รงควัตถุและฤทธิ์ทางชีวภาพจากหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* และสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp.

The pigments and biological activities from the sea grass *Halodule pinifolia* and the alga *Dictyota* sp.

เนาวรัตน์ กองคำ และ จงกลณี จงอร่ามเรือง*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จ.ชลบุรี 20131

Naowarat Kongkam and Jongkolnee Jongaramruong*

Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

บทคัดย่อ

13^2-hydroxypheophytin a (**1**) และ 13^2-hydroxypheophythin b (**2**) เป็นสารในกลุ่มคลอโรฟิลล์แยกได้จากหญ้าทะเล *Halodule pinifolia* ส่วน fucoxanthin (**3**) แยกได้จากสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp.โดยทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค column และ preparative thin layer chromatography และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี และแมสสเปกโทรเมตรี ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรงควัตถุ **1** และ **2** ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อไวรัสเริมที่ปาก (HSV-1) และเชื้อวัณโรค (TB) ส่วนรงควัตถุ **3** แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ที่ระดับ IC_{50} 2.9 μg/mL และยับยั้งเชื้อไวรัสเริมที่ปาก ที่ระดับ IC_{50} 5.0 μg/mL

คำสำคัญ : รงควัตถุ fucoxanthin คลอโรฟิลล์ pheophytin ฤทธิ์ทางชีวภาพ ไวรัสเริม วัณโรค มาลาเรีย หญ้าทะเล *Halodule* สาหร่ายทะเล *Dictyota*

Abstract

Two chlorophyll derivatives ,13^2-hydroxypheophytin a and 13^2-hydroxypheophytin b, were isolated from the sea grass *Halodule pinifolia*, fucoxanthin was isolated from the algae *Dictyota* sp.. These compounds were purified by column and preparative thin-layer chromatography. Their structures were elucidated by NMR spectroscopy and mass spectrometry. The pigments **1** and **2** were inactive against *Herpes simplex* virus type 1 (HSV-1) and tuberculosis (TB). The pigment **3** was active against *Plasmodium falciparum* at IC_{50} 2.9 (μg/mL and HSV-1 at IC_{50} 5.0 μg/mL.

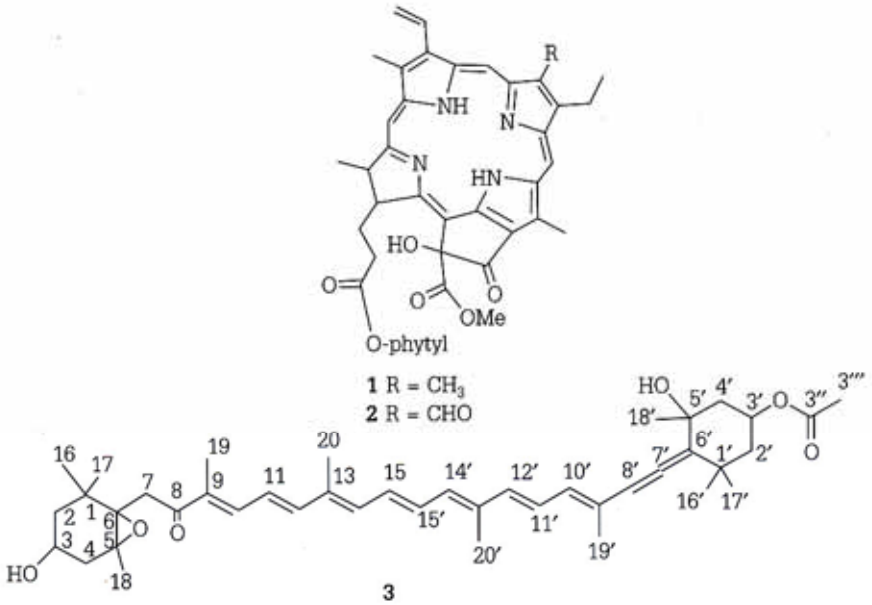
Keywords : pigments, fucoxanthin, chlorophyll, pheophytin, bioactivities, *Herpes simplex* virus, tuberculosis, malaria, *Halodule*, *Dictyota*

* **Corresponding author.** E-mail: jongkoln@buu.ac.th

บทนำ

พืชทุกชนิดสามารถสร้างอาหารได้โดยกระบวนการสังเคราะห์แสง เนื่องจากมีรงควัตถุ (pigment) สีเขียว ที่เรียกว่า คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) เป็นองค์ประกอบ พืชทะเลก็เช่นเดียวกับพืชบกที่มีการสังเคราะห์แสงได้ทั้งพืชชั้นสูงและพืชชั้นต่ำ เช่น หญ้าทะเล และสาหร่ายทะเล หญ้าทะเลเป็นพืชชั้นสูง คือ มีใบ ลำต้น และราก มีอวัยวะทำหน้าที่ลำเลียงน้ำ สารอาหาร หญ้าทะเลจัดเป็นพืชทะเลที่แท้จริง คือมีวงจรชีวิตทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมดอยู่ใต้ทะเล (Castro & Huber, 1992) ส่วนสาหร่ายทะเลเป็นพืชชั้นต่ำ ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้น และใบที่แท้จริง (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527) จัดเป็นกลุ่มพืชที่มีความหลากหลาย มีขนาดตั้งแต่เล็กมากประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว ซึ่งมองไม่เห็นด้วยตาเปล่าต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไปจนถึงขนาดใหญ่ ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก มีสีแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับรงควัตถุที่เป็นองค์ประกอบ (Sze, 1986)

การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาโครงสร้างรงควัตถุ (ภาพที่ 1) ในพืชทะเล 2 ชนิด ที่เป็นพืชชั้นสูงและพืชชั้นต่ำ คือ หญ้าทะเล *Halodule pinifolia* และสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. สาหร่ายชนิดนี้เป็นสาหร่ายสีน้ำตาลที่มีรงควัตถุเป็นพวกแซนโทฟิลล์ (xanthophylls) ได้แก่ fucoxanthin และ neoxanthin เป็นต้น มากกว่าคลอโรฟิลล์ เอ และซี จึงทำให้เห็นเป็นสีน้ำตาล หรือน้ำตาลอมเขียว (Dawes, 1974) โดยนำมาสกัดและแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี และพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้ 1D NMR (^{1}H, ^{13}C NMR, DEPT 90 และ DEPT 135) และ 2D NMR (HMQC, HMBC และ COSY) รวมทั้งศึกษาติดตามการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของรงควัตถุที่แยกได้ เนื่องจากสารสกัดอย่างหยาบของหญ้าทะเล *H. pinifolia* แสดงฤทธิ์ยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมที่ปาก (*Herpes simplex* virus type 1, HSV-1) และวัณโรค (tuberculosis, TB) ส่วนสารสกัดอย่างหยาบของสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. แสดงฤทธิ์ยับยั้งไวรัสก่อโรคเริมที่ปาก วัณโรค เซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดคือปาก เต้านม ปอด (KB, BC, NCI-H187) และเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) ได้ดี



ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของรงควัตถุ (1-3) ที่แยกได้

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

หญ้าทะเล *H. pinifolia* เก็บที่อ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี และสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp. เก็บที่หาดวอนนภา ต.แสนสุข จังหวัดชลบุรี โดยแช่แข็งโรยเกลือตั้งแต่นำขึ้นมาจากทะเลและระหว่างการขนส่ง แล้วเก็บในตู้แช่แข็งของห้องปฏิบัติการเคมี เพื่อรอทำการสกัด

การสกัดและการแยก

13^2 -hydroxypheophytin a (**1**) และ13^2 -hydroxypheophytin b (**2**) แยกได้จากหญ้าทะเล โดยใช้หญ้าทะเลสดน้ำหนักเปียก 2036 กรัม สกัดด้วยเมทธานอล (MeOH) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการแยกชั้น (partition) ต่อด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) และเอทธิลอะซีเตด (EtOAc) อัตราส่วน 1:1 ได้สารสกัดอย่างหยาบ 10.1789 กรัม นำสารสกัดที่ได้มาแยกด้วย flash column chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเริ่มจาก 100% hexane แล้วค่อย ๆ เพิ่มความมีขั้ว (gradient system) ของ EtOAcใน hexane จนถึง 100% EtOAc และ 100% MeOH ได้ทั้งหมด 8 fraction นำ fraction ที่ 5 (0.8655 กรัม) ที่ชะออกมากับ 50% EtOAc ใน hexane แยกต่อด้วย Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) ระบบตัวทำละลาย 5% EtOAcใน CH_2Cl_2 ได้ทั้งหมด 8 ส่วนย่อย(fraction) นำ fraction ที่ 5.2 (0.0246 กรัม มีสีเขียวคล้ำ) มาแยกต่อด้วย PTLC (100% CH_2Cl_2) ได้สารบริสุทธิ์ 13^2 -hydroxypheophytin b (0.0080 กรัม) จากนั้นนำ fraction ที่ 4 (0.8374 กรัม) ที่ชะออกมากับ 30% EtOAc ใน hexane แยกต่อด้วย PTLC 5 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ระบบตัวทำละลาย 15% EtOAc ใน hexane, 4% EtOAc ใน CH_2Cl_2, 100% CH_2Cl_2, 2% และ 3% EtOAc ใน CH_2Cl_2 ตามลำดับ ให้สารบริสุทธิ์ 13^2-hydroxypheophytin a (0.0549 กรัม)

fucoxanthin (**3**) แยกได้จาก *Dictyota* sp. สกัดสดด้วย MeOH ที่อุณหภูมิห้อง และทำการแยกชั้น (partition) ต่อด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) และเอทธิลอะซีเตด (EtOAc) อัตราส่วน 1:1 ได้สารสกัดอย่างหยาบ 14.0478 กรัม นำสารสกัดที่ได้มาแยกด้วย flash column chromatography ระบบตัวทำละลายที่ใช้ hexane, CH_2Cl_2, EtOAc และ MeOH ได้ทั้งหมด 4 ส่วนย่อย นำ fraction 3 (สีส้ม 3.7716 กรัม) ที่ชะออกมากับ EtOAc แยกต่อด้วย flash column chromatography ระบบตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane, CH_2Cl_2 , 50 % EtOAc ใน CH_2Cl_2, EtOAc และ MeOH โดยแยกตามแถบสี ได้ทั้งหมด 4 ส่วนย่อย นำ fraction ที่ 3.2 (สีส้มแดง 1.3147 กรัม) มาแยกต่อด้วย PTLC ใช้ระบบตัวทำละลายเป็น CH_2Cl_2 ได้ 3 ส่วนย่อย นำ fraction ที่ 3.2.2 (สีส้มแดง 0.5548 กรัม) มาแยกต่อด้วย PTLC ระบบตัวทำละลายเป็น 40 % EtOAc ใน hexane แยกได้ทั้งหมด 6 ส่วนย่อย นำ fraction ที่ 3.2.2.5 มีสีส้มแดง 0.2051 กรัม มาแยกด้วย PTLC (gradient system) 5 ครั้ง ด้วยระบบตัวทำละลาย 50 % EtOAc ใน hexane, 5:3:2 CH_2Cl_2 ใน EtOAc ใน hexane, 25 %, 30 % EtOAc ใน CH_2Cl_2 และ 50 % EtOAc ใน hexane ได้สารบริสุทธิ์ fucoxanthin มีสีแดง 0.0145 กรัม

เทคนิคที่ใช้พิสูจน์เอกลักษณ์

เทคนิค 1D NMR (^1H, ^{13}C NMR, DEPT 90 และ DEPT 135) และ 2D NMR (COSY, HMQC และ HMBC) บันทึกด้วย NMR สเปกโทรมิเตอร์ของบริษัท Bruker รุ่น AVANCE 400 Ultrashield และใช้ตัวทำละลาย chloroform-D 99.9 %) เทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี HR APCIMS และ HR ESIMS บันทึกด้วย แมสสเปกโทรมิเตอร์ MicroTOF ของบริษัท Bruker

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดอย่างหยาบและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเล โดยส่งไปทดสอบที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (BIOTEC)

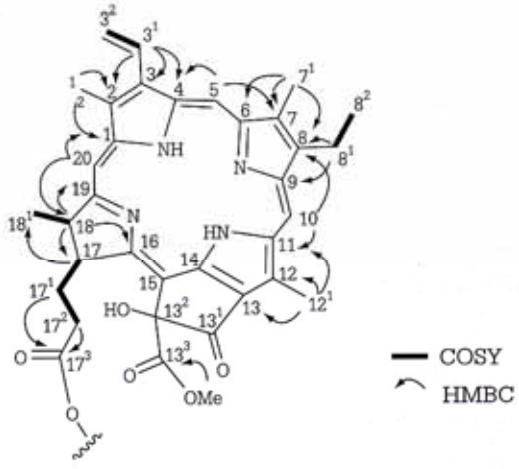
Anti-tuberculosis ทดสอบโดยวิธี Microplate Alamar Blue Assay (MABA) ต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37R โดยเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน rifampicin, kanamycin และ isoniazid

Anti-malarial ทดสอบโดยวิธี microculture radioisotope technique ต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* โดยเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน dihydroartemisinin

Anti-*Herpes simplex* virus type 1 ทดสอบโดยวิธี colourimetric microtitre plate assay โดยเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน acyclovir และ ตัวทำละลายมาตรฐาน DMSO

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

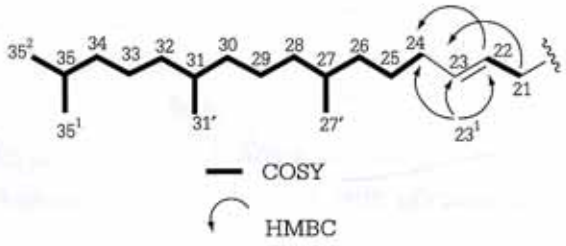
13^2-hydroxypheophytin a (**1**) ได้จากการวิเคราะห์โดย HRESIMS ให้ *m/z* 887.5666 $[M+H]^+$ (calcd $C_{55}H_{75}N_4O_6$; 887.5681) ได้สูตรโมเลกุล $C_{55}H_{74}N_4O_6$ ^{13}C NMR แสดงจำนวนสัญญาณทั้งหมด 55 สัญญาณ จากเทคนิค DEPT 90 และ DEPT 135 ทราบชนิดคาร์บอน คือ methyl carbon 11 สัญญาณ methylene carbon 14 สัญญาณ methine carbon 10 สัญญาณ และ quaternary carbon 20 สัญญาณ นอกจากนี้สเปกตรัม ^{13}C NMR ยังแสดงสัญญาณของ sp^2 carbon 25 สัญญาณ (3 สัญญาณ จากสัญญาณ sp^2 carbon เป็น carbonyl) จากนั้นหาความสัมพันธ์โดยเทคนิค HMQC ทำให้ทราบตำแหน่งโปรตอนของคาร์บอนแต่ละสัญญาณ ^1H-NMR แสดงสัญญาณของกลุ่ม olefinic methyl 4 สัญญาณ (หนึ่งในสัญญาณนี้เป็น methyl ในส่วนของ phytyl) ที่ δ 3.4 (H-2^1), 3.12 (H-7^1), 2.05 (H-12^1) และ 1.70 (H-23^1) สัญญาณของ vinyl group ที่ δ 7.85 q (H-3^1), 6.23 d และ 6.14 d (H-3^2) สัญญาณของ olefinic 4 สัญญาณ ที่ δ 9.20 (H-5), 9.43 (H-10), 8.68 (H-20) และ 5.32 (H-22) สัญญาณของ methoxy 1 สัญญาณที่ δ 3.70 (-OMe ที่ต่อกับ C-13^3) จากเทคนิค ^1H-^1H COSY และ HMBC และการเปรียบเทียบค่า chemical shift ที่มีรายงาน (Nakatani et al., 1981) ทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของโครงสร้างได้สำเร็จ โดยแบ่งพิจารณาเป็นโครงสร้างย่อย 2 ส่วน คือ โครงสร้างย่อย a (porphyrin) และโครงสร้างย่อย b (phytyl)



ภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์โดย ^1H-^1H COSY และ HMBC ของโครงสร้างย่อย a (porphyrin) ของสาร **1**

โครงสร้าง a จากการวิเคราะห์โดย เทคนิค COSY ได้ความสัมพันธ์ 4 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง C-3^1 ต่อกับ C-3^2 (ส่วนของ vinyl) ส่วนที่สอง C-8^1 ต่อกับ C-8^2 ส่วนที่สาม C-17^1 ต่อกับ C-17 และ C-17^2 ส่วนที่สี่ C-18 ต่อกับ C-18^1 จากนั้นใช้ข้อมูลจาก HMBC เพื่อหาความสัมพันธ์จนได้โครงสร้างออกมา แต่จะมีบางส่วนของโครงสร้างที่เป็น carbon แบบ quaternary ที่ไม่แสดงความสัมพันธ์โดยเทคนิค HMBC เช่น ที่ carbon ตำแหน่ง C-13^1, C-13^2, C-13^3, C-14 และ C-15 เมื่อเปรียบเทียบค่า chemical shift กับโครงสร้างที่มีรายงาน (Duan *et al.*, 2002) จึงได้โครงสร้างย่อย a ดังภาพที่ 2

โครงสร้างย่อย b จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค COSY และการจัดตำแหน่งโดยเปรียบเทียบ chemical shift จาก CS ChemDraw Ultra ได้ความสัมพันธ์ 2 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง C- 21 ต่อกับ C-22 และส่วนที่สอง C-24 ต่อกันเป็นโซ่ยาวจนถึง C-35^2 และมีหมู่ methyl 3 หมู่ ต่ออยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 27, 31 และ 35 จากนั้นใช้เทคนิค HMBC เชื่อมต่อส่วนที่หนึ่งและส่วนที่สอง โดยผ่าน sp^2 quaternary C-23 ที่มีหมู่ methyl (CH_3-23^1) มาต่ออยู่ จากความสัมพันธ์พบว่า H-23^1 แสดงความสัมพันธ์กับ C-23, C-22 และ C-24 นอกจากนี้ H-21 และ H-22 แสดงความสัมพันธ์กับ C-23 และ C-24 ตามลำดับจึงได้โครงสร้างย่อย b ดังภาพที่ 3



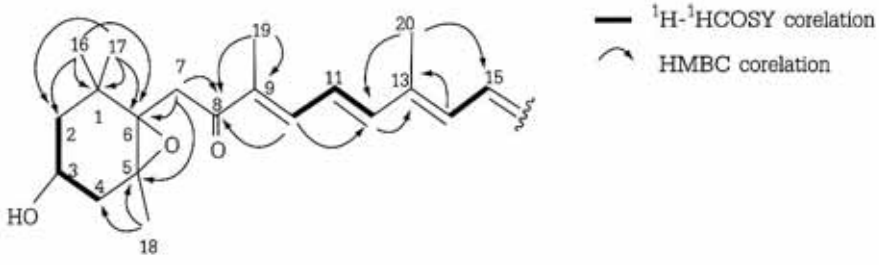
ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์โดย ^1H-^1H COSY และ HMBC ของโครงสร้างย่อย b (phytyl) ของสาร **1**

จากนั้นเชื่อมต่อโครงสร้าง a และ b โดยพิจารณาค่า chemical shift ที่ δ 61.7, 4.67 ppm (CH_2-21) ซึ่งเป็น sp^3 carbon ที่มีค่า chemical shift ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ข้อมูลจาก HMBC พบว่า H-21 แสดงความสัมพันธ์กับ C-17^3 ที่เป็น carbonyl group ของโครงสร้าง a จากค่า chemical shift และความสัมพันธ์ HMBC แสดงว่า C-21 เชื่อมต่อกับโครงสร้าง a โดยผ่าน oxygen ของ ester จากความสัมพันธ์ดังกล่าวจึงได้โครงสร้างของ 13^2-hydroxypheophytin a (**1**)

สำหรับ 13^2-hydroxypheophytin b (**2**) พบว่าจากการวิเคราะห์ ^{13}C NMR แสดงจำนวนสัญญาณทั้งหมด 55 สัญญาณ จากเทคนิค DEPT 90 และ DEPT 135 แสดง methyl carbon 10 สัญญาณ methylene carbon 14 สัญญาณ methine carbon 11 สัญญาณ และ quaternary carbon 20 สัญญาณ นอกจากนี้ ^{13}C NMR ยังแสดงสัญญาณของ sp^2 carbon 26 สัญญาณ (4 สัญญาณจาก sp^2 carbon เป็น carbonyl) จากนั้นหาความสัมพันธ์โดยเทคนิค HMQC ทำให้ทราบตำแหน่งโปรตอนของคาร์บอนแต่ละสัญญาณ ^1H-NMR แสดงลักษณะสำคัญที่แตกต่างจากโครงสร้าง 13^2-hydroxy-pheophytin a คือ มีสัญญาณของ aldehyde ที่ δ 11.10 ppm ($H\text{-}7^1$) จากเทคนิค ^1H-^1H COSY, HMBC และการเปรียบเทียบค่า chemical shift ที่มีรายงาน (Nakatani et al., 1981) กับ 13^2-hydroxypheophytin a ที่แยกได้พบว่าแตกต่างกันที่ C-7 คือ มีหมู่ aldehyde ต่ออยู่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงได้โครงสร้าง **2**

fucoxanthin (**3**) แยกได้จากสาหร่ายทะเล *Dictyota* sp.จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค HRAPCI ให้ *m/z* 659.4289 $[M+H]^+$ (calcd $C_{42}H_{59}O_6$; 659.4306) ได้สูตรโมเลกุลเป็น $C_{42}H_{58}O_6$ ซึ่งมีค่าความไม่อิ่มตัวเท่ากับ 14 สเปกตรัม ^{13}C NMR แสดงจำนวนสัญญาณทั้งหมด 42 สัญญาณ เป็น methyl carbons 11 สัญญาณ methylene carbon 5 สัญญาณ methine carbon 13 สัญญาณ และ quaternary carbon 13 สัญญาณ (multiplicity ได้จากเทคนิค DEPT 90 และ DEPT 135) นอกจากนี้ ^{13}C NMR ยังแสดงสัญญาณของ olefinic carbon 16 สัญญาณ (2 สัญญาณเป็น carbonyl) และมีสัญญาณในส่วนที่เป็นกลุ่ม allenic ที่ 117.4 (C-6′), 202.4 (C-7′), 103.3 (C-8′) จากค่าความไม่อิ่มตัวและจำนวนพันธะคู่ 11 พันธะ แสดงว่าโครงสร้างของสารนี้เป็น tricyclic carotenoid ข้อมูลจากสเปกตรัม HMQC ทำให้ทราบตำแหน่งสัญญาณโปรตอนของคาร์บอนแต่สัญญาณ ^1H NMR แสดงสัญญาณของ methyl proton 11 สัญญาณ olefinic proton 11 สัญญาณ methylene proton 6 สัญญาณ methine proton 13 สัญญาณ เมื่อพิจารณาค่า chemical shift ที่ 68.2, 5.35 (CH-3′) มีค่า chemical shift สูง เนื่องจากมีหมู่อะซีเตด (OAc) ต่ออยู่ ที่ δ 64.2, 3.78 (CH-3) และที่ δ 72.6 (C-5′) มีหมู่ hydroxy มาต่ออยู่ที่ δ 66.3 (C-5) และ 67.2 (C-6) ต่อกับ ether ที่เป็นวง epoxy จากนั้นใช้ข้อมูลจาก ^1H-^1H COSY และ HMBC หาความสัมพันธ์ เนื่องจากโครงสร้างมีขนาดใหญ่แบ่งพิจารณาเป็นโครงสร้างย่อย c และ d ดังนี้

โครงสร้างย่อย c จากข้อมูล ^1H-^1H COSY ได้ความสัมพันธ์ 3 ส่วนคือ ส่วนที่หนึ่ง C-3 ต่อกับ C-2 และ C-4, ส่วนที่สอง C-11 ต่อกับ C-10 และ C-12 และส่วนที่สาม C-14 ต่อกับ C-15 และหาความสัมพันธ์ของโครงสร้างย่อย c ได้สำเร็จโดยเทคนิค HMBC ซึ่งพบว่า C-1 มีหมู่แทนที่สองหมู่เป็น methyl (CH_3-16 และ CH_3-17) และเชื่อมต่อ C-2 และ C-6 จากความสัมพันธ์คือ H-16 และ H-17 แสดงความสัมพันธ์กับ C-1, C-2 และ C-6 นอกจากนี้ยังพบว่า quaternary carbon (C-5) ที่เป็นสมาชิกหนึ่งในวง epoxy มีหมู่แทนที่เป็น methyl (CH_3-18) และเชื่อมต่อกับ C-4 จากความสัมพันธ์คือ H-18 แสดงความสัมพันธ์กับ C-4 และ C-5 ดังนั้นจึงได้โครงสร้างย่อย c เป็นวงหกเหลี่ยมต่อกับวง epoxy ที่ C-5 และ C-6 นอกจากนี้ CH_2-7 ยังแสดงความสัมพันธ์กับ C-5, C-6 และ C-8 ยืนยันได้ว่า C-7 เชื่อมต่อกับวงหกเหลี่ยมที่ตำแหน่ง C-6 และต่อกับ C-8 นอกจากนี้ยังพบว่า C-8 เชื่อมต่อกับส่วนที่สอง โดยผ่าน olefinic quaternary carbon (C-9) ที่มีหมู่แทนที่เป็น CH_3-19 (H-19 แสดงความสัมพันธ์กับ C-9) จากความสัมพันธ์ คือ H-19 และ H-10 แสดงความสัมพันธ์กับ C-8 และส่วนที่สองต่อกับส่วนที่สามโดยผ่าน olefinic quaternary carbon (C-13) ที่มีหมู่แทนที่เป็น CH_3-20 ต่ออยู่จากความสัมพันธ์คือ H-10 และ H-20 แสดงความสัมันธ์กับ C-12, H-12 และ H-14 แสดงความสัมพันธ์กับ C-13 และ H-20 แสดงความสัมพันธ์กับ C-15 จากความสัมพันธ์ดังกล่าวจึงได้โครงสร้างย่อย c ดังแสดงในภาพที่ 4

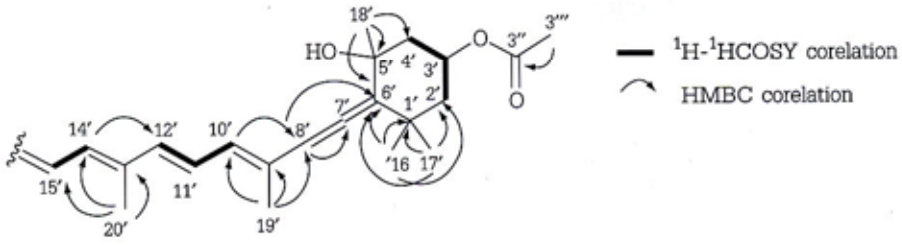


ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์โดย 1H-1H COSY และ HMBC โครงสร้างย่อย c ของ สาร **3**

โครงสร้างย่อย d จากข้อมูล ^{1}H-^{1}H COSY ได้ความสัมพันธ์ของโครงสร้าง 3 ส่วนคือ ส่วนที่หนึ่ง (C-15′ ต่อกับ C-14′) ส่วนที่สอง (C-11′ ต่อกับ C-12′ และ C-10′) และส่วนที่สาม (C-3′ ต่อกับ C-2′ และ C-4′) จากนั้นใช้เทคนิค HMBC หาความสัมพันธ์ของโครงสร้างย่อย d โดยพบว่าส่วนที่หนึ่งเชื่อมต่อกับส่วนที่สองโดยผ่าน olefinic quaternary carbon (C-13′) ที่มีหมู่แทนที่เป็น methyl (CH_3-20′) จากความสัมพันธ์คือ H-20′ แสดงความสัมพันธ์กับ C-13′, C-14′ และ C-15′ นอกจากนี้ยังพบว่า H-14′ แสดงความสัมพันธ์กับ C-12′ อีกด้วย ส่วนที่สองเชื่อมต่อกับส่วนที่เป็น allenic [(C-6′), (C-7′) และ (C-8′)] โดยผ่าน olefinic quaternary carbon (C-9′) ที่มีหมู่แทนที่เป็น methyl (CH_3-19′) จากความสัมพันธ์คือ H-19′ แสดงความสัมพันธ์กับ C-10′, C-9′ และ C-8′ และยังพบว่า H-10′(แสดงความสัมพันธ์กับ H-8′ ด้วย สเปกตรัมของ HMBC ยังแสดงความสัมพันธ์ในส่วนที่เป็น allenic คือ H-8′ แสดงความสัมพันธ์กับ C-7′ และ C-6′ นอกจากนี้ C-6 ยังเชื่อมต่อกับส่วนที่สามที่ตำแหน่ง C-2 โดยผ่าน sp^3 quarternary carbon (C-1′) ที่มีหมู่แทนที่สองหมู่เป็น CH_3-16′(และ CH_3-17′((จากความสัมพันธ์คือ H-16 และ H-17 แสดงความสัมพันธ์กับ C-1, C-6 และ C-2) และที่ตำแหน่ง C-4′ โดยผ่าน sp^3 quarternary carbon (C-5′) ที่มีหมู่แทนที่สองหมู่เป็น CH_3-18′ และ -OH (จากความสัมพันธ์คือ H-18′ แสดงความสัมพันธ์กับ C-5, C-4′ และ C-6′) เมื่อพิจารณาส่วนที่สาม ที่ตำแหน่ง C-3′ มีค่า chemical shift สูง แสดงว่าเชื่อมต่ออยู่กับหมู่ -OAc (HMBC แสดงความสัมพันธ์ในส่วนที่เป็นอะซีเตด คือ H-3‴ แสดงความสัมพันธ์กับ C-3″) จากความสัมพันธ์ดังกล่าวจึงได้โครงสร้างย่อย d ดังแสดงในภาพที่ 5

โครงสร้างย่อย c (ภาพที่ 3) และ d (ภาพที่ 4) เชื่อมต่อกันที่ C-15′ และ C-15 จากความสัมพันธ์ของ HMBC พบว่า C-15 แสดงความสัมพันธ์กับ H-15′ และเมื่อพิจารณาที่ C-14′ และ C-15′ พบว่า carbon ทั้งคู่แสดงความสัมพันธ์กับ H-14 จากความสัมพันธ์ดังกล่าว และการเปรียบเทียบค่า chemical shift ของ ^{1}H และ ^{13}C NMR กับโครงสร้างที่มีรายงาน (Mori *et al.*, 2004) จึงยืนยันได้ว่ารงควัตถุชนิดนี้เป็น fucoxanthin (**3**) แต่ยังไม่เคยมีรายงานด้วย 2D NMR โดยเฉพาะเทคนิค HMQC และ HMBC ของสารประกอบ (**1**-**3**) มาก่อน นี่เป็นครั้งแรกของการรายงานข้อมูลของสารทั้งสามชนิด ส่วน absolute stereochemistry ของสารทั้งสามที่แยกได้ไม่สามารถรายงานได้เนื่องจากผลจากการศึกษา NOESY และ NOE difference เพิ่มเติม ไม่สามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์มากพอที่จะสรุปได้ในขณะนี้ กล่าวคือการ irradiate โปรตอนของ OH-13^2 ไม่มีผลทำให้โปรตอนใกล้เคียงมีสัญญาณสูงขึ้น ดังนั้นหากเป็นไปได้ในอนาคต น่าจะมีการเตรียมอนุพันธ์โดย Mosher method ต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรงควัตถุ 13^2-hydroxypheophytin a และ 13^2-hydroxypheophytin b พบว่าสารทั้งสองชนิดไม่ใช่องค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อ HSV-1 และ TB ที่พบในสารสกัดอย่างหยาบของ *H. pinifolia* ส่วน fucoxanthin ที่แยกได้จาก *Dictyota* sp. พบว่าเป็นองค์ประกอบหนึ่งในสารสกัดอย่างหยาบที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* โดยสารบริสุทธิ์ชนิดนี้แสดงฤทธิ์ได้ดี ที่ระดับ IC_{50} 2.9 μg/mL และยับยั้งเชื้อไวรัสเริมที่ปาก ที่ระดับ IC_{50} 5.0 μg/mL



ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์โดย ^{1}H-^{1}H COSY และ HMBC โครงสร้างย่อย d ของสาร **3**

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษารงควัตถุบริสุทธิ์ที่แยกได้จากหญ้าทะเล *H. pinifolia* คือ 13^2-hydroxypheophytin a และ 13^2-hydroxypheophytin b พบว่ารงควัตถุทั้งสองชนิดนี้เป็น derivative ของ chlorophyll ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เคยมีรายงานแล้ว โดยพบในของเสียที่ตัวไหมขับถ่ายออกมา (Nakatani *et al.*, 1981) พบในพืชสมุนไพร *Sausurea medusa* (Duan *et al.*, 2002) และพบในต้น *Zanthoxylum schinifolium* (Cheng et al., 2002) นอกจากนี้เคยมีรายงานพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอก (Nakatani *et al.*, 1981) ส่วนรงควัตถุบริสุทธิ์ที่พบในสาหร่าย *Dictyota* sp. เป็น fucoxanthin ซึ่งสารชนิดนี้พบว่าเป็นองค์ประกอบหลักในสาหร่ายสีน้ำตาล และเคยมีรายงานแล้วในสาหร่ายสีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น *Scytosiphon lomentaria, Petalonia bighamiae, Laminaria religiosa, Undaria pinnatifida* (Mori *et al.*, 2004) และ *Dictyota dicotoma* (Mimuro *et al.*, 1990) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ารงควัตถุ fucoxanthin (**3**) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย และไวรัสเริมได้ดี ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน อีกทั้งยังไม่เคยมีรายงานการวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบ (**1-3**) ด้วย 2D NMR มาก่อน

13^2-Hydroxypheophytin a (1). ^{1}H-NMR: ($CDCl_3$, 400MHz): δ 3.40 (s, H-2^1), 7.89 (dd, *J*=11.5, 17.8 Hz, H-3^1), 6.23 (d, *J*=17.8 Hz, H^2-3^2), 6.14 (d, *J*=11.5 Hz, H^1-3^2), 9.20 (s, H-5), 3.02 (s, H-7^1), 3.45 (q, *J*=7.4 Hz, H-8^1), 1.61 (m, H-8^2), 9.43 (s, H-10), 3.76 (s, H-12^1), 5.65 (br s, C-13^2, -OH), 3.70 (s, C-13^3, -OMe) 4.26 (d, *J*=8.3 H-17), 2.41 (m, H-17^1) 2.68 (m, H^1-17^2), 3.01 (m, H^2-17^2), 4.59 (q, *J*=7.4, H-18), 1.68 (s, H-18^1), 8.68 (s, H-20), 4.67 (t, *J*=5.6 Hz, H-21), 5.32 (t, *J*=6.8 Hz, H-22), 1.70 (s, H-23^1), 1.99 (s, H-24), 1.17 (m, H-25), 1.14 (m, H-26), 1.39 (m, H-27) 0.89 (t, *J*=6.6, 6.3 Hz, H-27^1), 1.39 (m, H-28), 1.29 (m, H-29), 1.14 (m, H-30),1.39 (m, H-31), 0.89 (t, *J*= 6.6, 6.3 Hz, H-31^1), 1.14 (m, H-32), 1.29 (m, H-33), 1.17 (m, H-34) 1.55 (m, H-35), 0.92 (d, *J*=6.6 Hz, H-35^1), 0.92 (d, *J*=6.6 Hz, H-35^2) ^{13}C-NMR: ($CDCl_3$, 100MHz): δ(11.0 (C-7^1), 12.0 (C-2^1), 12.3 (C-12^1), 16.4 (C-23^1), 17.3 (C-8^2), 19.2 (C-8^1), 19.7 (C-31^1), 19.8 (C-27^1), 22.6 (C-18^1), 22.7 (C-35^1 และ C-35^2), 24.4 (C-33), 24.6 (C-29), 24.8 (C-25), 28.0 (C-35), 31.3 (C-17^2), 31.8 (C-17^1), 32.7 (C-31), 32.8 (C-27), 36.7 (C-28), 37.3 (C-30), 37.4 (C-32), 37.5 (C-26), 39.4 (C-34), 39.9 (C-24), 50.4 (C-18), 52.0 (C-17), 53.6 (Me, C-13^3 OMe), 61.7 (C-21), 89.1 (C-13^2), 93.1 (C-20), 97.8 (C-5), 104.1 (C10), 107.8 (C-15), 118.0 (C-22), 122.7 (C-3^2), 127.0 (C-12), 128.9 (C-3^1), 129.4 (C-13), 131.7 (C-2), 136.1 (C-3), 136.2 (C-4), 136.3 (C-7), 137.8 (C-11), 142.1(C-1), 142.8 (C-23), 144.9 (C-8), 149.9 (C-14), 150.6 (C-9), 154.9 (C-6), 162.6 (C-16), 172.5 (C-19), 172.9 (C=O,C-13^3), 173.7 (C=O, C-17^3), 192.1 (C-13^1).

13^1-Hydroxypheophytin b (2). ^{1}H-NMR: ($CDCl_3$, 400MHz): δ 3.32 (s, H-2^1), 7.92 (dd, *J*= 11.7, 17.8 Hz, H-3^1), 6.16 (d, *J*=11.4 Hz, H^1-3^3), 6.30 (d, *J*= 17.8 Hz, H^2-3^3), 10.33 (s, H-5), 11.1 (s, -CHO, H-7^1), 3.93 (q, H-8^1), 1.61 (m, H-8^2), 9.6 (s, H-10), 3.65 (s, H-12^1), 5.55 (br s, C-13^2,-OH), 3.57 (s, Me, C-13^3, OMe), 4.08 (d, *J*=8.9 Hz, H-17), 2.41 (m, H-17^1), 2.68 (m, H^1-17^2), 3.01 (m, H^2-17^2), 4.41 (d, *J*=7 Hz, H-18), 1.68 (s, H-18^1) , 8.54 (s, H-20). ^{13}C-NMR: ($CDCl_3$, 100MHz): δ 12.1 (C-2^1), 12.4 (C-12^1), 17.1 (C-8^2), 18.7 (C-7^1), 19.4 (C-8^1), 22.7 (C-18^1), 31.3 (C-17^2), 31.7 (C-17^1), 50.4 (C-18), 52.1 (C-17), 53.5 (Me, C-13^3, -OAc), 88.8 (C-13^2), 93.9 (C-20), 102.1 (C-5), 106.7 (C10), 107.5 (C-15), 123.7 (C-3^2), 127.8 (C-12), 128.6 (C-3^1), 132.1 (C-13), 132.7 (C-2), 133 (C-3), 136.9 (C-4), 137.8 (C-6), 137.9 (C-11), 142.7 (C-8), 142.9 (C-1), 150.8 (C-14), 150.9 (C-7), 159.3 (C-9), 165.3 (C-16), 173.5 (C=O, C-13^3), 174.3 (C=O, C-17^3), 174.5 (C-19), 192.0 (C-13^1).

Fucoxanthin (3). ^{1}H-NMR: ($CDCl_3$, 400MHz): δ 1.41 (m, H^1-2), 1.50 (m, H^2-2), 3.78 (m, H-3), 1.75 (m, H^1-4), 2.28 (m, H^2-4), 2.57 (d, *J*=18.3 Hz, H^1-7), 3.64 (d, *J*=18.3, H^2-7), 7.13 (d, *J*=10.5 Hz, H-10), 6.58 (d, *J*=25.0 Hz, H-11), 6.68 (d, *J*=8.1, Hz, H-12), 6.74 (d, *J*=13.3 Hz, H-14), 6.24 (d, *J*=11.3 Hz, H-15), 0.93 (s, H-16), 1.01 (s, H-17), 1.20

(s, H-18), 1.91 (s, H-19), 1.96 (s, H-20), 1.41 (m, H^1-2′), 1.50 (m, H^2-2′), 5.35 (m, H-3′), 2.02 (s, H-3‴), 1.96 (m, H^1-4′), 2.28 (m, H^2-4′), 6.03 (s, H-8′), 6.1 (d, J=11.1 Hz, H-10′), 6.60 (d, J=23.4 Hz, H-11′), 6.1 (d, J=11.1 Hz, H-12′), 6.33 (d, J=28.9 Hz, H-14′), 6.36 (d, J=25.4 Hz , H-15′), 1.36 (s, H-16′), 1.04 (s, H-17′), 1.33 (s, H-18′), 1.79 (s, H-19′), 1.96 (s, H-20′) ^{13}C-NMR: ($CDCl_3$, 100MHz): δ 11.8 (C-19), 12.7 (C-20), 12.9 (C-20′), 14.0 (C-19′), 21.1 (C-18), 21.4 (C-3‴), 25.0 (C-17), 28.1 (C-16), 29.2 (C-16′), 31.2 (C-18′), 32.1 (C-17′), 35.2 (C-1), 35.8 (C-1′), 40.8 (C-7), 41.6 (C-4), 45.3 (C-4′), 45.5 (C-2′), 47.1 (C-2), 64.2 (C-3), 66.3 (C-5), 67.2 (C-6), 68.2 (C-3′), 72.6 (C-5′), 103.3 (C-8′), 117.4 (C-6′), 123.3 (C-11), 125.7 (C-11′), 128.5 (C-10′), 129.4 (C-12′), 132.1 (C-15), 132.5 (C-14), 132.6 (C-9′), 134.5 (C-9), 135.4 (C-13′), 136.7 (C-15′), 137.1 (C-14′), 138.1 (C-13), 139.2 (C-10), 145.1 (C-12), 170.6 (C-3″), 197.9 (C-8), 202.4 (C-7′).

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยบัณฑิตศึกษาของภาควิชาเคมี และของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมทางเคมี: โครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษา และการวิจัยทางเคมี (PERCH-CIC) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบพระคุณคุณนิติรัตน์ ฉิมน้อย สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่กรุณาช่วยวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี และคุณธิดารัตน์ น้อยรักษา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาที่กรุณาช่วยตรวจสอบชื่อทางวิทยาศาสตร์ของตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์ 2527 สาหร่าย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

Castro, P. and Huper, M.E. 1992. Marine Biology. Wm. C. Brown Publishers, Iowa.

Cheng, M.J., Yang, C.H., Lin, W.Y., Lin, W.Y., Tsai, I.L. and Chen, I.S. 2002. Chemical constituents from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium*. Journal of the Chinese Chemical Society 49: 125-128.

Dawes, C.J. 1974. Marine algae of the west coast of Florida. University of Miami Press, Coral Gables, Florida.

Duan, H., Takaishi, Y., Momota, H., Ohmoto, Y. and Taki, T. 2002. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. Phytochemistry 59: 85-90.

Mimoru, M., Katoh,T. and Kawai, H. 1990. Spatial arrangements and their interaction in the fucoxanthin-chlorophyll a/c protein assembly (FCPA) isolated from the brown alga *Dictyota dichotoma*. Analysis by means of polarized spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta 1015: 450-456.

Mori, K., Ooi, T., Hiraoja, M., Oka, N., Hamada, H., Tamura, M. and Kusumi, T. 2004. Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in deep seawater. Marine Drugs 2: 63-72.

Nakatani, Y., Ourisson, G. and Beck, J.P. 1981. Chemistry and biochemistry of Chinese drugs. VII. Cytostatic pheophytins from silkworm excreta and derived photocytotoxic pheophorbides. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 29: 2261-2262.

Sze, P. 1986. A biology of the algae. Wm. C. Brown Publishers, Iowa.