



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดและทำบริสุทธิ์สารประกอบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายใน  
ของปลิงทะเลลูกบอลที่เหลือทิ้งเพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Extraction and purification of sulfated polysaccharide from  
viscera waste of *Phyllophorella kohkutiensis* for bioactive  
compound development

อาจารย์ ดร. พรพรรณ อร่ามแสงเทียนชัย

ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

โครงการวิจัยประเภทเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๓

มหาวิทยาลัยบูรพา

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดและทำบริสุทธิ์สารประกอบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายใน  
ของปลิงทะเลลูกบอลที่เหลือทิ้งเพื่อใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ  
Extraction and purification of sulfated polysaccharide from  
viscera waste of *Phyllophorella kohkutiensis* for bioactive  
compound development

อาจารย์ ดร. พรพรรณ อร่ามแสงเทียนชัย

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

ดร. จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล

มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทประเภทเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ ๒๕๖๓ เลขที่สัญญา SCom/๒๕๖๓

## บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายในที่เหลือทิ้งของปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis*) ที่ได้จากจังหวัดสุราษฎร์ธานีและสตูล เพื่อนำมาศึกษาถึงโครงสร้างและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ ตลอดจนฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ จากการสกัดสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ได้ %Yield เท่ากับ 0.36% โดยคำนวณจากน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบที่ได้เทียบกับน้ำหนักเปียกของอวัยวะภายในตั้งต้นที่ใช้ และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม กรดยูโรนิก และซัลเฟต คิดเป็น 33.24% 8.70% และ 25.55% ตามลำดับ จากการศึกษาโครงสร้างของสารสกัดหยาบที่ได้ด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าสารสกัดที่ได้จัดเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ จากนั้นได้นำสารสกัดหยาบไปทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-Sepharose แล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยการตัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก ตามด้วยเทคนิค HPLC ผลที่ได้พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส กลูโคซามีน กรดกลูคูโรนิก กรดกาแลกทูโรนิก กลูโคซามีน และ/หรือเอ็น-อะซิทิล กลูโคซามีน ไฮโลส และฟูโคส นอกจากนี้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้สามารถยับยั้งการทำงานของ Angiotensin-converting enzyme ได้

## Abstract

In this research, polysaccharide compounds were extracted from the viscera of sea cucumber, *Phyllophorella kohkutiensis*, collected from Surat Thani and Satun provinces, Thailand. The extract was characterized for its structure and monosaccharide composition. From the result, %yield of the crude polysaccharide extract was 0.36% (w/w), calculated from dry weight of the extract per wet weight of used viscera. Moreover, the amount of total carbohydrate, uronic acids and sulfate in the extract was found 33.24%, 8.70% and 25.55%, respectively. The structure of crude polysaccharide extract was further characterized by FT-IR technique. The result suggested that the extract is sulfated polysaccharide. After that the crude extract was purified using DEAE-ion exchange column chromatography. The eluted polysaccharides was pooled, dialyzed, and further analyzed for monosaccharide composition using trifluoroacetic acid hydrolysis and HPLC techniques, respectively. The purified polysaccharide extract was composed of different monosaccharides such as mannose, glucosamine hydrochloride, glucuronic acid, galacturonic acid, galactosamine hydrochloride and/or N-acetyl-D-glucosamine, xylose and fucose. Moreover, the polysaccharide extract showed the inhibitory effect against angiotensin converting enzyme (ACE) activity.

# สารบัญเรื่อง

หน้า

ปกใน	
กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อไทย	
บทคัดย่ออังกฤษ	
สารบัญภาพ	
สารบัญตาราง	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง	2
วิธีดำเนินการวิจัย	3
วิธีการประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล	4
ผลการทดลอง	6
อภิปรายผลการทดลอง	12
สรุปผลการทดลอง	13
ข้อเสนอแนะ	13
ผลผลิต	14
เอกสารอ้างอิง	14
ประวัตินักวิจัยและคณะโดยย่อ	15

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. % yield สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายในปลิงทะเล	7
2. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม กรดยูโรนิกและซัลเฟตของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์	8

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ปลิงทะเลลูกบอลที่นำมาใช้เป็นแหล่งของอวัยวะภายใน	6
2. อวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอลที่ใช้ในการทดลอง	6
3. อวัยวะภายใน (ลำไส้และกล้ามเนื้อ) หลังจากปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน	6
4. สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายในของปลิงทะเล	7
5. โครมาโตแกรมแสดงการทำบริสุทธิ์ซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sepharose	9
6. FT-IR spectrum ของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่สกัดได้จากอวัยวะภายในปลิงทะเล	10
7. เพอร์เซ็นต์การยับยั้ง ACE ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์	11



## ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลิงทะเล (sea cucumber) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง อาศัยอยู่ตามพื้นท้องทะเล รูปร่างเป็นกระบอกหรือกลมยาว สามารถพบได้ที่บริเวณฝั่งทะเลอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ในประเทศไทยมีการทำประมงปลิงทะเลเพื่อการบริโภคและส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยปลิงทะเลตากแห้งจะสามารถพบปริมาณโปรตีนได้มากถึง 83% จึงนิยมนำปลิงทะเลอบแห้งไปจำหน่ายในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแบบเม็ดหรือแคปซูล (nutraceuticals) (Chen, 2013) ในลำตัวของปลิงทะเล (body wall) มีสารมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ และคอนดรอยตินซัลเฟต ซึ่งทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อน เอ็น และของเหลวหล่อลื่นในข้อต่อของมนุษย์ (Vieira et al., 1991) ซึ่งมีรายงานว่า การรับประทานสารในกลุ่มดังกล่าวจะช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวดจากโรคข้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอักเสบได้ (Bordbar et al., 2011) ปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis*) (Heding & Panning, 1954) มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย พบครั้งแรกบริเวณเกาะกูด จังหวัดตราด ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากปลิงทะเลชนิดนี้ โดยเฉพาะในพื้นที่ 3 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่ สุราษฎร์ธานี สตูล และตราด ในการทำประมงปลิงทะเลลูกบอลจะมีการนำอวัยวะภายในออกแล้วนำมาต้มและตากแห้ง เพื่อใช้สำหรับบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศเพื่อใช้ทำยา ตลอดจนเพื่อใช้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต 6 สงขลา) อย่างไรก็ตาม อวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล (viscera) จะถูกทิ้งเป็นของเสียหลังจากการแปรรูป ปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากอวัยวะภายในของปลิงทะเลยังมีอยู่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสัตว์ทะเลชนิดอื่นๆ ทั้งนี้ อวัยวะภายในของปลิงทะเลประกอบไปด้วยส่วนของกล้ามเนื้อ ระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ สามารถพบสารชีวโมเลกุลในกลุ่มโปรตีน กรดอะมิโน พอลิแซ็กคาไรด์ กรดไขมัน ซาโปนินและอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกับองค์ประกอบที่พบบริเวณลำตัวของปลิงทะเล (Zhang & Chang, 2014) ในปี ค.ศ. 2019 งานวิจัยโดย Yang และคณะ ได้รายงานถึงสารประกอบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากอวัยวะภายในของปลิงทะเล (ไม่ได้มีการระบุสายพันธุ์) จากมณฑลฝูเจี้ยน ประเทศจีน และพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ทั้งนี้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารประกอบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งรวมถึงฟูคอยแดน และคอนดรอยตินซัลเฟต มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายประการ เช่น ช่วยลดการอักเสบ ช่วยสมานแผล ด้านการแข็งตัวของเลือด ด้านไวรัส ตลอดจนช่วยลดระดับไขมันในเลือด อย่างไรก็ตาม จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ายังไม่เคยมีการศึกษาถึงสารสกัดในกลุ่มซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล หรือปลิงที่อยู่ในสกุล *Phyllophorella* นี้มาก่อน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการสกัดสารประกอบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล และนำไปประเมินถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะฤทธิ์ในการต้าน Angiotensin-converting enzyme (ACE) ACE เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความดันเลือด โดย ACE เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะไดเปปไทด์ (His-Leu) ที่ตำแหน่งปลายหมู่ Carboxyl ของฮอร์โมน Angiotensin I ทำให้ได้ฮอร์โมน

Angiotensin II ซึ่ง Angiotensin II ที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นให้เส้นเลือดเกิดการหดตัว ทำให้ความดันเลือดสูงขึ้น การหาสารที่ยับยั้ง ACE จึงเป็นอีกแนวทางในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลของปริมาณสารซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอยู่ในอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล และแนวโน้มในการนำอวัยวะภายในปลิงทะเลที่เหลือทิ้งจากการแปรรูปไปใช้เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีมูลค่าต่อไป

### **วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

1. เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล
3. เพื่อพัฒนาแนวทางในการนำของที่เหลือทิ้งจากการแปรรูปปลิงทะเลไปเปลี่ยนเป็นสารชีวภาพที่มีมูลค่าเพิ่ม

### **ขอบเขตของงานวิจัย**

1. การรวบรวมอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอลที่เหลือทิ้ง
2. การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่ได้จากอวัยวะภายในของปลิงทะเล
3. การทำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์
4. การยืนยันโครงสร้างของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ด้วยเทคนิค FT-IR
5. การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม ปริมาณกรดยูโรนิกและซัลเฟต ตลอดจนโมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์
6. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น การยับยั้งแอกทิวิตีของ Angiotensin-converting enzyme (ACE)

### **ประโยชน์ที่ได้รับงานวิจัย**

1. องค์ความรู้เกี่ยวกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม ปริมาณกรดยูโรนิกและซัลเฟต ตลอดจนชนิดของโมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล
2. แนวทางการใช้ประโยชน์จากฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์จากปลิงทะเลลูกบอล

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การรวบรวมอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล

ทำการเก็บรวบรวมอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอลที่เหลือจากโครงการวิจัย “ลักษณะทางพันธุกรรม ชีววิทยาพื้นฐาน และนิเวศวิทยาของปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis*) ในน่านน้ำไทย” (หัวหน้าโครงการ ดร. วรณภา กสิณฤกษ์ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล) ทั้งนี้ แหล่งของปลิงทะเลลูกบอลที่ใช้ในโครงการวิจัยดังกล่าว จะเก็บมาจากสองแหล่งหลักๆ คือ บริเวณเกาะสาหร่ายจังหวัดสตูล และ/หรือ อำเภอท่าฉาง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตัวอย่างที่รวบรวมได้จะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งพร้อมทำการทดลอง

### 2. การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่ได้จากอวัยวะภายในของปลิงทะเล

นำอวัยวะภายในของปลิงทะเลมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด ชั่งน้ำหนัก แล้วบั่นให้ละเอียด จากนั้นละลายตัวอย่างในสารละลายปาเปนในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์, pH 6.0 แล้วนำสารละลายตัวอย่างไปทำการตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ แล้วนำไปทำไดอะไลซิส ตามด้วยทำให้แห้งโดยเทคนิคฟรีซดราย

### 3. การทำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์

นำพอลิแซ็กคาไรด์หยาบไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose ที่อัตราการไหล 1 มล./นาที ด้วย 0–1.0 M NaCl ตามลำดับ นำแฟรกชันที่ได้ไปตรวจหาซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์โดยการทดสอบกรดฟีนอล-ซัลฟูริก จากนั้นรวมแฟรกชันที่มีปริมาณน้ำตาลรวมสูงสุดแล้วนำไปทำไดอะไลซิส และทำให้แห้งโดยเทคนิคฟรีซดราย แล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้างต่อไป

### 4. การยืนยันโครงสร้างของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ด้วยเทคนิค FT-IR

นำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทำให้แห้งมาวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิค FT-IR โดยอาศัย ATR-FTIR spectrometer (PerkinElmer-Frontier) ทำการวิเคราะห์ FT-IR spectra ในช่วง 4,000–400 cm<sup>-1</sup>

### 5. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม ปริมาณกรดยูโรนิกและซัลเฟต ตลอดจนโมโนแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

นำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดยูโรนิกโดยใช้วิธี hydroxydiphenyl และหาปริมาณซัลเฟตโดยใช้วิธี BaCl<sub>2</sub>-gelatin หลังจากการไฮโดรไลซิสของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 0.5 M HCl (Dodgson & Price, 1962)

ในการวิเคราะห์หาโมโนแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ทำได้โดยนำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณ 0.5 mg ไปไฮโดรไลซ์ด้วย 2 M Trifluoroacetic acid (TFA) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นระเหยกรดออกพร้อมกับเมทานอลจำนวน 3-4 ครั้ง เติมน้ำกลั่นลงในสารตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติม 100 ไมโครลิตร ของสารละลาย 0.5 M 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) และ 100 ไมโครลิตร ของสารละลาย 0.3 M NaOH บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 0.3 M HCl แล้วกำจัด PMP ออกโดยการสกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 มิลลิตร จำนวน 3 ครั้ง ปิดสารละลายชั้นบนไปทำการวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC (C18 column, 4.6 × 250 มม., 5 ไมครอน) UV detector ที่ 252 nm อาศัยเฟสเคลื่อนที่ A และ B ในอัตราส่วน 76:24 ที่ประกอบไปด้วย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.7) และ acetonitrile ตามลำดับ ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 mL/นาทีและ ปริมาตรในการฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

## 6. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้ง Angiotensin-converting enzyme (ACE)

ในการทดลองจะติดตามความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE โดยการนำสารตัวอย่าง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปผสมกับสารละลายเอนไซม์ ACE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเริ่มปฏิกิริยา ด้วยการเติมสารตั้งต้นของ ACE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และบ่มรีแอคชันที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เอนไซม์ ACE จะมีความสามารถในการไฮโดรไลซ์สารตั้งต้น แล้วเกิดการปลดปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาในระบบ เราจึงสามารถติดตามการทำงานของเอนไซม์โดยการวัดค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นของการกระตุ้น (excitation) และการปล่อยพลังงานแสง (emission) ที่ 320 และ 405 nm ตามลำดับ โดยวัดทุกๆ 1 นาที เป็นระยะเวลา 5 นาที ความสามารถในการยับยั้ง ACE คำนวณได้จากค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเรืองแสงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารตัวอย่างผสมอยู่

## 7. วิธีการประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล

1. การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่ได้จากอวัยวะภายในของปลิงทะเล

ประเมินปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่เกิดขึ้นเทียบกับน้ำหนักเปียกของอวัยวะภายในของปลิงทะเลที่ใช้ คำนวณออกมาคิดเป็นค่าร้อยละของพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่สกัดได้จริง

2. การทำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์

ประเมินจากผลวิเคราะห์โครงสร้างของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค FT-IR และปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม ปริมาณกรดยูโรนิกและซัลเฟตที่เกิดขึ้น และปริมาณโปรตีนที่เหลือในสารตัวอย่าง

3. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้ง Angiotensin-converting enzyme (ACE)

ประเมินจากค่า  $IC_{50}$  ของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีต่อการยับยั้ง ACE ที่ได้

## ผลการทดลอง

### 1. การเตรียมอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล

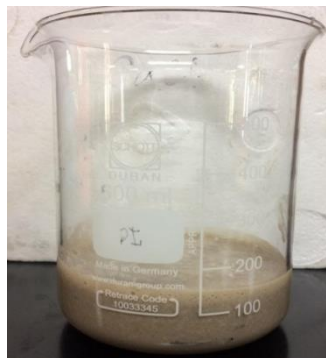
นำอวัยวะภายในจากปลิงทะเลลูกบอลที่มาจากสองแหล่งหลักๆ คือ บริเวณเกาะสาหร่าย จังหวัดสตูล และ/หรือ อำเภอท่าฉาง จังหวัดสุราษฎร์ธานี (ภาพที่ 1 และ ภาพที่ 2) มาล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดดินโคลนจนสะอาด จากนั้นนำอวัยวะภายในซึ่งจะประกอบไปด้วยส่วนของกล้ามเนื้อและลำไส้เป็นหลัก ไปปั่นให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 1 ปลิงทะเลลูกบอลที่นำมาใช้เป็นแหล่งของอวัยวะภายใน



ภาพที่ 2 อวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอลที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 3 อวัยวะภายใน (ลำไส้และกล้ามเนื้อ) หลังจากปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

## 2. การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่ได้จากอวัยวะภายในของปลิงทะเล

นำอวัยวะภายในของปลิงทะเลไปบดกับสารละลายปาเปนเพื่อกำจัดโปรตีน ตามด้วยการตกตะกอนด้วย 5% cetylpyridinium chloride ทั้งนี้ ในงานวิจัยได้ทดลองวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน คือ

- (1) การใช้ความเร็วสูง (6,000 RPM) ในการปั่นเก็บสารละลายส่วนใส
- (2) การใช้ความเร็วปานกลาง (3,000 RPM) ในการปั่นเก็บสารละลายส่วนใส

จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำไดอะไลซิส และทำให้แห้งโดยเทคนิคฟรีซดราย จะได้สารละลายของตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายในของปลิงทะเล

ตารางที่ 1 % yield ที่ได้จากการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายใน

วิธีที่ใช้	% yield
การใช้ความเร็วสูงในการปั่นเก็บส่วนใส	0.40%
การใช้ความเร็วปานกลางในการปั่นเก็บส่วนใส	0.36%

## 3. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม ปริมาณกรดยูโรนิกและซัลเฟต ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

นำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมโดยวิธี Phenol-sulfuric และทำการหาปริมาณกรดยูโรนิกโดยใช้วิธี hydroxydiphenyl รวมทั้งหาปริมาณซัลเฟตโดยใช้วิธี BaCl<sub>2</sub>-gelatin หลังจากการไฮโดรไลซิสของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 0.5 M HCl (Dodgson & Price, 1962) ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม กรดยูโรนิกและซัลเฟตของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

ชนิดของสารที่ทดสอบ	ปริมาณที่พบ (%)
คาร์โบไฮเดรตรวม	33.24%
กรดยูโรนิก	8.70%
ซัลเฟต	25.55%

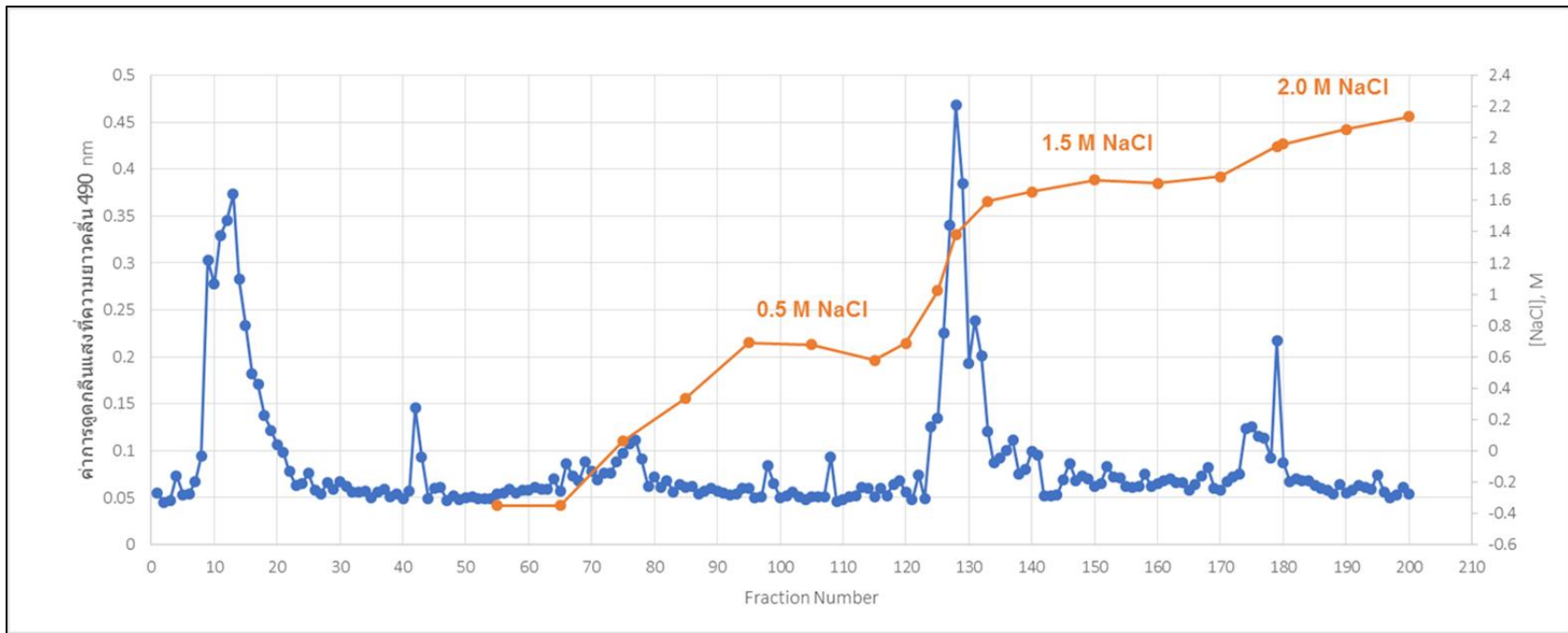
#### 4. การทำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยนำไปโหลดผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephrose ที่อัตราการไหล 1 มล./นาที ด้วยสารละลายเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0–2.0 M จากนั้นติดตามหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในแต่ละแฟรกชันด้วยวิธี phenol sulfuric ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 5 โดยพบพอลิแซ็กคาไรด์จำนวนสองฟีก โดยฟีกที่หนึ่ง คือ unbound fractions และฟีกที่สอง ถูกชะออกมาที่ NaCl ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 M จากนั้นทำการรวมแฟรกชันที่มีปริมาณน้ำตาลรวมสูงสุด แล้วนำไปทำไดอะไลซิส และทำให้แห้งโดยเทคนิคฟรีซดราย

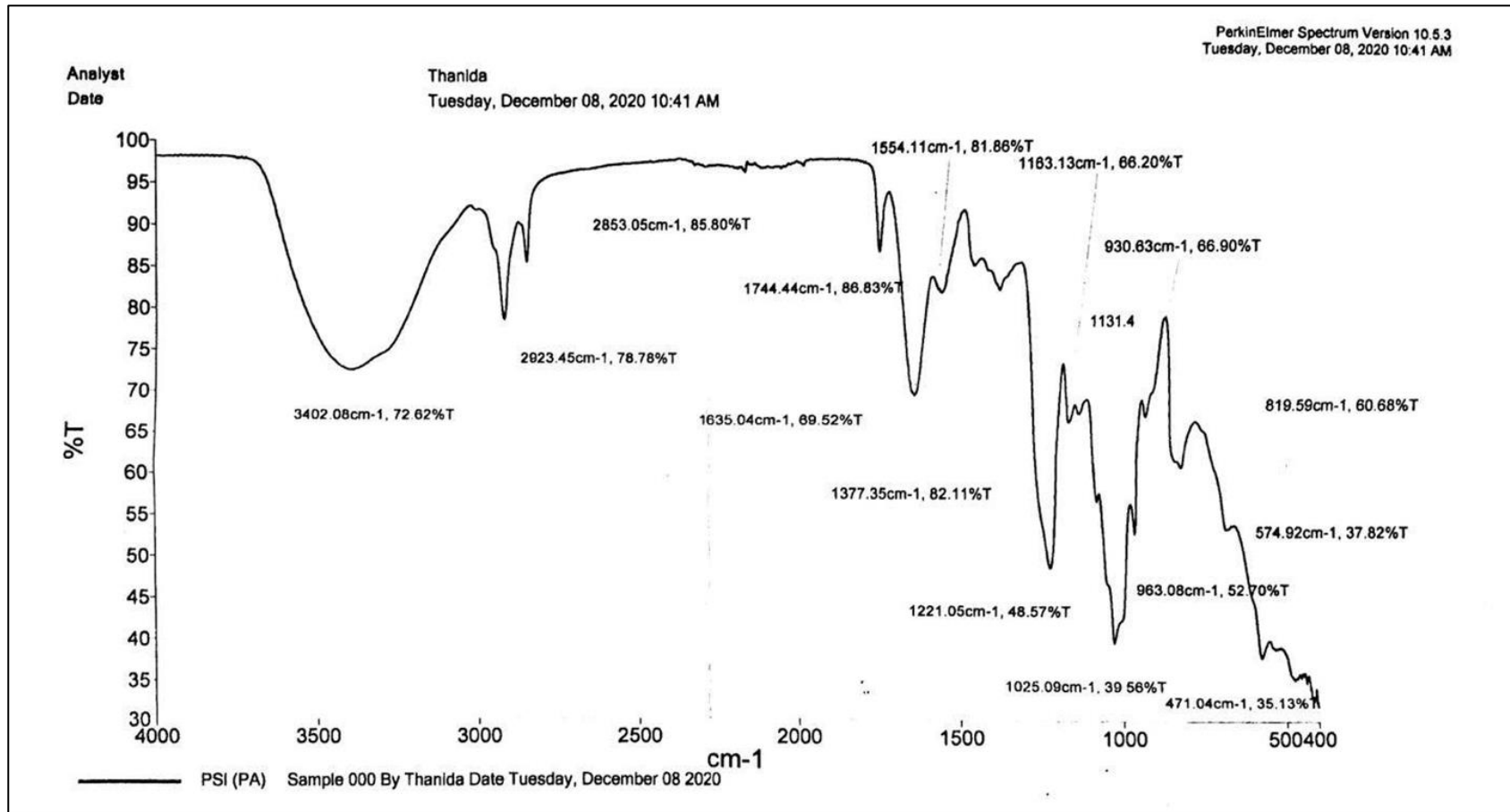
#### 5. การยืนยันโครงสร้างของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ด้วยเทคนิค FT-IR

จากการนำซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่ผ่านการทำให้แห้งมาวิเคราะห์หาโครงสร้างด้วยเทคนิค FT-IR โดยอาศัย ATR-FTIR spectrometer (PerkinElmer-Frontier) ทำการวิเคราะห์ FT-IR spectra ในช่วง  $4,000-400\text{ cm}^{-1}$  ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งผลที่ได้พบว่ามีเปลี่ยนแปลงที่เลขคลื่น  $1221.05\text{ cm}^{-1}$  แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังพบเลขคลื่นบริเวณ  $3402.08\text{ cm}^{-1}$ ,  $2923.45\text{ cm}^{-1}$  และ  $1025.09\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งบ่งบอกการปรากฏอยู่ของหมู่ O-H, C-H และพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก แสดงให้เห็นว่าสารที่สกัดได้จากอวัยวะภายในปลิงเป็นสารในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์





ภาพที่ 5 โครมาโตแกรมแสดงการทำบริสุทธิ์ซีลเฟตพอลิแซกคาไรด์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sepharose ขนาด 17.5 x 2.8 ซม. โดยมีน้ำกลั่นเป็น mobile phase ตามด้วยการชะด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.5, 1.5 และ 2 โมลาร์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ติดตามหาแฟรกชันที่มีคาร์โบไฮเดรตด้วย Phenol-Sulfuric assay



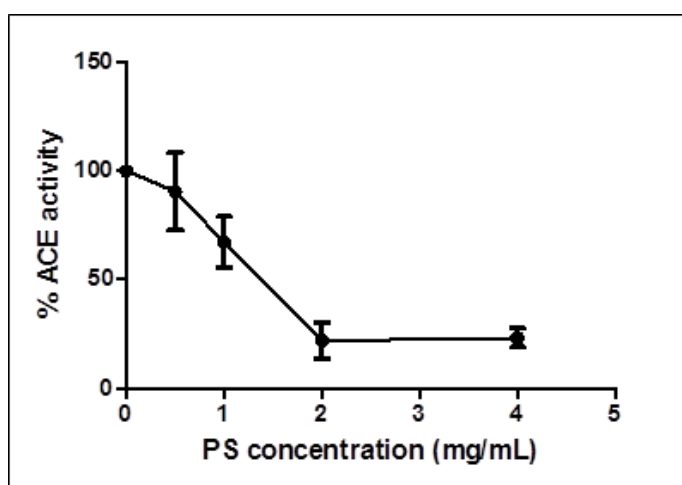
ภาพที่ 6 FT-IR spectrum ของซิลิโคนพอลิเอทิลีนที่สกัดได้จากอวัยวะภายในปลิงทะเล

## 6. การวิเคราะห์หาโมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

ในการวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารสกัดตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายในของปลิงทะเลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดย DEAE-column chromatography ได้มีการนำสารตัวอย่างไปตัดพันธะไกลโคซิดิกด้วยกรด TFA และความร้อน จากนั้นไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazoline-5-one derivatives (PMP) เพื่อสังเคราะห์ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ PMP แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิค HPLC โดยสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ประกอบด้วย D-(+)-glucose, D-(+)-galacturonic acid, L-(+)-fucose, D-(+)-galactose, D-(+)-N-acetyl-D-galactosamine, D-(+)-mannose, D(+)-xylose, D-(+)-N-acetyl-D-glucosamine, D-(+)-glucosamine hydrochloride, D-(+)-glucuronic acid และ D-(+)-galactosamine hydrochloride ตามลำดับ ผลที่ได้พบน้ำตาลชนิดต่างๆ ในสารสกัดตัวอย่าง คือ Mannose, Glucosamine hydrochloride, Glucuronic acid, Galacturonic acid, Galactosamine hydrochloride และ/หรือ N-acetyl-D-glucosamine, Xylose และ Fucose

## 7. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ในการยับยั้ง Angiotensin-converting enzyme (ACE)

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบจากอวัยวะภายในปลิงทะเล โดยคำนวณจากค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเรืองแสงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารตัวอย่างผสมอยู่ ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 7 โดยพบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบจากอวัยวะภายในปลิงทะเลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ที่ประมาณ 1 mg/mL



ภาพที่ 7 เปอร์เซนต์การยับยั้ง ACE ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบ

## อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากอวัยวะภายในของปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis*) เพื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบด้วยเทคนิค FT-IR และ HPLC ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้พบว่า %Yield ของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.36% ซึ่งคำนวณจากน้ำหนักแห้งของสารสกัดที่ได้รับเทียบกับน้ำหนักเปียกของอวัยวะภายในตั้งต้น จึงทำให้ % ที่ได้มีค่าค่อนข้างน้อย ทั้งนี้ ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อให้ได้ปริมาณสูง ควรศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิที่ใช้ ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปน ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มปาเปนระหว่างกระบวนการสกัด ตลอดจนอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่ออวัยวะภายในที่ใช้ตั้งต้น (Luo et al., 2013) นอกจากนี้ พบว่าการปั่นด้วยความเร็วสูง (high RPM) และความเร็วต่ำ (low RPM) เพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนใส ไม่ได้ส่งผลต่อ % yield ของสารสกัดที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

จากการทำบริสุทธิ์สารประกอบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์โดย DEAE column chromatography พบว่ามีสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่จับกับคอลัมน์ ซึ่งน่าจะเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ไม่มีประจุ และมีอีกหนึ่งพีคที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.38 โมลาร์ ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบจึงสามารถจับกับคอลัมน์ได้ จากการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ จึงแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้จากอวัยวะภายในของปลิงทะเลเป็นสารประกอบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ ทั้งนี้ ควรมีการทดลองใช้เทคนิคอื่นๆ เพื่อศึกษาโครงสร้างของสารสกัดดังกล่าวเพิ่มเติม เช่น 2D-NMR

จากการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเทคนิค HPLC พบ Mannose, Glucosamine hydrochloride, Glucuronic acid, Galacturonic acid, Galactosamine hydrochloride และ/หรือ N-acetyl-D-glucosamine, Xylose และ Fucose เป็นองค์ประกอบของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ อย่างไรก็ตาม น้ำตาลชนิด Galactosamine hydrochloride และ N-acetyl-D-glucosamine มี Retention time ที่ใกล้เคียงกันมาก จึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาวะที่ใช้ในการทำ HPLC ต่อไป ยังพบค่า Retention time ที่ไม่สามารถระบุชนิดของน้ำตาลในการทดลองครั้งนี้ได้ ซึ่งอาจจะเป็นน้ำตาลชนิดอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบของอวัยวะภายในปลิงทะเลที่ไม่ได้มีการฉีดน้ำตาลมาตรฐานในการทดลองครั้งนี้ เช่น Arabinose, Ribose, N-acetyl Mannose และ Raffinose จึงควรมีการเพิ่มน้ำตาลเหล่านี้เข้าไปในการทดลองด้วย

## สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสกัดสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากกล้ามเนื้อปลิงทะเลลูกบอล (*Phyllophorella kohkutiensis*) ได้ %Yield คิดเป็น 0.36% เทียบกับน้ำหนักเปียกของอวัยวะภายในที่ใช้ จากการศึกษาโครงสร้างของสารสกัดด้วยเทคนิค FT-IR พบว่าสารสกัดที่ได้จัดเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีหมู่ซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ เมื่อนำสารสกัดไปทำบริสุทธิ์ด้วย DEAE-column chromatography และนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบด้วยเทคนิค HPLC จะพบน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ Mannose, Glucosamine hydrochloride, Glucuronic acid, Galacturonic acid, Galactosamine hydrochloride และ/หรือ N-acetyl-D-glucosamine, Xylose และ Fucose นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์สามารถยับยั้ง Angiotensin-converting enzyme ได้

## ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อให้ได้ปริมาณ yield ที่สูงขึ้น
2. ควรมีการศึกษาโครงสร้างของสารประกอบซัลเฟตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเทคนิค NMR เพื่อจะได้ทราบถึงโครงสร้างและพันธะของสารสกัดที่ชัดเจนขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเขต 6 สงขลา (2562). ปลิงทะเลของไทย (ออนไลน์). สืบค้นจาก: <http://www.nicaonline.com/web/index.php/2016-08-30-02-21-49/2016-08-30-16-13-22> [12 กุมภาพันธ์ 2563]
- Bordbar, S., Anwar, F., and Saari, N. (2011) High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods--a review, *Mar Drugs* 9, 1761-1805.
- Chen, J. (2003) Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China, *SPC Beche-de-mer Inf. Bull.* 18, 18-23
- Dodgson, K.S., and Price, R.G. (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides, *Biochem J* 84, 106-110.
- Heding, S.G., & Panning, A. (1954) Phyllophoridae. Eine Bearbeitung der polytentaculaten dendrochiroten Holothurien des Zoologischen Museum in Kopenhagen, *Spolia Zoologica Musei Hauniensis* 13, 7-209.
- Luo, L., Wu, M., Xu, L., Lian, W., Xiang, J., Lu, F., ... & Zhao, J. (2013). Comparison of physicochemical characteristics and anticoagulant activities of polysaccharides from three sea cucumbers. *Marine Drugs*, 11(2), 399-417.
- Vieira, R.P., Mulloy, B., and Mourao, P.A. (1991) Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues, *J Biol Chem* 266, 13530-13536.
- Yang, J., Wang, Y., Jiang, T., and Lv, Z. (2015) Novel branch patterns and anticoagulant activity of glycosaminoglycan from sea cucumber *Apostichopus japonicas*, *Int J Biol Macromol* 72, 911-8.
- Zhang, Y.Q., and Chang, H.Y. (2014) Research progress on the structural components and function of sea cucumber viscera and their application, [*J*]. *Sci Technol Food Ind*, 35(13) 382-386.