใช้ MeOH เป็นตัวชะ ซึ่ง EUD 2 สามารถแยกสารออกมาได้ 9 fractions (EUD 2-1 ถึง EUD 2-9) จากนั้นนำ fractions ทั้งหมดนำมา

วิเคราะห์ด้วย TLC และ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer ($^1\text{H-NMR}$) ซึ่งพบ fraction ที่น่าสนใจ คือ EUD 2-4 เนื่องจากปริมาณสารน้อยมาก จึงนำไปแยกโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สามารถรวมได้ 4 fractions (EUD 2-4-0 ถึง EUD 2-4-3) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ พบสารที่น่าสนใจ คือ EUD 2-4-3 แต่เนื่องจากสารยังไม่บริสุทธิ์ ประกอบกับปริมาณสารมีปริมาณน้อยมากจึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ จึงได้เลือก fraction EUD 2-2 มาทำการศึกษาต่อ เพื่อแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC (SiO_2 ; 30% EtOAC/ CH_2Cl_2) ได้ทั้งหมด 5 fractions (EUD 2-2-1 ถึง EUD 2-2-5) และเมื่อนำไปติดตามสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ พบว่า EUD 2-2-2 เป็นสารบริสุทธิ์ ทั้งนี้อยู่ในระหว่างการแปลโครงสร้างทางเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project : Chemical constituents of tunicate *Eudistoma* sp. in the East coast of Thailand

By

- | | | | | |
|----|---------------|--------------|----|----------|
| 1. | Mr.Nuttasit | Sangiempong | ID | 56210046 |
| 2. | Miss.Jinnapat | Netniyom | ID | 56210107 |
| 3. | Miss.Jintapa | Kanokvorakan | ID | 56210109 |
| 4. | Mr.Chanagun | Inbunlue | ID | 56210157 |

Advisor :

- | | | |
|----|-----------------|--------------------------|
| 1. | Miss.Thanchanok | Sirirak, Ph.D |
| 2. | Miss.Nedchanok | Jiangseubchatveera, Ph.D |

Academic Year 2017

ABSTRACT

The study of chemical constituents of tunicates *Eudistoma* sp. from the East coastline of Thailand. The tunicates was collected from from Aquaculture Cage at Kung Krabaen Bay Development Study Center initiated by His Majesty the King, Chanthaburi Province. The tunicates were freeze-dried and reduced sized. The sample was exhausted extracted with methanol:dichloromethane (1:1) for 24 hours. The extraction was repeated until solvent is colorless. The crude extract was isolated by liquid-liquid extraction using various organic solvents to obtain hexane-, dichloromethane-, butanol-, and water extracts. The dichloromethane extract was further isolated using chromatographic techniques including vacuum chromatography, Sephadex LH20, high performance liquid chromatography (HPLC), and thin layer chromatography (TLC) yielded 2 compounds

including EUD2-4-3 (1.5 mg mixture) and pure EUD 2-2-2 (4.6 mg). The isolated compounds were tracked by TLC, UV, and ^1H -NMR spectrum.

The mixture of EUD2-4-3 was analyzed using GC-MS. The results showed that 9-octadecenamide is a major component. Another EUD 2-2-2 was analyzed using ^1H -NMR spectrum. The spectrum indicated that EUD 2-2-2 is a pure compound which is on the process of structure elucidation.

The crude extracts were subjected to anti-oxidant activity using ABTS assay. The hexane, dichloromethane, butanol, and water extracts showed TEAC values 2.265, 22.308, 32.792, and 12.581 mM trolox/g extract, respectively using trolox as a standard whereas showed VEAC values 1.061, 10.394, 17.025, and 4.243 mM ascorbic acid/g extract, respectively comparing to standard vitamin C.

Major advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณา จาก
เภสัชกรหญิง อาจารย์ ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์ และเภสัชกรหญิง อาจารย์ ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ
ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่คอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำ
โครงการวิจัยครั้งนี้ จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากคณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำโครงการวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

วันที่ 1/11/2560

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ.....	๗
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
กรอบแนวคิด.....	3
ขอบเขตงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ลักษณะทางชีวภาพของเพรียงหัวหอม.....	5
2.2 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ <i>Eudistoma</i> sp.....	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	18
3.1.1 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษา.....	18
3.1.2 สารเคมี.....	18
3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	19
3.2 วิธีวิจัย.....	20
3.3 การเก็บตัวอย่างเพรียงหัวหอม <i>Eudistoma</i> sp.....	21

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.4 การเตรียมสารสกัด <i>Eudistoma</i> sp.....	21
3.5 การสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction).....	22
3.6 การแยกสกัดสารด้วย vacuum chromatography.....	24
3.7 การแยกสกัดสารโดยใช้ sephadex LH20.....	24
3.8 การแยกสกัดโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	25
3.9 การแยกสกัดด้วย Thin layer chromatography (TLC).....	25
3.10 การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	25
3.11 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ABTS).....	26
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การเก็บตัวอย่างเพรียงหัวหอม <i>Eudistoma</i> sp.....	27
4.2 ผลการเตรียมสารสกัด <i>Eudistoma</i> sp.....	28
4.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction).....	28
4.4 การแยกสารสกัดด้วย vacuum chromatography.....	29
4.5 การแยกสารสกัดโดยใช้ sephadex LH20.....	31
4.6 การแยกสารสกัดโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	33
4.7 การแยกสกัดด้วย Thin layer chromatography (TLC).....	34
4.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ABTS).....	35
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	
5.1 การเก็บตัวอย่างเพรียงหัวหอม <i>Eudistoma</i> sp.....	39
5.2 ผลการเตรียมสารสกัด <i>Eudistoma</i> sp.....	39
5.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction).....	39

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
5.4 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดย vacuum chromatography.....	40
5.5 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดย sephadex LH20	40
5.6 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	41
5.7 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้ Preparative TLC	41
5.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ABTS).....	41

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะทั่วไปของเพรียงหัวหอม.....	6
2. แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย.....	20
3. แผนภาพแสดงการเตรียมสารสกัด <i>Eudistoma</i> sp.....	22
4. แผนภาพการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี liquid/liquid extraction.....	23
5. ลักษณะบนผิวน้ำของเพรียงหัวหอม.....	27
6. แสดงผลการวิเคราะห์ TLC ของสารสกัดชั้นต่างๆ.....	29
7. แสดงผลการวิเคราะห์ TLC ของส่วนสกัด EUD1 – EUD10.....	31
8. แสดงผลการวิเคราะห์ TLC ของส่วนสกัด EUD2-1 – EUD2-9.....	33
9. แสดงผลการวิเคราะห์ TLC ของส่วนสกัด EUD2-2-1 – EUD2-2-5.....	35
10. แสดง calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน vitamin c ในแต่ละความเข้มข้น.....	36
11. แสดง calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน trolox ในแต่ละความเข้มข้น.....	37

สารบัญตาราง

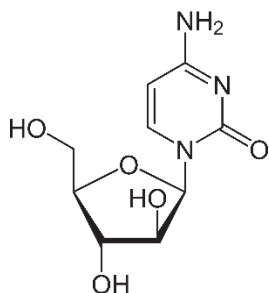
ตารางที่	หน้า
1. ผลการสกัดเพรียงหัวหอม <i>Eudistoma</i> sp. ด้วยวิธีการหมัก MeOH: CH ₂ Cl ₂ (1:1).....	28
2. น้ำหนักสารสกัดในแต่ละขั้นตอนของการสกัด (กรัม) และ %yield.....	28
3. แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย vacuum chromatography.....	30
4. แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย sephadex LH20.....	32
5. แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย HPLC.....	34
6. แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย preparative TLC.....	35
7. แสดงค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยสารละลายมาตรฐาน vitamin c ในแต่ละความเข้มข้น.....	36
8. แสดงค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยสารละลายมาตรฐาน trolox ในแต่ละความเข้มข้น.....	37
9. ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของการสกัดเทียบเท่า กับสารละลายมาตรฐาน.....	38

บทที่ 1

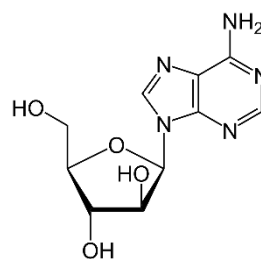
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เนื่องจากพื้นผิวโลกปกคลุมด้วยมหาสมุทรมากกว่าร้อยละ 70 อีกทั้งสภาวะแวดล้อมในท้องทะเลมีปัจจัยที่แตกต่างจากบนพื้นดิน เช่น แรงดันน้ำ ความสว่าง ความเค็ม และแร่ธาตุ เป็นต้น สิ่งมีชีวิตในท้องทะเลมีความหลากหลายทางชีวภาพ และมีแนวโน้มที่สิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะมีการผลิตสารสำคัญในการดำรงชีวิตที่แตกต่างไปจากสิ่งมีชีวิตบนบก โดยเฉพาะในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่เคลื่อนที่ได้ช้า หรือไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ก็จะมีกลไกการป้องกันตัวเองจากผู้ล่า โดยการสร้างสารเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นต้น จากการศึกษาของคัพระกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากสิ่งมีชีวิตทางทะเล เช่น ปลิงทะเล ฟองน้ำ ไบรโอซัว เปรียง หัวหอม เป็นต้น พบว่ามีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีจนสามารถพัฒนาไปเป็นสารต้นแบบ (lead compound) และมีศักยภาพที่สามารถพัฒนาไปเป็นยาได้ เช่น สาร spongothymidine และ spongouridine เป็นสารในกลุ่ม arabinoside ที่สกัดได้ครั้งแรกจากฟองน้ำ *Tethya crypta* ซึ่งใช้เป็นต้นแบบของยา cytarabine (1)(1) และ vidarabine(2)(12) ซึ่งเป็นยารักษา มะเร็งและยาต้านไวรัสตามลำดับ



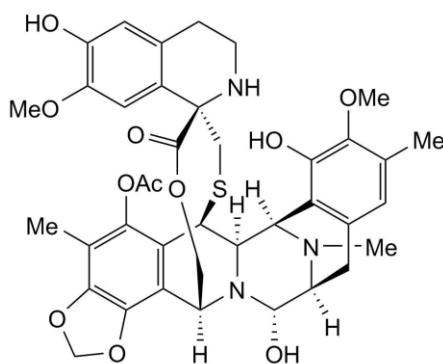
Cytarabine (1)



Vidarabine (2)

นอกจากนี้ยังมีสารอีกหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาเข้าสู่ขั้น clinical trial (3) เช่น bryostatin-1 ที่กำลังศึกษาใน clinical trial phase I, dolastatin กำลังศึกษาใน clinical phase II/III ที่ใช้พัฒนาเป็น antibody-drug conjugate และ synthadotin ที่กำลังถูกพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งใน phase II

ปัจจุบัน ecteinascidin-743 (ET-743)(3) ที่สกัดได้จาก *Ecteinascidia turbinata* ที่มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นยา Yondelis® ซึ่งมีการรับรองให้ใช้ในยุโรป รัสเซีย และเกาหลีใต้ สำหรับการรักษามะเร็งเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue sarcoma) และมะเร็งเต้านมได้ (4)



Ecteinascidin-743 (3)

เพรียงหัวหอม (tunicates) เป็นสัตว์ทะเลชนิดหนึ่งที่มีนักวิจัยให้ความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเนื่องจากเพรียงหัวหอมนั้นมีระยะตัวอ่อนที่สามารถว่ายน้ำได้อย่างอิสระ แต่ในระยะที่เป็นตัวเต็มวัยจะดำรงชีวิตแบบเกาะติดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เพรียงหัวหอมจึงจำเป็นต้องสร้างสารเคมีเพื่อป้องกันตัวจากภัยอันตรายซึ่งสารเคมีเหล่านี้อาจเป็นแหล่งสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ ได้

จากการสำรวจสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบริเวณกระชังเพาะเลี้ยงในโครงการในพระราชดำริ สมเด็จพระเทพฯ บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จ.จันทบุรี พบว่ามีเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. เกาะอยู่บริเวณสายเชือกที่กระชังเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก และเมื่อเก็บตัวอย่างเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. มาสกัดและติดตามสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ spectrum ในสารสกัดหยาบพบว่ามีสัญญาณบริเวณ 5-7 ppm ซึ่งบ่งชี้ถึงโครงสร้างสารในกลุ่ม aromatic ซึ่งเป็น pharmacophore ที่สำคัญของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ จากรายงานการศึกษาสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของเพรียงหัวหอม *Eudistoma*

sp. เป็นสารกลุ่ม β -carboline alkaloids ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น การต้านเชื้อแบคทีเรีย (5, 6) ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) (7, 8) การต้านเชื้อไวรัส (9) และ calmodulin antagonistic activity (10)

แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ที่เก็บจากพื้นที่บริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย ผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ดังกล่าวมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

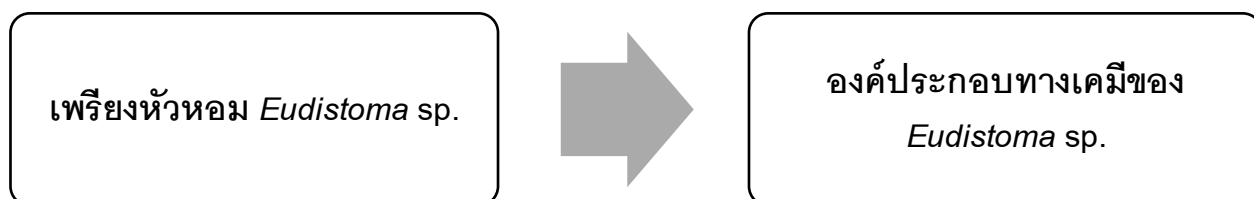
1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ที่เก็บจากชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทยด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อทราบองค์ประกอบทางเคมีของเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp.

1.4 กรอบแนวคิด



1.5 ขอบเขตงานวิจัย

1. เพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. จากกระชังเพาะเลี้ยงในศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี
2. การศึกษานี้มุ่งเน้นการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็นองค์ประกอบจาก *Eudistoma* sp.

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ทางชายฝั่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ต้องอาศัยความรู้ ความเข้าใจในเรื่องของลักษณะทางชีวภาพของเพรียงหัวหอม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องใน genus *Eudistoma* ดังนี้

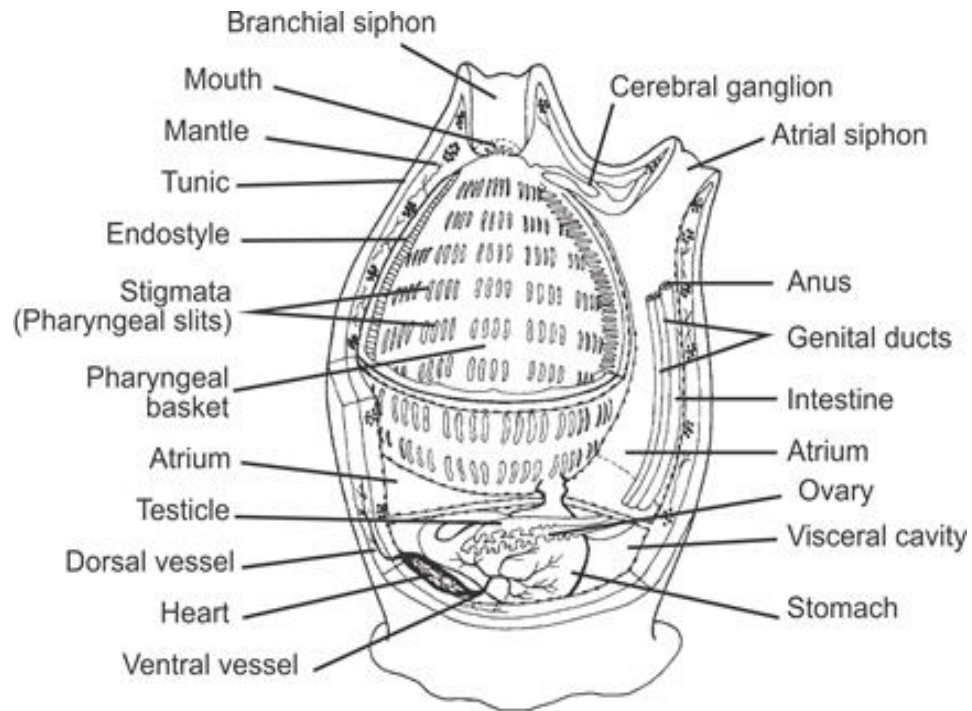
2.1 ลักษณะทางชีวภาพของเพรียงหัวหอม

เพรียงหัวหอม (tunicates, ascidians) เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังในไฟลัม Chordata ซึ่งพบแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก โดยลักษณะทางชีวภาพของเพรียงหัวหอมนั้นมีการดำรงชีวิตโดยการเกาะติดอยู่ตามแนวปะการัง มีลักษณะทั่วไปดังภาพที่ 1 จัดเป็นสัตว์ทะเลที่มีวิวัฒนาการทางด้านรูปร่างและอวัยวะภายในสูงในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยมีทั้งดำรงชีวิตแบบโดดเดี่ยว แบบกลุ่ม หรือแบบกลุ่มเปลือกหุ้มเดียวกัน และเกาะติดกับหินใต้น้ำ เพรียงหัวหอมกินอาหารโดยการกรอง (filter feeder) อาหารที่เป็นแพลงก์ตอนที่อยู่ในน้ำ โดยเพรียงหัวหอม (tunicate) เป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในอนุกรมวิธานดังต่อไปนี้

Phylum Chordata

Subphylum Urochordata

Class Ascidiacea



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของเพรียงหัวหอม

2.1.1 ผนังตัว

เพรียงหัวหอม มีผนังตัวเป็น แมนเทิล (mantle) ซึ่งประกอบด้วย

1) เยื่อบุผิว (Epidermis) เป็นเยื่อบางๆทำหน้าที่สร้างทูนิก (tunic) ห่อหุ้มตัว ทูนิกมี fibrous matrix ซึ่งส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารคล้ายเซลลูโลสที่เรียกว่า ทูนิกซิน (tunicin) มีองค์ประกอบร่วมเป็นเกลือ กับโปรตีน มีการตกตะกอนของสารหินปูนเป็นสปิคูล (spicule) ฝังอยู่ในทูนิก และบางชนิดมีเซลล์จากมีเซนไคม์ (mesenchyme) เข้ามาอยู่และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีรงควัตถุ (pigment cell) หรือเซลล์รูปดาว หรือเซลล์ที่มีช่องว่างมาก และอาจสร้างสปิคูลที่สโตลอน ทำให้ทูนิกส่วนที่ใช้ในการยึดเกาะมักมีลักษณะขรุขระ หรือเป็นตุ่ม มีแขนงยื่นออกไปเป็นสโตลอน ทูนิกอาจมีสีหรือลักษณะคล้ายหินอ่อน บางชนิดใสมองเห็นสีของอวัยวะภายใน

2) เยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) เป็นชั้นที่หนา มีกล้ามเนื้อเรียบตัวในทิศทางต่างๆ และที่ท่อน้ำจะมีกล้ามเนื้อหูรูด (sphinctor muscle) ที่แข็งแรง ในท่อน้ำด้วยทูนิกและเยื่อบุผิว

2.1.2 โภชนาการและการหมุนเวียนน้ำ

เพรียงหัวหอมกินอาหารโดยการกรอง (filter feeder) อาหารที่เป็นแพลงก์ตอนที่อยู่ในน้ำทางเดินอาหารประกอบด้วย

- 1) ช่องปากอยู่ภายในท่อน้ำเข้า มีหนวดรอบปากเพื่อป้องกันไม่ให้วัตถุขนาดใหญ่หลุดเข้าไป ผนังของท่อที่เข้าและออกบุด้วยเยื่อบุผิวและทูนิก
- 2) คอหอยเป็นอวัยวะขนาดใหญ่ที่สุด เริ่มจากบริเวณใต้หนวดลงไป ลักษณะของคอหอยอาจเป็นทรงกระบอกหรือแบนทางด้านข้าง ผนังของคอหอยด้านหน้าและด้านท้องยึดติดกับผนังตัวและที่ผนังด้านในจะเป็นร่อง เรียกว่า เอนโดสไตล์ (endostyle) ผนังด้านข้างของร่องจะมีขน (cilia) ตอนกลางร่องบุด้วยเซลล์สร้างเมือกและแถวของขนตอนกลางผนังของคอหอยมีช่องเปิดแบบรอยขีดเป็นจำนวนมากเรียงตัวอย่างมีระเบียบคือ ช่องเหงือก (gill slit) หรือสติกมาตา (stigmata) น้ำออกจากคอหอยทางช่องนี้ ช่องเหงือกมีขนบุอยู่ ขนจะทำให้เกิดการไหลเวียนของกระแส น้ำโดยน้ำเข้าทางท่อน้ำเข้าผ่านฟาริงซ์ออกมาที่ช่องลำตัวรอบคอหอยที่เรียกว่า atrium แล้วออกจากตัวทางท่อน้ำออก การหมุนเวียนน้ำจะให้ประโยชน์ในเรื่องโภชนาการ การหายใจ การจับถ่ายและการสืบพันธุ์ ส่วนเมือกที่สร้างจากร่องขนจะเคลื่อนไหลออกมาเป็นแผ่นเมือก เวลาเคลื่อนผ่านช่องเหงือกจะเก็บ เอาอาหารที่ถูกกักอยู่ที่ช่องเหงือกแล้วเคลื่อนไหลไปยังผนังด้านหลัง กึ่งกลางของผนังด้านหลังจะมีสันตามยาว เรียกว่า ดอร์ซัล ลามินา (dorsal lamina) หรืออาจเป็นแถวของหนวดที่เรียกว่า แลนควิท (lanquet) อาหารเคลื่อนตามสันนี้ลงไปตอนท้ายเข้าสู่หลอดอาหาร
- 3) หลอดอาหาร เป็นท่อเล็กๆ อยู่ติดทางด้านหลังของคอหอย
- 4) กระเพาะอาหาร เป็นต่อจากหลอดอาหาร มีการย่อยอาหารนอกเซลล์
- 5) ลำไส้ ยาว และวกกลับขึ้นไปทางด้านหน้าไปเปิดออกที่ท่อน้ำออก การดูดซึมเกิดที่ลำไส้

6) ทวารหนักอยู่ใต้ท่อน้ำออก น้ำกรองออกจากคอกหอยทางด้านช่องเหงือก ผนังรอบช่องเหงือกประกอบด้วย ผนังในแนวขวางหรือ transverse bar และผนังในแนวตั้งคือ longitudinal bar ภายในผนังคอกหอยจะมีท่อทางเดินของเลือด (blood channel) แตกแขนงอยู่ตามขอบช่องเหงือก เวลาที่น้ำผ่านออกมาจากคอกหอย จะมีการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างน้ำกับท่อทางเดินของเลือดเหล่านี้

2.1.3 ระบบขับถ่าย

ของเสียส่วนใหญ่ 90% เป็นแอมโมเนียซึ่งจะถูกกำจัดผ่านออกทางคอกหอย ทูนิค หรือ ผิวของอวัยวะอื่นๆ อะมีโบไซต์ เคลื่อนที่ไปเกาะที่ผิวของอวัยวะภายใน โดยเฉพาะอวัยวะทางเดินอาหารและระบบสืบพันธุ์ ซึ่งจะเกาะอยู่ตลอดชีวิต

2.1.4 ระบบหมุนเวียน

เพรียงหัวหอมมีระบบการไหลเวียนเลือดแบบเปิด เลือดของเพรียงหัวหอมไม่มีรงควัตถุในการหายใจ แต่มีอะมีโบไซต์อยู่มากโดยหัวใจมีท่อสั้นๆ อยู่ในแอ่งหัวใจที่บริเวณของห้วงของทางเดินอาหาร หัวใจเกิดจากการโป่งยื่นออกมาจากเยื่อหุ้มหัวใจ หัวใจวางตัวตามในแนวหลัง-ท้อง ซึ่งเส้นเลือดที่ออกจากหัวใจด้านท้องคือ subendostyle vessel อยู่ที่ผนังด้านท้องของคอกหอยยาวขึ้นไปด้านหน้า เส้นเลือดนี้จะแตกแขนงเป็นท่อเลือดเข้าไปในผนังคอกหอย (pharyngeal channel) ซึ่งจะรวมกันเข้าสู่ medial dorsal sinus อยู่ใต้ dorsal lamina เส้นเลือดนี้จะแตกแขนงเข้าไปในอวัยวะภายในต่างๆ แล้วรวมเข้าเป็น dorsal abdominal sinus เข้าสู่หัวใจ เพรียงหัวหอมมีการไหลเวียนเลือดได้ทั้ง 2 ทิศทาง เช่น ถ้าฉีดเลือดออกทางด้านท้องแล้วพักสักครู่ก่อนจะสูบฉีดเลือดออกทางด้านหลังสลับกัน

2.1.5 ช่องตัว เพรียงหัวหอมไม่มีช่องตัวแท้จริง เนื่องจากช่องตัวหายไปในช่วง

วิวัฒนาการ ช่องตัวที่เหลืออยู่ คือ ช่องว่างรอบหัวใจและอีพิการ์เดียม (epicardium) ซึ่งอีพิการ์เดียมพัฒนามาจากเยื่อชั้นในมีลักษณะเป็นท่อที่ขนานกับทางเดินอาหาร แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แท้จริง

2.1.6 ระบบประสาท

คอร์เดตทุกชนิดจะต้องมีโครงสร้างของเส้นประสาทที่มีลักษณะเป็นท่อยาวตลอดลำตัวทางด้านหลัง โดยเส้นประสาททางด้านหัวอาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นสมอง ส่วนเส้นประสาท

ทางด้านท้ายเจริญไปเป็นไขสันหลัง (spinal cord) การเกิดระบบประสาทนี้จะเกิดขึ้นในระยะตัวอ่อน โดยการม้วนตัวเข้าหากันของเนื้อเยื่อชั้นเอกโตเดิร์มทางด้านหลังกลายเป็นท่อฝังอยู่ใต้ผิวหนัง

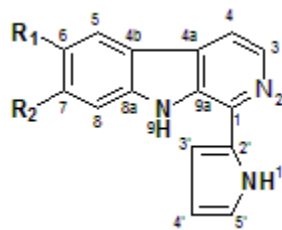
2.1.7 การสืบพันธุ์

การสืบพันธุ์มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เพื่อยังหัวหอมส่วนใหญ่มีเพศรวม และมักจะมีอวัยวะและรังไข่อย่างละ 1 อัน โดยทั่วไปรังไข่จะอยู่บริเวณเหนือกระเพาะอาหารมีลักษณะเป็นถุง ส่วนอวัยวะจะอยู่ถัดลงมา ท่อนำไข่ (oviduct) และท่อน้ำสเปิร์ม (sperm duct) เป็นท่อนานกันไปเปิดออกที่ห้องหัวใจ

เพื่อยังหัวหอมที่อยู่ตัวเดียวมีการสร้างไข่ที่มีไข่แดงน้อย การปฏิสนธิเกิดนอกตัวในน้ำทะเลจะได้ ตัวอ่อนของเพื่อยังหัวหอมที่มีลักษณะคล้ายลูกอ๊อดของกบ จึงเรียกว่าตัวอ่อนลูกอ๊อด (tadpole larva) ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นการแตกหน่อทำให้เกิดโคโลนี แต่ละตัวในโคโลนีมีขนาดเล็กแต่เมื่ออยู่รวมกันจะเป็นโคโลนีขนาดใหญ่

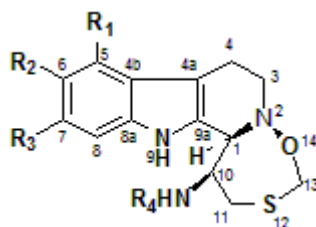
2.2 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ *Eudistoma* sp.

เพื่อยังหัวหอม genus *Eudistoma* มีรายงานการศึกษาว่าพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนมาก โดยมีโครงสร้างทางเคมีหลักเป็นสารกลุ่ม β -carboline โดย Rinehart et al., 1987 (9) ได้นำเพื่อยังหัวหอม *Eudistoma olivaceum* ที่เก็บจากบริเวณเขตน้ำตื้นในประเทศเม็กซิโก ประเทศเบลีซ และรัฐฟลอริดา มาสกัดพบสาร 17 สาร คือ eudistomins A-Q (4-19) ที่มีโครงสร้างเป็น β -carboline



A (4) $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{Br}$

M (5) $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{H}$

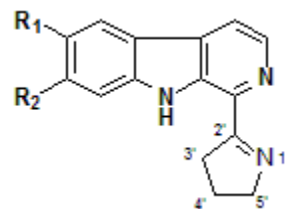
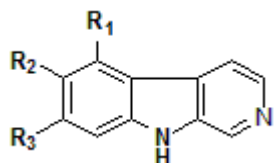


C (6) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{Br}$ $R_4 = \text{H}$

E (7) $R_1 = \text{Br}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{H}$ $R_4 = \text{H}$

F (8) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{Br}$ $R_4 = \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$

K (9) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{Br}$ $R_4 = \text{H}$



L (10) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{Br}$ $R_3 = \text{H}$

D (11) $R_1 = \text{Br}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{H}$

J (12) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_3 = \text{Br}$

N (13) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{Br}$ $R_3 = \text{H}$

O (14) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$ $R_3 = \text{Br}$

G (15) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{Br}$

H (16) $R_1 = \text{Br}$ $R_2 = \text{H}$

I (17) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{H}$

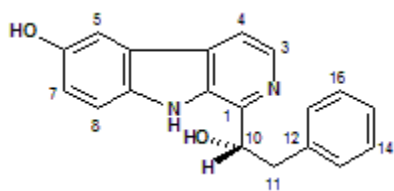
P (18) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{Br}$

Q (19) $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{H}$

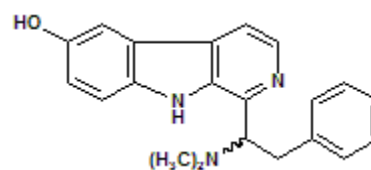
โครงสร้างของ eudistomins A-Q (4-19)

เมื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาของ eudistomins A-Q (4-19) เพื่อดูฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Herpes simplex* type 1 (HSV-1) โดยทดลองในเซลล์ CV-1 ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่โตของลิง ผลการทดสอบโดยการทำ HSV-1 assay พบว่าสารที่มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 มากที่สุด คือกลุ่มที่มี oxathiazepine ring และมี phenolic hydroxy group คือ eudistomins C (50 ng/disk) และ E (50 ng/disk) สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรองลงมา ได้แก่ eudistomins H, P, D และ N(+O) เท่ากับ 500 ng/disk และสารที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HSV-1 ได้แก่ A และ B

Schupp et al., 2003 (6) พบสารที่มีโครงสร้างหลักเป็น β -carboline 2 ชนิด คือ eudistomins W (20), X (21) ที่ได้จาก *Eudistoma* sp. หมู่เกาะแคโรไลน์ ประเทศไมโครนีเซีย เมื่อนำมาทดสอบโดยวัดโซนใส (zone of inhibition) ของ eudistomidin X ที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ ตามลำดับ พบว่ามีฤทธิ์ antibiotic ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* (17 และ 18 mm), *Staphylococcus aureus* (11 และ 12 mm), *Escherichia coli* (15 และ 20 mm) และมีฤทธิ์ fungicidal ต่อเชื้อ *Candida albicans* (17 and 18 mm) ในขณะที่ eudistomin W ไม่พบฤทธิ์ antibiotic แต่มีฤทธิ์ selective ต่อเชื้อ *C. albicans* ที่ zone of inhibition 13 mm เมื่อให้ความเข้มข้น eudistomin W เท่ากับ 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$



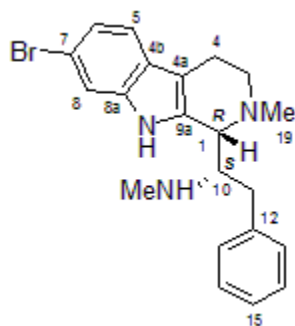
(20)



(21)

โครงสร้างของ eudistomin W (20) และ X (21)

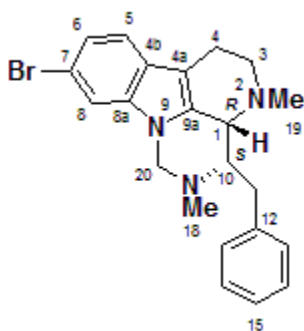
Takayashi et al. 2010 (8) พบสารที่เป็นโครงสร้าง β -carboline alkaloid คือ eudistomidin G (22) จาก *Eudistoma glaucus* จากเกาะในเมือง Okinawa ประเทศญี่ปุ่น แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารชนิดนี้



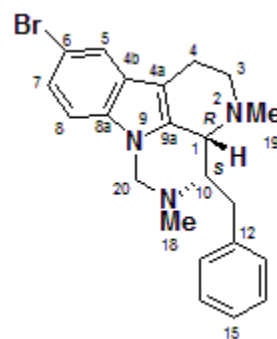
(22)

โครงสร้างของ eudistomidin G

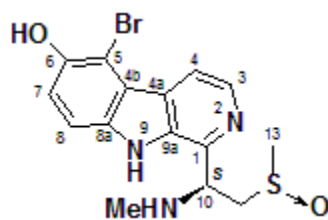
Suzuki et al. 2011 (11) พบสารที่มีโครงสร้างหลักเป็น β -carboline alkaloids 4 ชนิด คือ eudistomidins H–K (23–26) ที่ได้จาก *Eudistoma glaucus* จากเกาะในเมือง Okinawa ประเทศญี่ปุ่น และเมื่อนำมาตรวจสอบฤทธิ์ cytotoxicity ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388, L1210 และ human epidermoid carcinoma cells KB พบว่า eudistomidin J มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่แรงต่อเซลล์ P388, L1210 และ human epidermoid carcinoma cells KB โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.043, 0.047 และ 0.063 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่ eudistomidins H, I และ K ไม่มีฤทธิ์ $IC_{50} > 10.0 \mu\text{g/mL}$



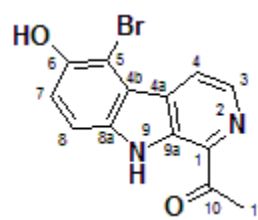
(23)



(24)



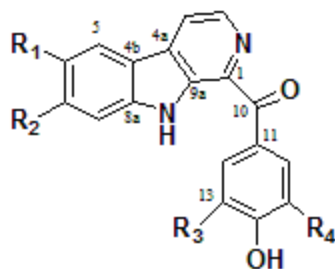
(25)



(26)

โครงสร้างของ eudistomidins H-K (23-26)

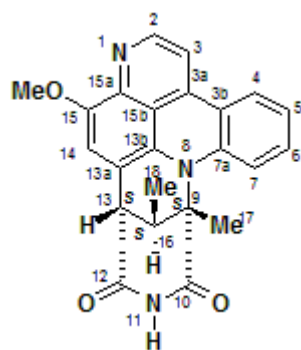
Wang et al. 2008 (5) ได้นำ *Eudistoma* sp. ที่เก็บจากเมือง Tong-Yeong ประเทศเกาหลีใต้ มาสกัดพบสาร eudistomidin Y₁-Y₇ (27-33) ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยการวัดค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) พบว่า eudistomidin Y₆ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในระดับกลางต่อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus epidermidis* และ *Bacillus subtilis* โดยมีค่า MICs เท่ากับ 12.5 และ 25 μg ตามลำดับ



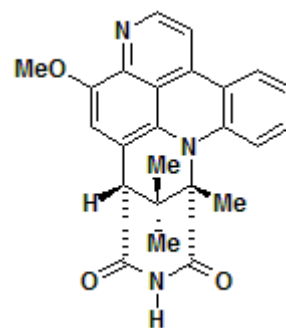
Y ₁ (27)	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =H	R ₄ =H
Y ₂ (28)	R ₁ =Br	R ₂ =H	R ₃ =H	R ₄ =H
Y ₃ (29)	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =Br	R ₄ =H
Y ₄ (30)	R ₁ =Br	R ₂ =H	R ₃ =Br	R ₄ =H
Y ₅ (31)	R ₁ =H	R ₂ =H	R ₃ =Br	R ₄ =Br
Y ₆ (32)	R ₁ =Br	R ₂ =H	R ₃ =Br	R ₄ =Br
Y ₇ (33)	R ₁ =H	R ₂ =Br	R ₃ =Br	R ₄ =Br

โครงสร้างของ eudistomidins Y₁-Y₇ (27-33)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสารที่มีโครงสร้างชนิดอื่นในเฟรียงหัวหอม โดย Viracaoundin et al., 2001 (12) พบ segoline C (34) และ A (35) ที่มีโครงสร้างเป็น tetracyclic benzo-3,6 diazaphenanthroline ring system ที่ได้จาก *Eudistoma bituminis* ที่พบใน Mayotte lagoon ทาง ตะวันตกเฉียงเหนือของ Madagascar



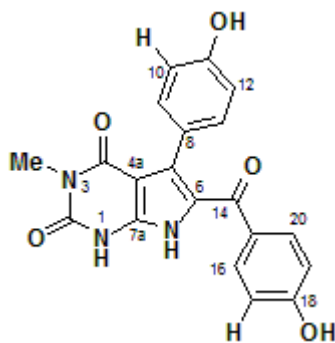
(34)



(35)

โครงสร้าง segoline C (34) และ A (35)

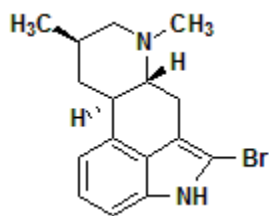
Davis et al., 2003 (13) พบสารที่มีโครงสร้างเป็น pyrrolopyrimidine alkaloid คือ rigidin E (36) ที่พบจาก *Eudistoma* sp. ประเทศปาปัวนิวกินี



(36)

โครงสร้างของ rigidin E (36)

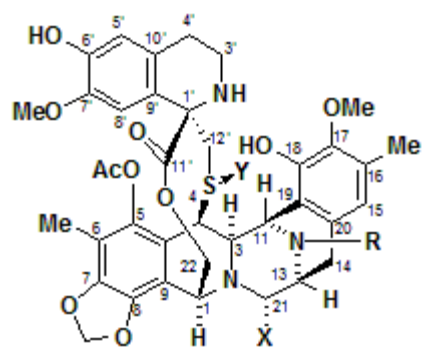
Makarieva et al., 1999 (14) พบ ergoline alkaloid คือ picobin (37) จาก *Eudistoma* sp. ซึ่งมีโครงสร้างเป็น (8 β)-2-bromo-6,8-dimethylergoline และเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับปานกลางต่อ Ehrlich carcinoma cells ในหนูทดลองมีค่า ED₅₀ 12.5 μ g/mL



(37)

โครงสร้างของ picobin (37)

ในประเทศไทยได้มีการรายงานการค้นพบเพรียงหัวหอมใน genus *Ecteinascidia* คือ *Ecteinascidia thurstoni* บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน จังหวัดภูเก็ต โดย Suwanborirux et al., 2002 (15) พบ Ecteinascidins (Et) 770 (38) และ 786 (39) จากเพรียงหัวหอมชนิดนี้ ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่ใกล้เคียงกับสาร Et 743 (40) (Trabectedin, Yondelis) ที่พบใน *Ecteinascidia turbinata* ในแถบทะเลแคริบเบียน และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนาเป็นยารักษา มะเร็งได้สำเร็จ และได้นำมาทดลองใช้กับผู้ป่วยภายในโรงพยาบาล โดยยา Yondelis® ถูกอนุมัติให้ใช้ในยุโรป รัสเซีย และเกาหลีใต้ เพื่อใช้สำหรับรักษามะเร็งเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue sarcoma) และ มะเร็งเต้านม นอกจากนี้ในประเทศไทยยังได้มีการศึกษาชีววิทยาของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* เพื่อการเพาะเลี้ยง (16) และมีการศึกษาเกี่ยวกับสาร Ecteinascidins 770 and 786 ที่ได้จากเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน จังหวัดภูเก็ต



ecteinascidins

770 (38): R = Me X = CN Y = none

786 (39): R = Me X = CN Y = O

743 (40): R = Me X = OH Y = none

โครงสร้างของ ecteinascidins 770(1), 786(2) และ 743(3)

จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเพรียงหัวหอม genus

Eudistoma ในประเทศไทย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ศึกษา

เพรียงหัวหอม (*Eudistoma* sp.) จากกระชังเพาะเลี้ยงในศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดจันทบุรี ที่เกาะอยู่บนเชือกที่ระดับความลึก 2-5 เมตร

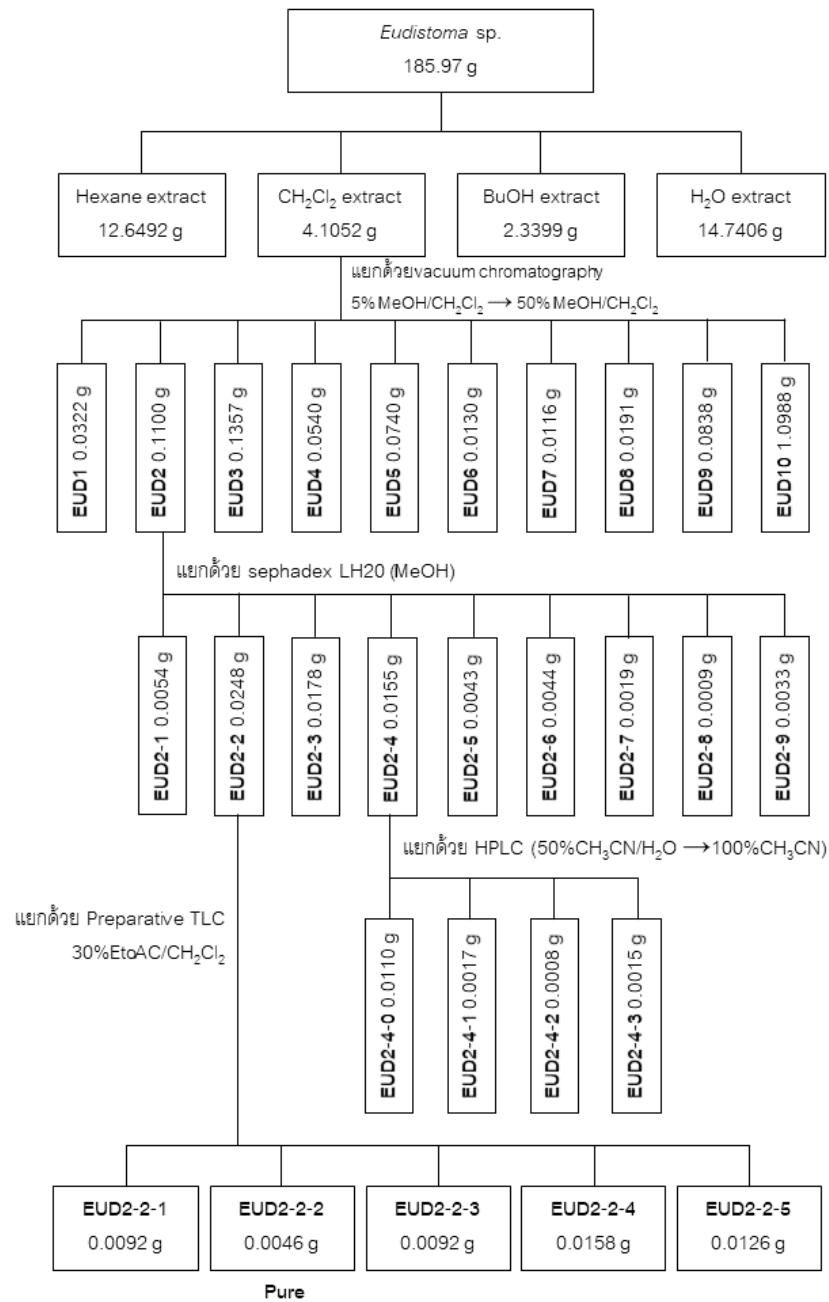
3.1.2 สารเคมี

- 1) Methanol
- 2) Dichloromethane grade AR
- 3) Hexane grade AR
- 4) Butanol
- 5) Acetonitrile
- 6) Acetic acid
- 7) Ethyl acetate
- 8) TLC silica gel ^{แผ่น} Silicycle UltraPure SILICA GELS
- 9) TLC C18 ^{แผ่น} Silicycle UltraPure SILICA GELS
- 10) Sephadex LH-20
- 11) Silica gel 60 (0.063 - 0.200 mm) for column chromatography ^{แผ่น} MERCK
- 12) HPLC Column VertiSep™ GES C18 4.6×150 mm ขนาด 5 µm
- 13) Dragendorff's reagent
- 14) Anisaldehyde reagent
- 15) Iodine

3.1.3 เครื่องมือ

- 1) เครื่อง freeze dry ยี่ห้อ LABCONCO รุ่น LCC-1-7382030
- 2) เครื่อง rotary evaporator ยี่ห้อ Buchi Multivapor รุ่น P-6
- 3) เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น MS 3002S
- 4) เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น MS 204
- 5) เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1200 Infinity Series
- 6) เครื่อง NMR 400 MHz ยี่ห้อ Bruker Ultrashield
- 7) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV visible spectrophotometry) ยี่ห้อ CAMAG

3.2 วิธีวิจัย



ภาพที่ 2 แผนผังขั้นตอนการทำวิจัย

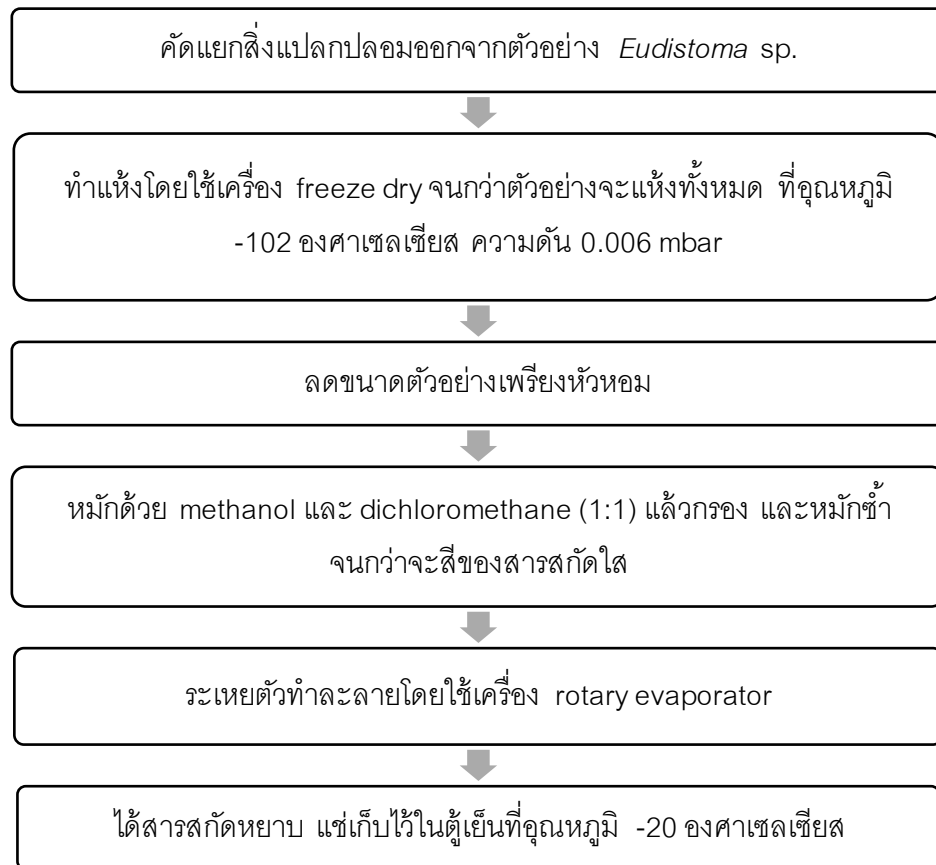
3.3 การเก็บตัวอย่างเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp.

เพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. เก็บตัวอย่างจากเขือกกระชังเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโครงการสมเด็จพระเทพฯ บริเวณอ่าวคู้กระเบน จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2559 โดยหลังจากนำขึ้นจากน้ำได้นำตัวอย่างแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทันที จนกระทั่งถึงห้องปฏิบัติการ จึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำตัวอย่างมาสกัด

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นโดยใช้การเทียบลักษณะภายนอกของเพรียงหัวหอมกับรายงานการศึกษาเดิม และแบ่งตัวอย่างเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. บางส่วนแช่ในสารละลาย ethanol ร้อยละ 70 (voucher specimen) เพื่อส่งพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยผู้เชี่ยวชาญต่อไป

3.4 การเตรียมสารสกัด *Eudistoma* sp.

การเตรียมสารสกัด *Eudistoma* sp. มีขั้นตอนการเตรียม ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยเริ่มจากนำตัวอย่างมาคัดแยกสิ่งแปลกปลอม เช่น เปลือกปู แล้วทำให้แห้งด้วยวิธีการ freeze dry ที่อุณหภูมิ -102 องศาเซลเซียส ความดัน 0.006 mbar จากนั้นนำมาลดขนาด แล้วนำตัวอย่างมาหมัก (maceration) ด้วย methanol และ dichloromethane (1:1) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองแยกกาก โดยขณะที่หมักนั้นให้เก็บไว้ในที่เย็นและมีดเพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายตัว และทำการหมักซ้ำจนกว่าตัวทำละลายที่ใช้หมักจะใส จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ นำไปแช่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



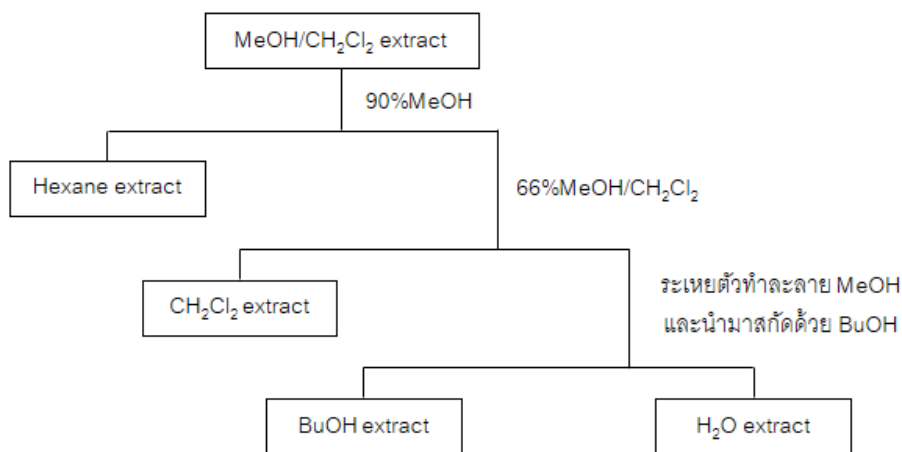
ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงการเตรียมสารสกัด *Eudistoma* sp.

สูตรการหาคำนวนหาค่า % yield ของสารสกัด เป็นการเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดที่ได้กับปริมาณสารตั้งต้น เพื่อให้ทราบต้นทุนการผลิตในแต่ละครั้ง

$$\% \text{ yield (w/w)} = (\text{น้ำหนักของสารสกัด} / \text{น้ำหนักแห้งของสาร}) \times 100$$

3.5 การสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction)

การสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลายเป็นเทคนิคการสกัดแยกสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกัน ได้แก่ hexane, dichloromethane, butanol และน้ำ โดยมีแนวทางในการสกัดดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แนวทางการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี liquid/liquid extraction

วิธีสกัดด้วยตัวทำละลายแบบ liquid/liquid extraction นำสารสกัดที่ได้จากการหมักด้วย MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) ละลายด้วย 90% MeOH ใส่ลงในกรวยแยก (separating funnel) และเติมสารละลาย hexane ให้ปริมาตรรวมเป็น $\frac{3}{4}$ ของปริมาตรกรวยแยก จากนั้นปิดจุกเขย่าเพื่อให้ตัวทำละลายทั้งสองมีผิวสัมผัสกันให้มากที่สุด และเปิด stopcock เพื่อลดความดันเป็นครั้งคราว รอให้สารผสมแยกออกจากกันแล้วจึงไขเก็บสารละลายชั้น hexane จากนั้นสกัดชั้น 90%MeOH ซ้ำด้วย hexane จนกว่าชั้นของสารละลาย hexane ใส นำสารละลาย hexane ทั้งหมดมารวมกันแล้วระเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator ได้สารสกัดชั้น hexane นำเอาน้ำ 90% MeOH หลังจากการสกัดด้วย hexane มาทำการเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นของสารละลายเพื่อใช้ในการสกัดเป็น 66% MeOH แล้วจึงทำการสกัดตัวอย่างด้วย dichloromethane เมื่อสารผสมแยกออกจากกัน จึงไขเก็บชั้น dichloromethane และทำการสกัดซ้ำจนกระทั่งสารละลายชั้น dichloromethane ใส นำสารละลายชั้น dichloromethane ทั้งหมดรวมกัน ระเหยแห้งจะได้สารสกัดในชั้น dichloromethane จากนั้นนำสารสกัด 66% MeOH ที่เหลือไประเหยตัวทำละลาย methanol ออกจนหมดโดยใช้เครื่อง rotary evaporator แล้วนำมาสกัดแยกด้วย butanol จนกว่าสารละลายชั้น butanol ใส จะได้สารสกัดชั้น butanol และสารสกัดชั้นน้ำ ตามลำดับ

สารสกัดในแต่ละชั้นได้ตรวจสอบสารสำคัญด้วยวิธี Thin layer Chromatography (TLC) โดยใช้ระบบ 10% MeOH/CH₂Cl₂ และนำไปตรวจสอบด้วย UV visible spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm โดยใช้ dragendroff spray reagent และ iodine chamber เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสาร

3.6 การแยกสารสกัดด้วย vacuum chromatography

นำสารสกัดในชั้น dichloromethane ของ *Eudistoma* sp. มาแยกออกเป็นส่วนๆ ด้วยวิธี vacuum chromatography โดยใช้ silica gel 60 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ใช้ระบบตัวทำละลาย hexane, 5% MeOH/ CH₂Cl₂, 10% MeOH/ CH₂Cl₂, 15% MeOH/ CH₂Cl₂, ตามลำดับในการแยกสาร จนกระทั่งสารละลายที่ได้ในตัวทำละลายแต่ละระบบไหล จากนั้นใช้ 20% MeOH/ CH₂Cl₂ และ 50% MeOH/ CH₂Cl₂ ตามลำดับจนกระทั่งไม่มีสารติดอยู่บน silica gel จา ทำการติดตามสารในแต่ละ fraction ด้วย TLC silica gel โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมคือ 10% MeOH/ CH₂Cl₂ และทำการรวม fraction ที่มี spot บน TLC คล้ายกันเข้าด้วยกัน จากนั้นนำมา ระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และซึ่งน้ำหนักแต่ละ fraction ทำการติดตามสารสำคัญด้วย TLC โดยใช้ UV visible spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm โดยใช้ Dragendroff's spray reagent และ iodine chamber เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติสารเบื้องต้น และ ติดตามสัญญาณ ¹H-NMR 400 MHz โดยใช้ CDCl₃ เป็นตัวทำละลาย

3.7 การแยกสารสกัดโดยใช้ sephadex LH20

การแยกสารสกัดโดยใช้ sephadex LH20 เป็นการแยกด้วยวิธี size exclusion โดยนำส่วน สกัด EUD 2 ที่ได้จากการสกัดด้วย vacuum chromatography มาแยกด้วย sephadex LH-20 column chromatography โดยใช้ methanol เป็นตัวชะสาร (eluting solvent) ทำการเก็บ fraction ตามสีที่ปรากฏ ซึ่งจนกระทั่งไม่มีสารติดอยู่บน sephadex จากนั้นติดตามสารสำคัญด้วย TLC silica gel โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมคือ 10% MeOH/ CH₂Cl₂ และทำการรวม fraction ที่ได้โดย สังเกต spot ของสารที่คล้ายกันบน TLC จากนั้นนำมาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

และซึ่งน้ำหนักแต่ละ fraction แล้วติดตามสารสำคัญด้วย TLC โดยการทดสอบโดย UV visible spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm และติดตามสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย

3.8 การแยกสารสกัดโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

สำหรับการแยกสกัดสาร EUD 2-4 ที่ได้จากการแยกสารสกัดด้วยวิธี sephadex LH20 โดยใช้ HPLC Column VertiSepTM GES C18 4.6×150 mm ขนาด 5 μm และ mobile phase : gradient 50% acetonitrile/ H_2O ถึง 100% acetonitrile เป็นเวลา 15 นาที อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที และ absorbance wavelength ที่ 254 nm จากนั้นนำสารสกัดที่แยกได้นำมาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และซึ่งน้ำหนักแต่ละ fraction และติดตามสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย

3.9 การแยกสกัดด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (TLC)

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการแยกสารสกัด EUD 2-2 ที่ได้จากการแยกสารสกัดด้วยวิธี sephadex LH20 ด้วยเทคนิค preparative TLC silica gel โดยใช้ระบบ 30% ethyl acetate/ CH_2Cl_2 และทำการตัดแผ่น TLC ในบริเวณที่มีแถบของสารขึ้นไป จากนั้นชุบบริเวณหน้าแผ่น TLC และชะสารออกจาก silica gel ด้วย ethyl acetate จนสารออกหมด จากนั้นนำสารสกัดที่แยกได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และซึ่งน้ำหนักแต่ละ fraction และติดตามสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย

3.10 การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์

สารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่ได้ นำมาตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกส์เรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR), อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy; IR), เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร (UV-visible spectrophotometer; UV-Vis) และ Electrospray Ionization Mass Spectrometer; (ESI-MS)

3.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ABTS)

เป็นการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วย ABTS โดยทำการเตรียมสารละลาย ABTS (DI) ความเข้มข้น 7 mM , Potassium persulfate (DI) ความเข้มข้น 2.4 mM ต่อจากนั้นทำการผสมสารละลาย ABTS กับสารละลาย Potassium persulfate ในอัตราส่วน 1:0.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ หลังจากนั้นทำการเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยน้ำ 200 ml ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.8 ต่อจากนั้นทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ได้แก่ vitamin C และ trolox ตามความเข้มข้น ดังนี้ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mM ต่อจากนั้นทำการเตรียมสารตัวอย่างในเอทานอลแล้วปิเปตสารตัวอย่างมา 100 μ l แล้วเติมสารละลาย ABTS 10 ml เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm นำมาคำนวณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox และ vitamin c แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลของกรดแอสคอร์บิก/กรัมสารสกัด (mM ascorbic acid equivalent antioxidant capacity/g sample extract) และมิลลิโมลาร์สมมูลของโทลอก/กรัมสารสกัด (mM trolox equivalent antioxidant capacity/g sample extract)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp.

ตัวอย่าง *Eudistoma* sp. ที่เกาะอยู่บริเวณเชือกจากกระชังเพาะเลี้ยงในโครงการพระราชดำริ อ่าวคุ้งกระเบน จ.จันทบุรี มีน้ำหนักเปียกทั้งหมด 1725.91 กรัม โดยเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. มีลักษณะผิวเป็นเม็ดสีเขียวจุดเหลือง อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม นอกจากนี้ยังพบหนอนตัวแบนขอบฟ้า (*Pseudoceros* spp.) ร่วมด้วย ดังภาพที่ 5 และได้แยก *Eudistoma* sp. เก็บส่วนหนึ่งเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเก็บไว้ใน 70%EtOH ให้รหัสตัวอย่างเป็น NC16-030-01 เก็บไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



ภาพที่ 5 ลักษณะบนผิวน้ำของเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp.

4.2 ผลการเตรียมสารสกัด *Eudistoma* sp.

ผลการเตรียมสารสกัดจาก *Eudistoma* sp. ให้แห้งโดยวิธี freeze dry ได้ตัวอย่างแห้ง 185.97 กรัม จากนั้นนำไปลดขนาด และหมักด้วย methanol : dichloromethane (1:1) ได้สารสกัดหยาบ 34.66 กรัม ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการสกัดเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ด้วยวิธีการหมัก MeOH: CH₂Cl₂ (1:1) และเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ (% yield)

ตัวอย่าง	น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)	MeOH: CH ₂ Cl ₂ extract 1:1 (กรัม)	% yield	ลักษณะสารสกัด
<i>Eudistoma</i> sp.	185.97	34.66	18.63	สีเขียวเข้ม หนืด

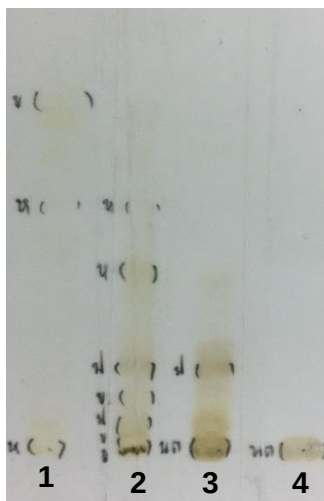
4.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายแบบ liquid/liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย hexane dichloromethane butanol และ น้ำ ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 น้ำหนักสารสกัดในแต่ละขั้นตอนของการสกัด และ %yield

สารสกัด <i>Eudistoma</i> sp.	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	%yield
สารสกัดชั้น hexane	12.6492	34.62
สารสกัดชั้น dichloromethane	4.1052	11.84
สารสกัดชั้น butanol	2.3399	6.75
สารสกัดชั้นน้ำ	14.7406	42.53

ทำการหาสารสำคัญของสารสกัดแต่ละชั้นด้วย TLC ชนิด silica gel โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมคือ 10% MeOH/ CH_2Cl_2 จากนั้นทดสอบด้วย Dragendroff's spray reagent ได้ผล negative และทดสอบด้วย anisaldehyde reagent ได้ผล negative ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารสกัดชั้นต่างๆ (SiO_2 ; 10%MeOH in CH_2Cl_2)

และทดสอบด้วย Dragendroff's spray reagent

1. สกัดด้วย hexane
2. สกัดด้วย dichloromethane
3. สกัดด้วย butanol
4. สกัดด้วยน้ำ

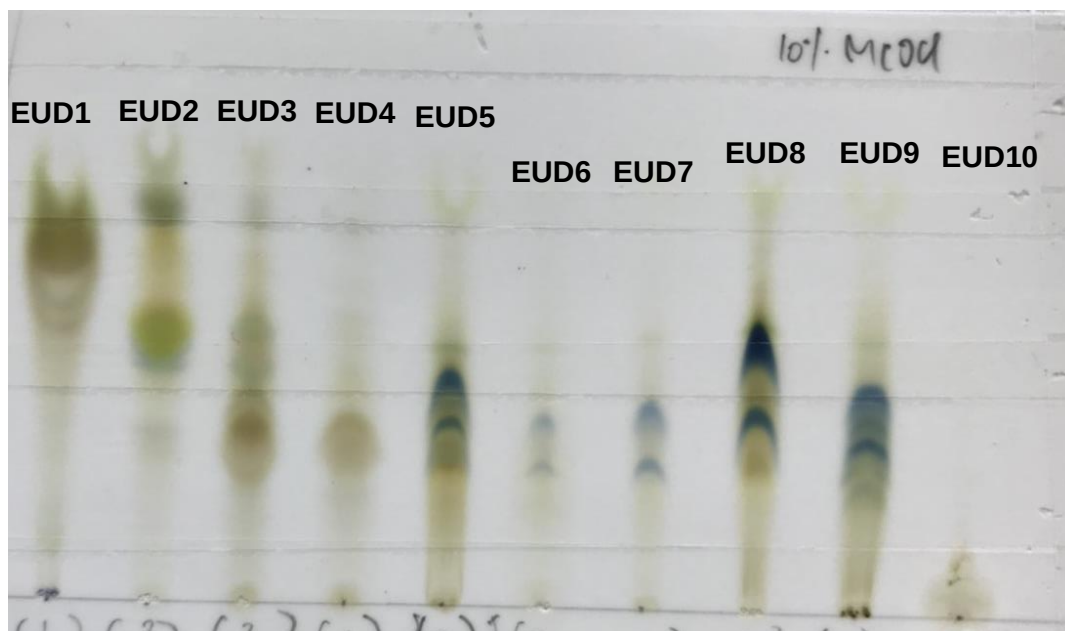
4.4 การแยกสารสกัดด้วย vacuum chromatography

จากการนำสารสกัดชั้น dichloromethane 4.1052 กรัม มาแยกออกเป็นส่วนๆ โดย vacuum chromatography โดยใช้ silica gel น้ำหนัก 181.23 กรัม คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร จากนั้นทำการรวมส่วนสกัดโดยสังเกต spot ที่คล้ายกันบน TLC ได้ทั้งหมด 10 fractions

(EUD1-EUD10) ได้ผลดัง**ตารางที่ 3** จากนั้นหาสารสำคัญของสารสกัดแต่ละชั้นด้วย TLC ชนิด silica gel โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมคือ 10% MeOH/ CH₂Cl₂ จากนั้นทดสอบด้วย Dragendorff's spray reagent ได้ผล negative ดัง**ภาพที่ 7** และได้ส่งตรวจพิสูจน์ด้วย ¹H-NMR ของทุก fraction ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา พบสัญญาณในช่วง 3-6 และ 7-9 ppm ในสารสกัด EUD2 ดัง**ภาพผนวกที่ ก.1** ซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดชั้นดังกล่าวมีสารที่มี chromophore ในกลุ่ม amines และ aromatic เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย vacuum chromatography

Fractions	น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้ (กรัม)
EUD 1	0.0322
EUD 2	0.1100
EUD 3	0.1357
EUD 4	0.0540
EUD 5	0.0740
EUD 6	0.0130
EUD 7	0.0116
EUD 8	0.0191
EUD 9	0.0838
EUD 10	1.0988



ภาพที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC (SiO_2 ; 10%MeOH in CH_2Cl_2)

ของส่วนสกัด EUD1 – EUD10

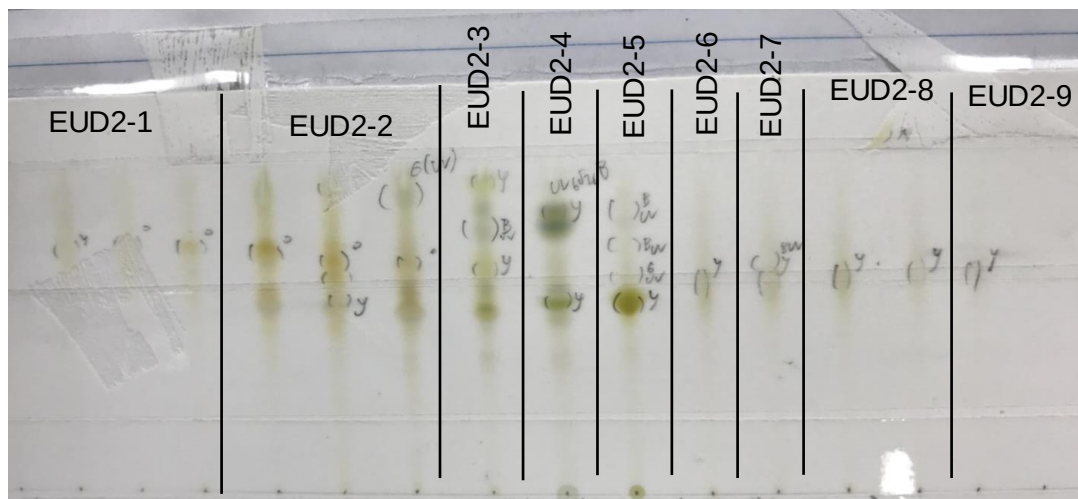
4.5 การแยกสารสกัดโดยใช้ sephadex LH20

จากการนำสารสกัด EUD2 ปริมาณ 0.1100 กรัม มาแยกออกเป็นส่วนๆ โดยใช้ sephadex LH20 ชะด้วย methanol จากนั้นทำการรวม fraction โดยสังเกต spot ที่คล้ายกันบนแผ่น TLC ได้ทั้งหมด 9 ส่วน (EUD2-1 – EUD2-9) ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย sephadex LH20

Fractions	น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้ (กรัม)
EUD 2-1	0.0054
EUD 2-2	0.0248
EUD 2-3	0.0178
EUD 2-4	0.0155
EUD 2-5	0.0043
EUD 2-6	0.0044
EUD 2-7	0.0019
EUD 2-8	0.0009
EUD 2-9	0.0033

จากนั้นตรวจสอบสารสำคัญในสารสกัดแต่ละชั้นด้วย TLC โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมคือ 10% MeOH/ CH₂Cl₂ ดังภาพที่ 8 และได้ส่งตรวจสัญญาณ ¹H-NMR ของทุก fraction พบว่าส่วนสกัด EUD 2-2 และ EUD 2-4 ดังภาพผนวกที่ ก.2 และภาพผนวกที่ ก.3 ตามลำดับ พบสัญญาณ ¹H-NMR ที่ 3-5, 6-7 และ 8-9 ppm ซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดชั้นดังกล่าวมีสารที่มี chromophore ในกลุ่ม amines และ aromatic เป็นองค์ประกอบ



ภาพที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC (SiO_2 ; 10%MeOH in CH_2Cl_2)

ของส่วนสกัด EUD 2-1 ถึง EUD 2-9 โดยทดสอบได้ UV 254 และ 366 nm

4.6 การแยกสารสกัดโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการนำสารสกัด EUD 2-4 ปริมาณ 0.0155 กรัม โดยใช้ HPLC Column VertiSep™ GES C18 4.6×150 mm ขนาด 5 μm และ mobile phase : gradient 50% acetonitrile/ H_2O ถึง 100% acetonitrile เป็นเวลา 15 นาที อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที และ absorbance wavelength ที่ 254 nm โดยเก็บตามช่วงเวลาที่พบโครมาโทแกรมขึ้น ได้แก่ ช่วงเวลาที่ 2.1 – 2.9, 6.5-7.2 และ 11-12 นาทีตามลำดับ และเก็บสารทั้งหมดที่อยู่ระหว่างช่วงเวลารวมเข้าด้วยกันได้ทั้งหมด 4 fractions (EUD 2-4-0 ถึง EUD 2-4-3) ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย HPLC

Fractions	ช่วงเวลาที่เก็บสารสกัด (นาที)	น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้ (กรัม)
EUD 2-4-0	ระหว่างช่วงเวลากัด	0.0110
EUD 2-4-1	2.1 – 2.9	0.0017
EUD 2-4-2	6.5 – 7.2	0.0008
EUD 2-4-3	11 – 12	0.0015

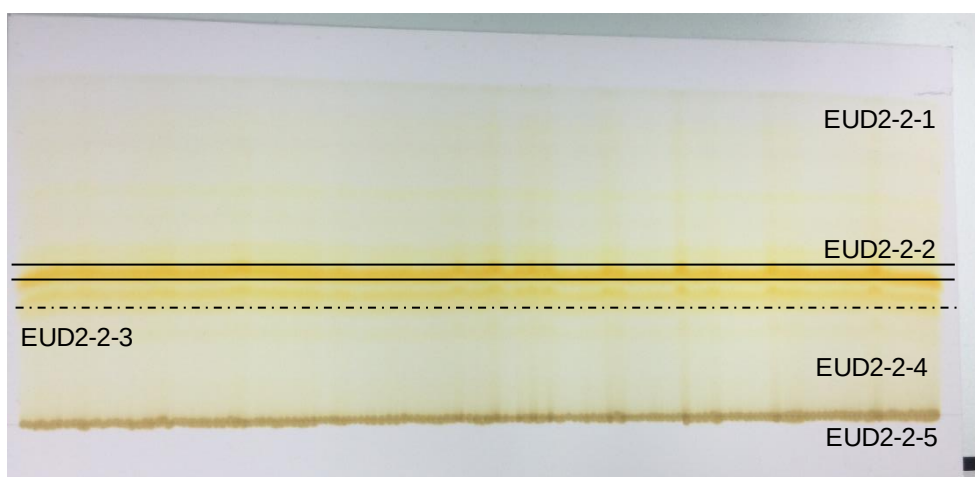
จากนั้นได้ส่งตรวจพิสูจน์ $^1\text{H-NMR}$ ของ EUD 2-4-1, EUD 2-4-2 และ EUD 2-4-3 พบสัญญาณที่น่าสนใจในช่วง 7-9 ppm ในส่วนสกัดที่ EUD2-4-3 ดังภาพผนวกที่ ก.4 เนื่องจากสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ ยังคงมีสารเจือปน และมีปริมาณสารคงเหลือน้อยมาก จึงไม่สามารถสกัดแยกต่อไปได้นอกจากนี้ยังได้ส่งตรวจพิสูจน์เพิ่มเติมจาก GC-MS และเมื่อเทียบกับ reference พบว่าเป็นสาร 9-octadecenamide ดังภาพผนวกที่ ก.4-1

4.7 การแยกสกัดด้วยวิธี preparative thin layer chromatography (TLC)

จากการนำสารสกัด EUD2-2 ปริมาณ 0.0248 กรัม มาแยกสกัดด้วย silica phase TLC โดยใช้ระบบ 30% ethyl acetate/ CH_2Cl_2 ได้ทั้งหมด 5 ส่วน (EUD2-2-1 ถึง EUD 2-2-2) ได้ผลดัง ตารางที่ 6 โดยลักษณะ spot ของ EUD 2-2-2 มีสีส้มแดงชัดเจน ดังภาพที่ 9 จากนั้นได้ส่งตรวจพิสูจน์ $^1\text{H-NMR}$ ของ EUD 2-2-2 และ EUD 2-2-3 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา พบส่วนสกัดที่เป็นสารบริสุทธิ์ คือ EUD2-2-2 ดังภาพผนวกที่ ก.5

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย TLC

Fractions	น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้ (กรัม)
EUD 2-2-1	0.0092
EUD 2-2-2	0.0046
EUD 2-2-3	0.0092
EUD 2-2-4	0.0158
EUD 2-2-5	0.0126



ภาพที่ 9 แสดงผลการสกัดด้วย TLC ของส่วนสกัด EUD2-2-1 ถึง EUD 2-2-5

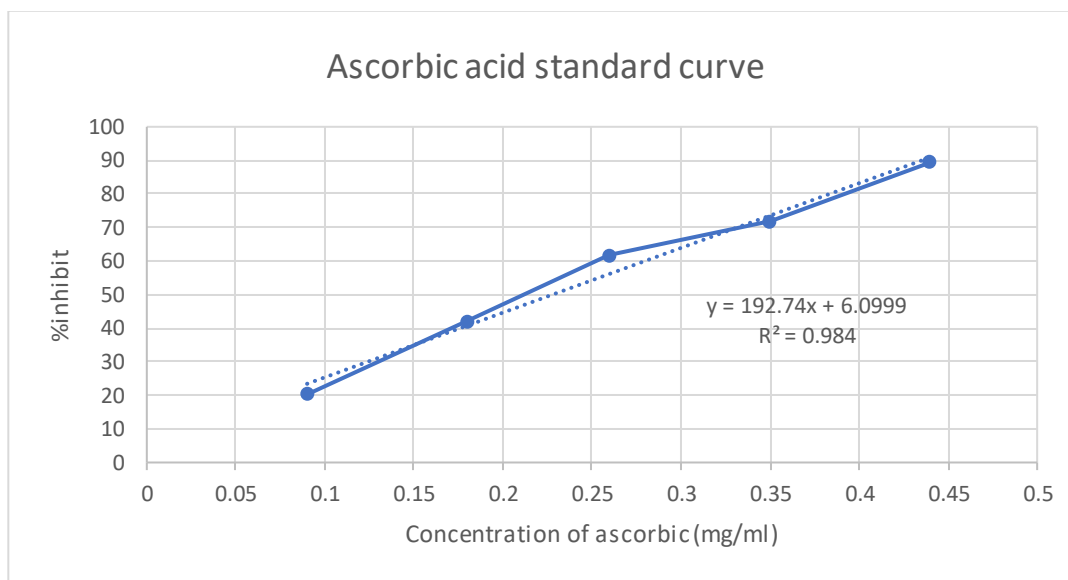
4.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ABTS)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยทำการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้แก่ vitamin c และ trolox ซึ่งแสดงค่าเป็นร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระในแต่ละความเข้มข้น ได้ผลดังต่อไปนี้

ตารางที่ 7 แสดงค่าเป็นร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยสารละลายมาตรฐาน vitamin c ในแต่ละความเข้มข้น

Concentration of vitamin c (mg/ml)	% inhibition
0.09	20.277
0.18	41.999
0.26	61.271
0.35	71.716
0.44	89.370

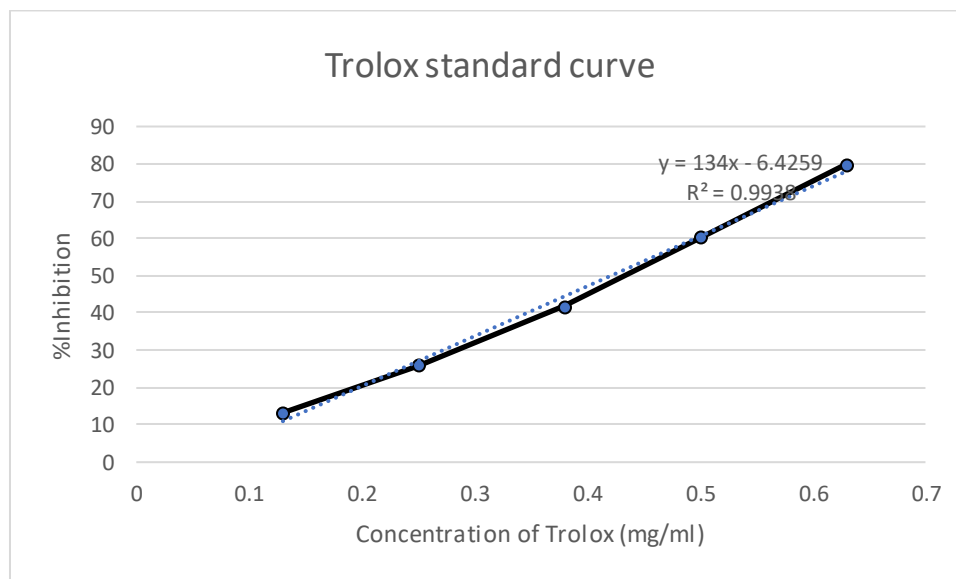
ภาพที่ 10 แสดง calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน vitamin c ในแต่ละความเข้มข้น



ตารางที่ 8 แสดงค่าเป็นร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยสารละลายมาตรฐาน trolox ในแต่ละความเข้มข้น

Concentration of trolox (mg/ml)	% inhibition
0.09	13.252
0.18	26.054
0.26	41.768
0.35	60.116
0.44	79.942

ภาพที่ 11 แสดง calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน trolox ในแต่ละความเข้มข้น



ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS แสดงค่าเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน trolox ซึ่งแสดงค่าในรูปมิลลิโมลาร์สมมูลของโทลอก/กรัมสารสกัด (mM trolox equivalent antioxidant capacity/g sample extract) พบว่าสารสกัดชั้น hexane, dichloromethane, butanol และน้ำมีค่า TEAC เท่ากับ 2.265, 22.308, 32.792 และ 12.581 mM trolox/g extract ตามลำดับ

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล vitamin c ในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลของกรดแอสคอร์บิก/กรัมสารสกัด (mM ascorbic acid equivalent antioxidant capacity/g sample extract) พบว่าสารสกัดชั้น hexane, dichloromethane, butanol และน้ำมีค่า VEAC เท่ากับ 1.061, 10.394, 17.025 และ 4.243 mM ascorbic acid/g extract ตามลำดับ ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบเท่าสารละลายมาตรฐาน

Fractions	ABTS radical scavenging assay	
	Mg TEAC/g extract	Mg VCEC/g extract
Hexane extract	2.265	1.061
Dichloromethane extract	22.308	10.394
Butanol extract	32.792	17.025
Water extract	12.581	4.243

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การเก็บตัวอย่างเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp.

ลักษณะทางกายภาพ *Eudistoma* sp. จากการเก็บตัวอย่างมีลักษณะเป็น สีเขียวเข้มถึงดำ ดัง ภาพที่ 5 โดยขั้นตอนกระบวนการเก็บตัวอย่างนี้จะต้องทำการเก็บรักษาอุณหภูมิที่ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพของ *Eudistoma* sp. จนกว่าจะนำไปทำการสกัด

5.2 ผลการเตรียมสารสกัด *Eudistoma* sp.

จากผลการเตรียมสารสกัดเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. ด้วยวิธีการหมัก methanol : dichloromethane (1:1) การผสม dichloromethane ลงในระบบจะช่วยให้เซลล์ของสิ่งมีชีวิตแตกทำให้สามารถสกัดสารได้มากกว่าการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว ได้สารสกัดที่ได้มีสีเขียวเข้มถึงดำซึ่งมี % yield เท่ากับ 18.63 ซึ่งคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ yield (w/w)} = (\text{น้ำหนักของสารสกัด} / \text{น้ำหนักแห้งของสาร}) \times 100$$

5.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction)

การแยกองค์ประกอบทางเคมีจาก *Eudistoma* sp. โดยวิธีการ partition ซึ่งแบ่งตามขั้วของสารละลายสามารถแยกได้ทั้งหมด 4 ชั้น ได้แก่ชั้น hexane, dichloromethane, butanol และน้ำ ได้ %yield เท่ากับ 34.62%, 11.84%, 6.75% และ 42.53% ตามลำดับ จากตรวจสอบสารสำคัญด้วย TLC และการส่องภายใต้แสง UV lamp พบว่า ชั้น dichloromethane เป็นชั้นที่มีจำนวนสารที่แยกได้มากที่สุด

สารสกัด hexane สารสกัดที่มีน้ำหนักของสารสกัดมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเพรียงหัวหอม *Eudistoma* sp. มีสารกลุ่มขี้ด้าในปริมาณสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเพรียงหัวหอมเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ที่มีสารจำพวกไขมันเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งสารกลุ่มสเตอรอยด์

ชั้นน้ำเป็นชั้นที่มีน้ำหนักของสารสกัดมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำมีความสามารถในการละลายสารกลุ่มที่มีขี้ด้าสูง ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตในทะเลคือสารในกลุ่มของเกลือที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี รวมถึงกรดอะมิโนที่อาจละลายในน้ำได้เช่นกัน

5.4 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี vacuum chromatography

จากการการแยกองค์ประกอบทางเคมีจาก *Eudistoma* sp. โดยวิธี column chromatography โดยใช้ระบบ 10% MeOH/ CH_2Cl_2 ทำให้ได้สารสกัด EUD ทั้งหมด 10 fractions ดังภาพที่ 7 จึงทำการตรวจสอบสารสำคัญด้วย TLC ที่ส่องภายใต้แสง UV lamp และ $^1\text{H-NMR}$ พบว่า EUD 2 และ EUD 3 มีความน่าสนใจเพราะว่ามีสัญญาณชั้นที่ตำแหน่ง 7 – 9 ppm เป็นตำแหน่งที่แสดงถึงโครงสร้าง aromatic แต่เนื่องจาก EUD 2 มีจำนวนสารที่ดูดกลืนแสงภายใต้เครื่อง UV-lamp ที่ 366 nm มากกว่า EUD3 จึงเลือก EUD2 มาสกัดในขั้นต่อไป

5.5 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี sephadex LH20

จากการการแยกองค์ประกอบทางเคมีจาก *Eudistoma* sp. โดยวิธี column chromatography ทำให้เลือก EUD 2 มาทำการสกัดโดยวิธี sephadex ซะด้วย MeOH แยกเก็บ fractions ตามแถบสีที่ปรากฏ ได้ทั้งหมด 9 fractions ดังตารางที่ 4 จึงทำการตรวจสอบสารสำคัญด้วย TLC ที่ส่องภายใต้แสง UV lamp และ $^1\text{H-NMR}$ พบว่า มีสัญญาณที่ตำแหน่ง 7 - 9 ppm แสดงถึงโครงสร้าง aromatic เช่นเดียวกับ EUD 2 ซึ่งเป็นสารสกัดเริ่มต้น แต่พบสัญญาณบนเบื่อนที่ตำแหน่งอื่นๆ ลดน้อยลง เมื่อพิจารณาสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ พบว่า EUD 2-2 ถึง EUD 2-4 ปรากฏสัญญาณที่ 3-5 และ 7-9 ppm ซึ่งบ่งชี้ถึงกลุ่ม aromatic และ amine

5.6 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี High Performance Liquid

Chromatography (HPLC)

สกัดแยกสาร EUD 2-4 (0.0155 g) ด้วยเทคนิค HPLC โดยการเก็บแยกตามพีคที่ปรากฏที่ UV 254 nm ได้สารสกัด EUD 2-4-1 ถึง 2-4-4 เมื่อวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ แล้วพบว่าสารยังไม่บริสุทธิ์ ประกอบกับปริมาณสารในแต่ละ fraction มีปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถนำ fraction ดังกล่าวมา สกัดแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปได้

5.7 การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี preparative TLC

เนื่องจากการแยกสารสกัด EUD 2-4-3 โดยวิธี HPLC นั้น ไม่สามารถทำให้สารบริสุทธิ์ได้ รวมทั้ง สารมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะนำไปวิเคราะห์ $^{13}\text{C-NMR}$ ได้ จึงเลือกสารสกัด EUD 2-2 มาเพื่อ ทำการแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วย TLC (SiO_2 ; 30% $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) ได้สารทั้งหมด 3 spots บนแผ่น TLC ตัดแยกแผ่น TLC ของแต่ละ spot ออกจากกัน แล้วชะด้วย EtOAc ได้สารทั้งหมด 5 fractions เมื่อนำไปติดตามสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ พบว่า EUD 2-2-2 เป็นสารบริสุทธิ์ ทั้งนี้อยู่ในระหว่างการแปล โครงสร้างทางเคมี

5.8 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ABTS)

จากการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด จากพริกแห้งหอมในแต่ละชั้น ได้แก่ ชั้น hexane, dichloromethane, butanol และ น้ำ พบว่าสาร สกัดจากชั้น butanol มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้แก่ vitamin c และ trolox ดังนั้นเพื่อพัฒนาสารจากพริกแห้งหอมมาใช้เป็นยานั้นควรมีการศึกษา ต่อยอดเพื่อทราบถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้ในครั้งนี้ว่าเป็นผลมาจากสารสำคัญชนิดใด และศึกษา ถึงกลไกการออกฤทธิ์ต่อไป

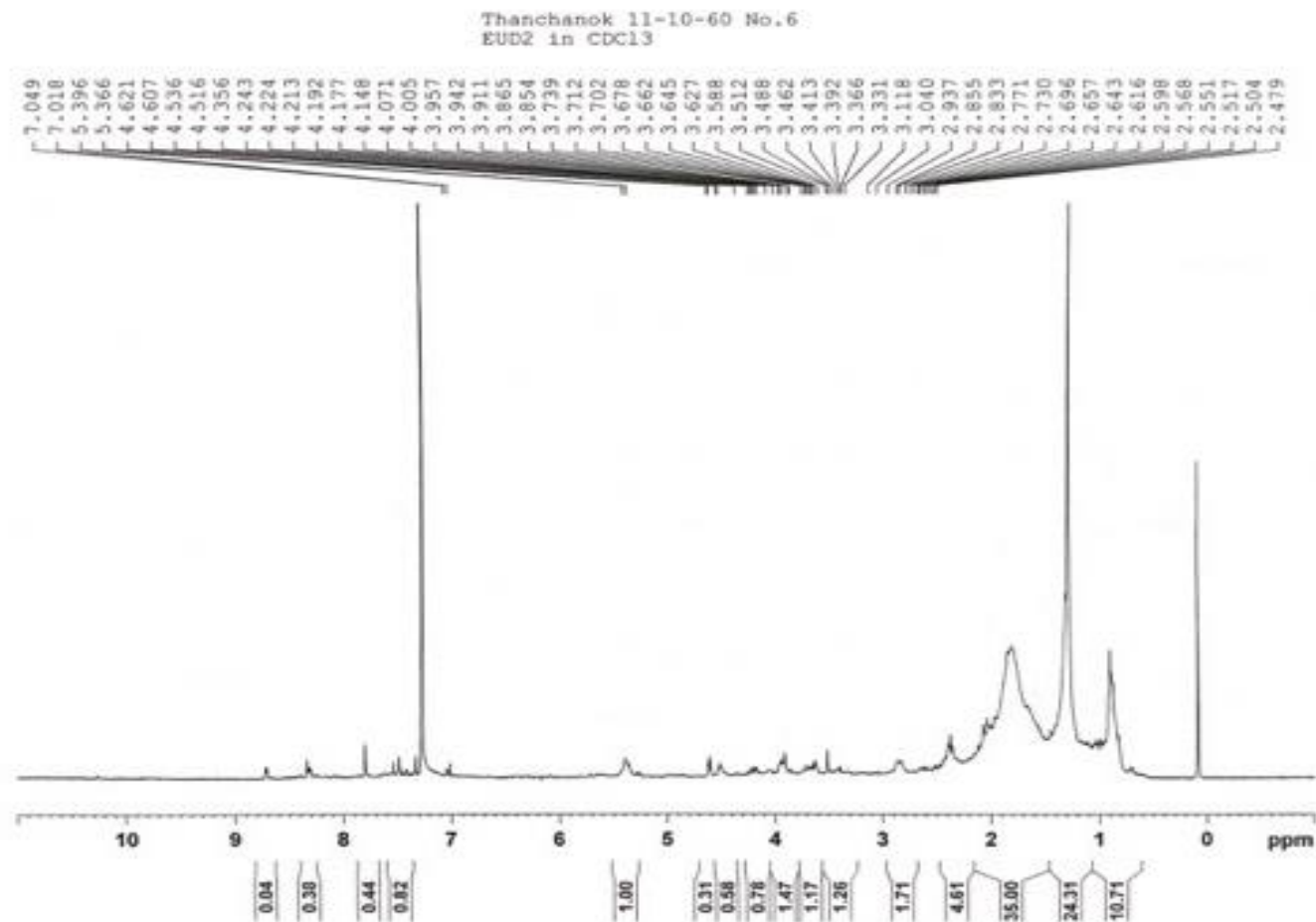
เอกสารอ้างอิง

1. Ottinger S, Klöppel A, Rausch V, Liu L, Kallifatidis G, Gross W et al. Targeting of pancreatic and prostate cancer stem cell characteristics by *Crambe crambe* marine sponge extract. IJC. 2011;130(17): 1671–1681.
2. Hassan S, Masarciková R, Berchová K. Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. JPP. 2015;67(10): 1325–1336.
3. Montaser R, Luesch H. Marine natural products: a new wave of drugs. Future medicinal chemistry. 2011;3(12):1475-1489.
4. Kesteren V, Vooght D, Lázaro L, Schellens M, Beijnen J. Yondelis[®] (trabectedin, ET-743): the development of an anticancer agent of marine origin. Anti-Cancer Drugs. 2003;14(7):487-502.
5. Wang W, Nam S, Lee B, Kang H. β -Carboline alkaloid from a korean tunicate *Eudistoma* sp. J Nat Prod. 2008(71):163-6.
6. Schupp P, Poehner T, Edrada R, Ebel R, Berg A, Wray V et al. Eudistomins W and X, two new β -Carbolines from the Micronesian Tunicate *Eudistoma* sp. J Nat Prod. 2003;2(66):272-5.
7. Jimenez P, Wilke D, Takeara R, Lotufo T, Pessoa C, Odorico de Moraes M et al. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea) 2008.
8. Takahashi Y, Ishiyama H, Kubota T, Kobayashi J. Eudistomidin G, a new β -carboline alkaloid from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus* and structure revision of eudistomidin B. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2010;14(20):4100-3.

9. Rinehart KL, Kobayashi J, Harbour GC, Gilmore J, Mascal M et al. Eudistomins A-Q, β -carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. Journal of the American Chemical Society. 1987;11(109):3378-87.
10. Kobayashi J, Nakamura H, Ohizumi Y. Eudistomidin-A, a novel calmodulin antagonist from the okinawan tunicate *Eudistoma glaucus*. 1986;10(27):1191-4.
11. Suzuki T, Kubota T, Kobayashi J. Eudistomidins H-K, new β -carboline alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*. Bioorg Med Chem Lett. 2011;21(14):4220-3.
12. Viracaoundin I, Faure R, Gaydou EM, Aknin M. A new alkaloid from the purple indian ocean tunicate *Eudistoma bituminis*. Tetrahedron Letters. 2001;42(14):2669-2671.
13. Davis RA, Christensen LV, Richardson AD, Rocha RM, Ireland CM. Rigidin E, a new pyrrolopyrimidine alkaloid from a Papua New Guinea tunicate *Eudistoma* species. Mar Drugs. 2003;1(4):27-33.
14. Makarieva TN, Llyin SG, Stonik VA, Lyssenko KA, Denisenko VA. Picobin, the first ergoline marine alkaloid from the Far-Eastern ascidian *Eudistoma* sp. Tetrahedron Letters. 1999;40(8):1591-1594.
15. Suwanborirux CK, Amnuoypol S, Pummangura S, Kubo A, Saito N. Ecteinascidins 770 and 786 from the Thai Tunicate *Ecteinascidia thurstoni*. J Nat Prod. 2002;6(65):935-7.
16. ปิยะ โกยสิน, สุชนา ขวัญชัย, วรณพ วิทยาญจน์, สมเกียรติ ปิยะธีรวิจิตรกุล, เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, คณิต สุวรรณบริรักษ์. ชีววิทยาของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 เพื่อการเพาะเลี้ยง. รายงานในโครงการ BRT. 2549:227-37.

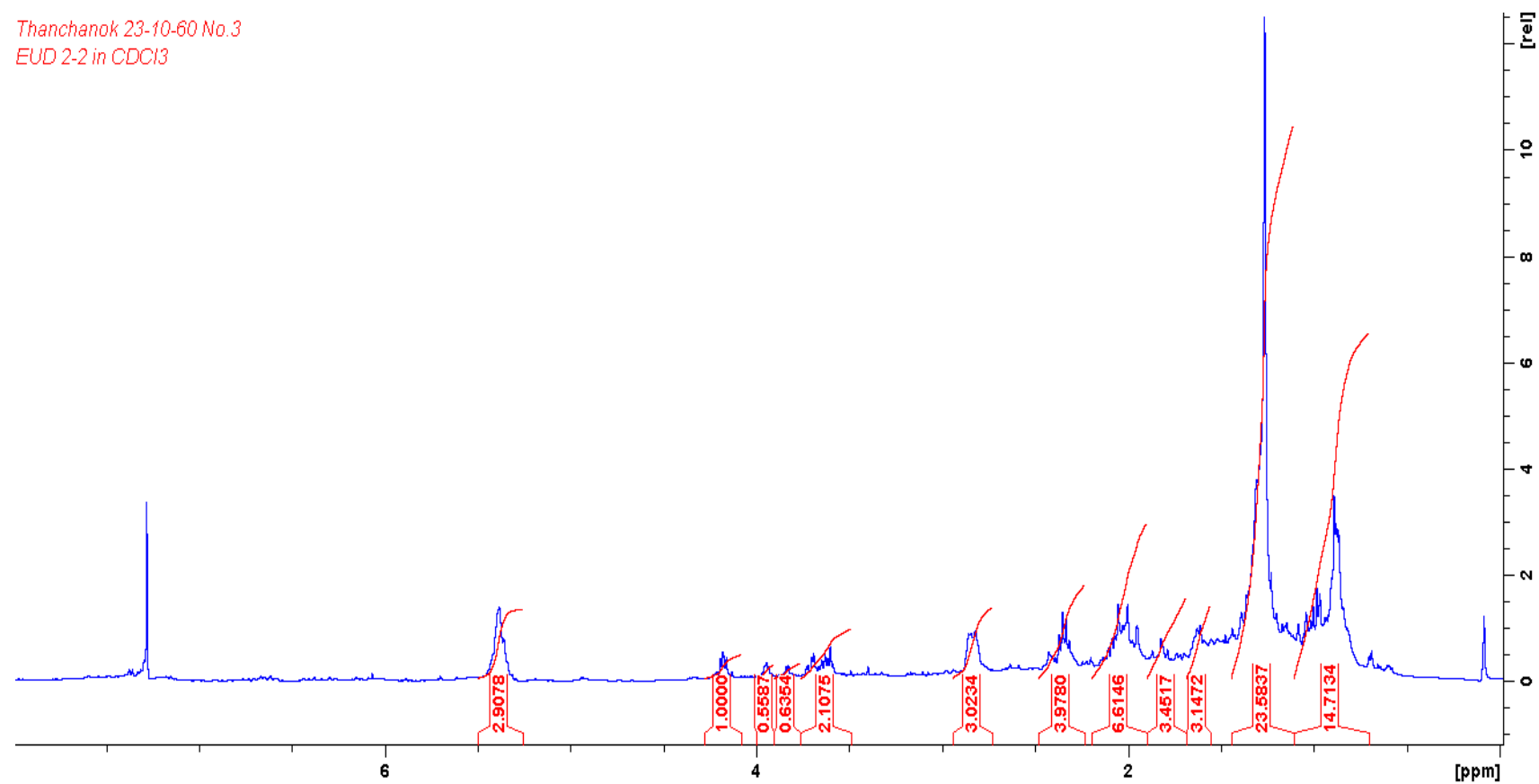
ภาคผนวก

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; ^1H -NMR



ภาพที่ ก.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง EUD2 ด้วย ^1H -NMR

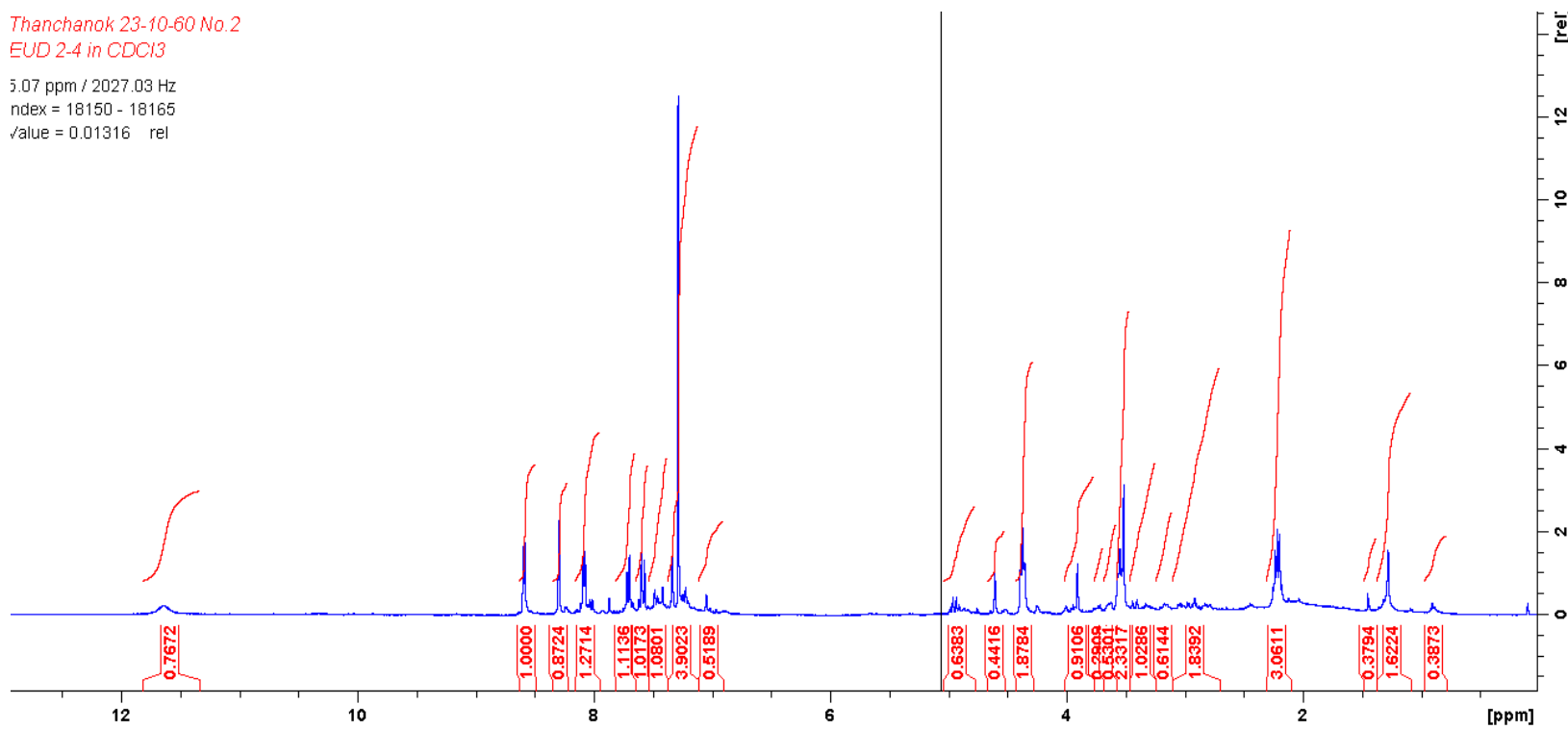
Thanchanok 23-10-60 No.3
EUD 2-2 in CDCl₃



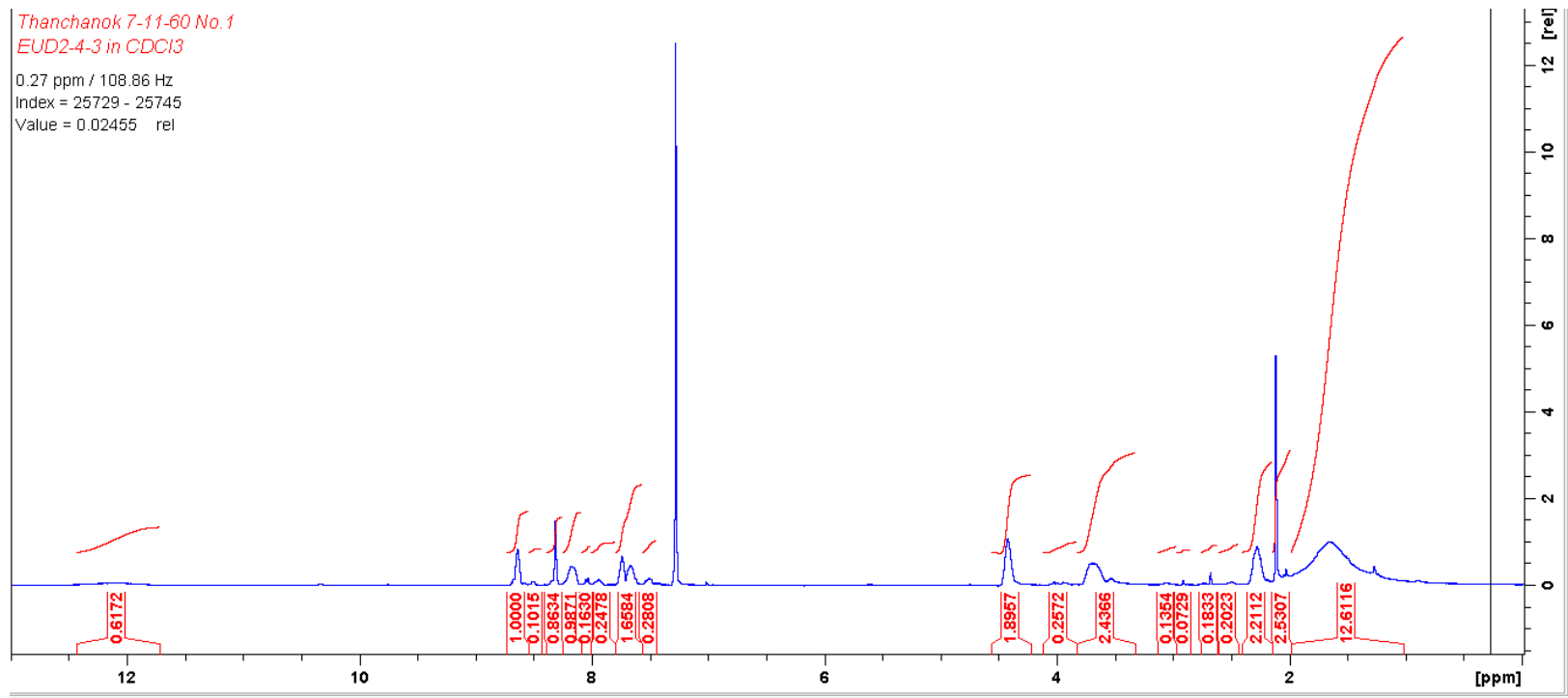
ภาพที่ ก.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง EUD2-2 ด้วย ¹H-NMR

Thanchanok 23-10-60 No.2
EUD 2-4 in CDCl₃

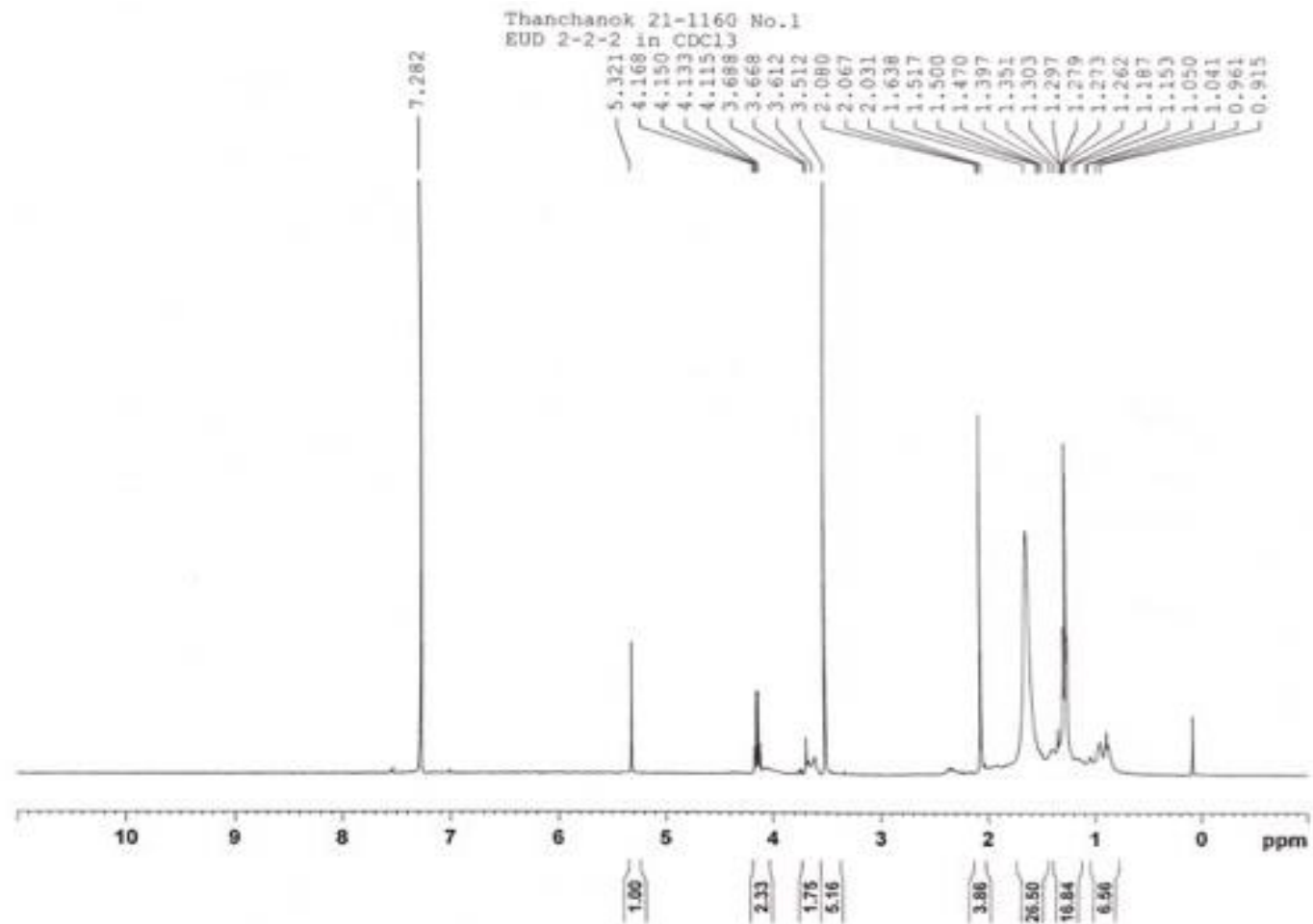
5.07 ppm / 2027.03 Hz
ndex = 18150 - 18165
value = 0.01316 rel



ภาพที่ ก.3 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง EUD2-4 ด้วย ¹H-NMR

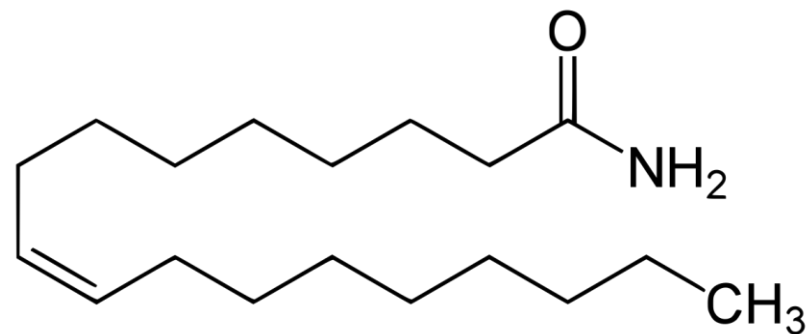
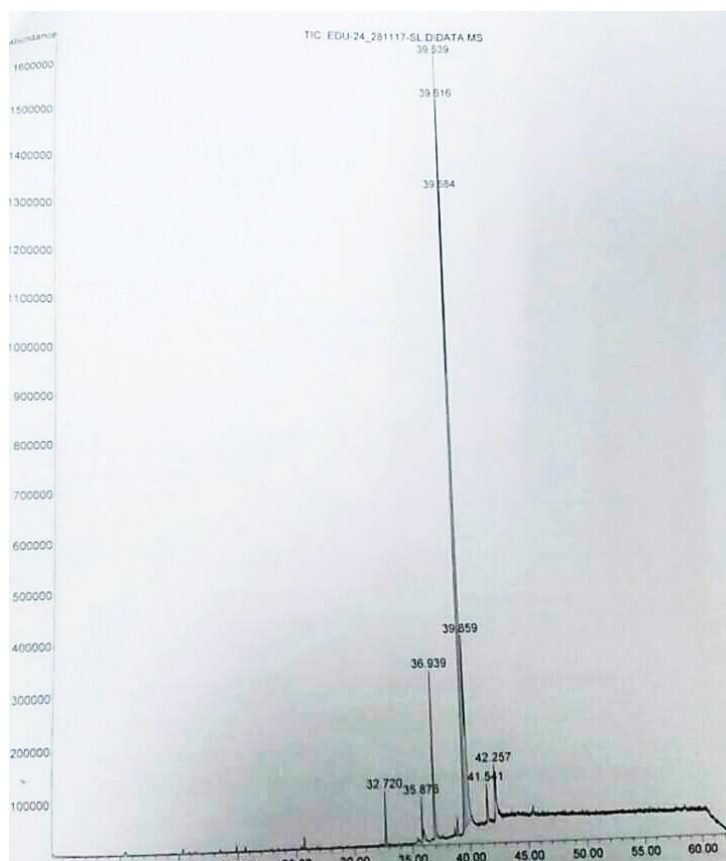


ภาพที่ ก.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง EUD2-4-3 ด้วย ¹H-NMR



ภาพที่ ก.5 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง EUD2-2-2 ด้วย $^1\text{H-NMR}$

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย Gas Chromatograph-Mass Spectrometer; GC-MS



9-octadecenamide
(Oleamide)

ภาพที่ ก.4-1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง EUD 2-4-3 ด้วย GC-MS