รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำในทะเลอันดามัน

(The study of bioactive natural products from sponges in the Andaman Sea)

โดย

ดร. พชร เพ็ชรประดับ

ได้รับการอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2550

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

คำนำ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟองน้ำในทะเลอันดามันมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การวิจัยประกอบไปด้วยการเก็บตัวอย่าง การทำสิ่งสกัดหยาบ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น การแยกเอาสารสำคัญ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารบริสุทธิ์

ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่สนับสนุนทุการวิจัยประจำปี 2550 พร้อมทั้งหน่วยงานและผู้เกี่ยวข้องมา ณ โอกาสนี้

(ดร.พชร เพ็ชรประดับ)
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	2
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	3
ผลการวิจัยรายงานผลการวิจัย	6
เอกสารอ้างอิง	16
ภาคผนวก	18

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น (ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพและความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม) ของสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำจำนวน 40 ตัวอย่าง 80 สิ่งสกัดหยาบ พบฟองน้ำจำนวน 4 ตัวอย่างให้ผลตอบสนองต่อการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญจึงคัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่ออกฤทธิ์รุนแรงที่สุดมาแยกหาสารสำคัญ ชั้นสิ่งสกัดในชั้นเฮกเซนพบแฟรกชั่นที่เป็นส่วนผสมของสารสเตียรอยด์หนึ่งแฟรกชั่น ภายในของผสมนี้ประกอบด้วยสาร Cholest-5-en-3-ol ($C_{27}H_{46}O$; 23,24-Methanocholest-5-en-3β-ol ($C_{28}H_{46}O$); Stigmasta-5,22-diene-3-ol ($C_{29}H_{48}O$); Stigmasta-5,22-diene-3-ol ($C_{29}H_{48}O$) นำสิ่งสกัดในชั้นเอทิลอะซีเตดซึ่งมีฤทธิ์เป็นพิษสูงต่อไรน้ำเค็ม (LC_{50} = 15.5 µg/ml) มาแยกหาสารออกฤทธิ์ได้จำนวนหนึ่งชนิด ทำการพิสูจน์ทราบโครงสร้างเคมีโดยใช้ข้อมูลจากเครื่องนิวเคลียร์แมกนีติกเนโซแนนซ์และแมสสเปกโทรเมตตรีได้เป็นผลสำเร็จทราบว่าเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene hydroquinone คือสาร aureole

ABSTRACT

Biological activities screening (antibacterial and brine shrimp lethality) of 80 marine sponges extracts (40 specimens) found that 4 specimens gave potent activity. The highest potent activity (GT0303IIIC) was collected for further isolation and purification of active constituents. By using various chromatographic techniques found a fraction consist of 4 steroids mixture which was analyzed by GCMS. The result showed that it consist of 4 steroids including Cholest-5-en-3-ol ($C_{27}H_{46}O$); 23,24-Methanocholest-5-en-3B-ol ($C_{28}H_{46}O$); Stigmasta-5,22-diene-3-ol ($C_{29}H_{48}O$) and Stigmasta-5,22-diene-3-ol ($C_{29}H_{48}O$). A sesquiterpene hydroquinone (aureole) was isolated from ethyl acetate part and it was successfully elucidated molecular structure by NMR and mass spectrometry method.

บทนำ
(Introduction)

สารเคมีที่เป็น secondary metabolite ซึ่งผลิตโดยสิ่งมีชีวิตในทะเล เรียกว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (marine natural products) ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล เริ่มมีการศึกษาอย่างจริงจัง เมื่อ 54 ปีมาแล้วโดย Bergman ในปี 1951 พบสารนิวคลีโอไซด์จากฟองน้ำ *Cryptotethya crypta* จนกระทั่งในปี 2002 มีรายงานการค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลชนิดใหม่ 677 ชนิด ซึ่งฟองน้ำทะเลมีรายงานการค้นพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมากที่สุด (Blunt *et al*,2002) ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล มักมีความแปลกใหม่ (novel) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะฟองน้ำทะเล จึงมีการประยุกต์ใช้ด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น การเพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม และด้านชีวภาพ ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลหลายชนิดกำลังพัฒนาให้เป็นยาชนิดใหม่ และ/หรือ ผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางทะเล (marine bioproducts) บางชนิดเป็นสารเคมีชีวภาพใช้ในการทดลองทางวิทยาศาสตร์ จากการรวบรวมการค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลของนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ซึ่งรายงานใน natural products report ตั้งแต่ปี 1990 เช่น Faulkner, Blunt และคณะ, Munro และ คณะ , Paul และ Puglisi (2003) สามารถสรุปได้ว่าฟองน้ำได้รับการศึกษามากที่สุด และมีรายงานการค้นพบสาร secondary metabolite มากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 1 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากฟองน้ำทะเล ส่วนใหญ่แสดงผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่นจากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของสิ่งสกัดจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ สหรัฐอเมริกา พบว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากฟองน้ำ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดีที่สุด (Munro *et al*,1999)

การศึกษาสาร secondary metabolite จากสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังในประเทศไทยนั้นมีรายงานค่อนข้างน้อย เช่น การค้นพบสาร cyclicperoxide norsesterterpenes จากฟองน้ำ *Mycale* sp. ในปี 1993 และสาร Isoquinoline alkaloids จากฟองน้ำ *Reniera* sp. สารกลุ่ม Eunicellin diterpene จากปะการังอ่อน *Cladiella tuberosa* ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บที่บริเวณเกาะสีชัง (Suwanborirux, 1996) มีการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลอันดามัน ซึ่งรายงานโดยสุวิกาลและคณะ (2005) พบสารกลุ่ม brominated diphenylether จากฟองน้ำ *Dysidae granulosa* สารกลุ่ม bromopyrrole alkaloids จากฟองน้ำ *Stylissa flabelliformis* และสารชนิดใหม่ Dragmacidonamine A และ B จากฟองน้ำ *Dragmacidon* sp. (Pedpradab *et al*, 2004)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การวิจัยแบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่าง

ใช้วิธีการดำน้ำแบบ SCUBA เก็บตัวอย่างฟองน้ำ บริเวณจังหวัด ตรัง สตูล พังงา และ กระบี่ โดยเลือกเก็บเฉพาะชนิดที่มีในจำนวนมาก ปริมาณการเก็บ 300 กรัม/ตัวอย่าง ใช้วิธีการตัดแบบไม่ทำลายเนื้อเยื่อ เพื่อให้ส่วนที่เหลืองอกกลับคืนใหม่ มีการถ่ายภาพใต้น้ำบันทึกสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยของฟองน้ำเพื่อเป็นข้อมูลประกอบการจำแนกชนิด ตัวอย่างถูกเก็บในถุงพลาสติกปิดสนิท รักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำมาเก็บที่อุณหภูมิ –20 °C ณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

2. การสกัด

ฟองน้ำจะถูกหมักในเอทานอล และจะถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากขั้นสูงไปหา ขั้วต่ำดังแสดงในภาพที่ 2 สิ่งสกัดหยาบในแต่ละส่วนจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทดลอง ก่อนนำไปแยกหาองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์โดยวิธีการทางโครมาโทกราฟี

3. การจำแนกชนิดของฟองน้ำ

ตัวอย่างฟองน้ำที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจะถูกจำแนกชนิดโดยวิธี visual key ตามวิธีของ Soeast and Cooper (2004)

4. การแยกหาองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

เก็บตัวอย่างฟองน้ำในทะเลบริเวณ จ. ตรัง กระบี่ พังงา และสตูลใช้วิธีการทางโคมาโทกราฟีเพื่อแยกหาองค์ประกอบออกฤทธิ์ตามลำดับ ได้แก่

4.1 ตัวอย่างสิ่งสกัดจากฟองน้ำถูกฉีดสู่ HPLC เพื่อตรวจสอบจำนวนและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในฟองน้ำแต่ละชนิด จากนั้นนำไปตรวจหามวลโมเลกุล ด้วย LCMS เพื่อเป็นแนวทางในการแยกต่อไป (ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมและโอกาส)

4.2 การทำองค์ประกอบออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการทางโครมาโทรกราฟีแบบต่างๆ เช่น แบบเยื่อบาง (TCL) เพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมและเป็นข้อมูลรวม fractions, โครมาโทรกราฟีแบบคอลัมน์ เพื่อแยกในปริมาณมาก โดยใช้ silica gel เป็นวัสดุแยก แบ่งเป็น 3 ชนิดคือ แบบธรรมดา (normal phase) แบบกลับขั้ว (reverse phase) และแบบ แยกตามขนาดโมเลกุล (gel permeable on sephadex LH-20) การตัดสินใจเลือกวัสดุแยกหรือวิธีการแยกขึ้นอยู่กับสถานการณ์ และชนิดของกลุ่มสารที่มีอยู่ในฟองน้ำนั้น ๆ มีการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพระหว่างกระบวนการแยกเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ทิศทางและตัดสินใจเลือก fraction ในกรณีองค์ประกอบสำคัญอยู่ในรูปของส่วนผสมที่ซับซ้อน (complex mixture) จะทำการแยกโดยใช้ HPLC และ semipreparative HPLC

5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี

5.1 การพิสูจน์โครงสร้างเคมี

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วจะถูกนำมาศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี ได้แก่ การพิสูจน์โครงสร้างเคมี โดยใช้ nuclear magnetic resonance spectroscopy โดยใช้เครื่อง Fourier Transform NMR Spectrometer 500 MHz, Model Unity INOVA ค่า chemical shift วัดในหน่วย ppm ซึ่งข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปของสเปคตรัม มี 2 แบบ คือ มิติเดียว (1 D-NMR) ได้แก่ ^{1}H-MNR, ^{13}C-NMR, DEPT และแบบ 2 มิติ (2D-NMR) ได้แก่ HMBC, HMQC, COSY, NOESY และอื่น ๆ ที่จำเป็น

5.2 วิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพ ได้แก่ จุดหลอมเหลว การดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต

5.3 การหามวลโมเลกุลใช้ mass spectroscopy แบบ electron spray ionization mass spectroscopy (ESIMS), electron ionization (EI), Fast atom bombardment spectroscopy (FABMS) ในกรณีเป็นสารชนิดใหม่จะหามวลโมเลกุลโดยใช้ high resolution mass spectroscopy (HRMS)

การพิสูจน์โครงสร้างจะใช้ข้อมูลเชิงบูรณาการ โดยใช้ mass spectroscopy เพื่อหามวลโมเลกุลในขั้นต้นจากนั้นมีการนำสารไปตรวจวัด ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ซึ่งจะถูกนำไปหาความคล้ายคลึงในสูตรโครงสร้างจากฐานข้อมูล Marinlit และจะวัด 2D-NMR เพื่อประกอบโครงสร้างโมเลกุลให้สมบูรณ์ในกรณีเป็นสารใหม่ หรือมีความซับซ้อนสูงจะใช้ high resolution NMR (500 MHz)

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

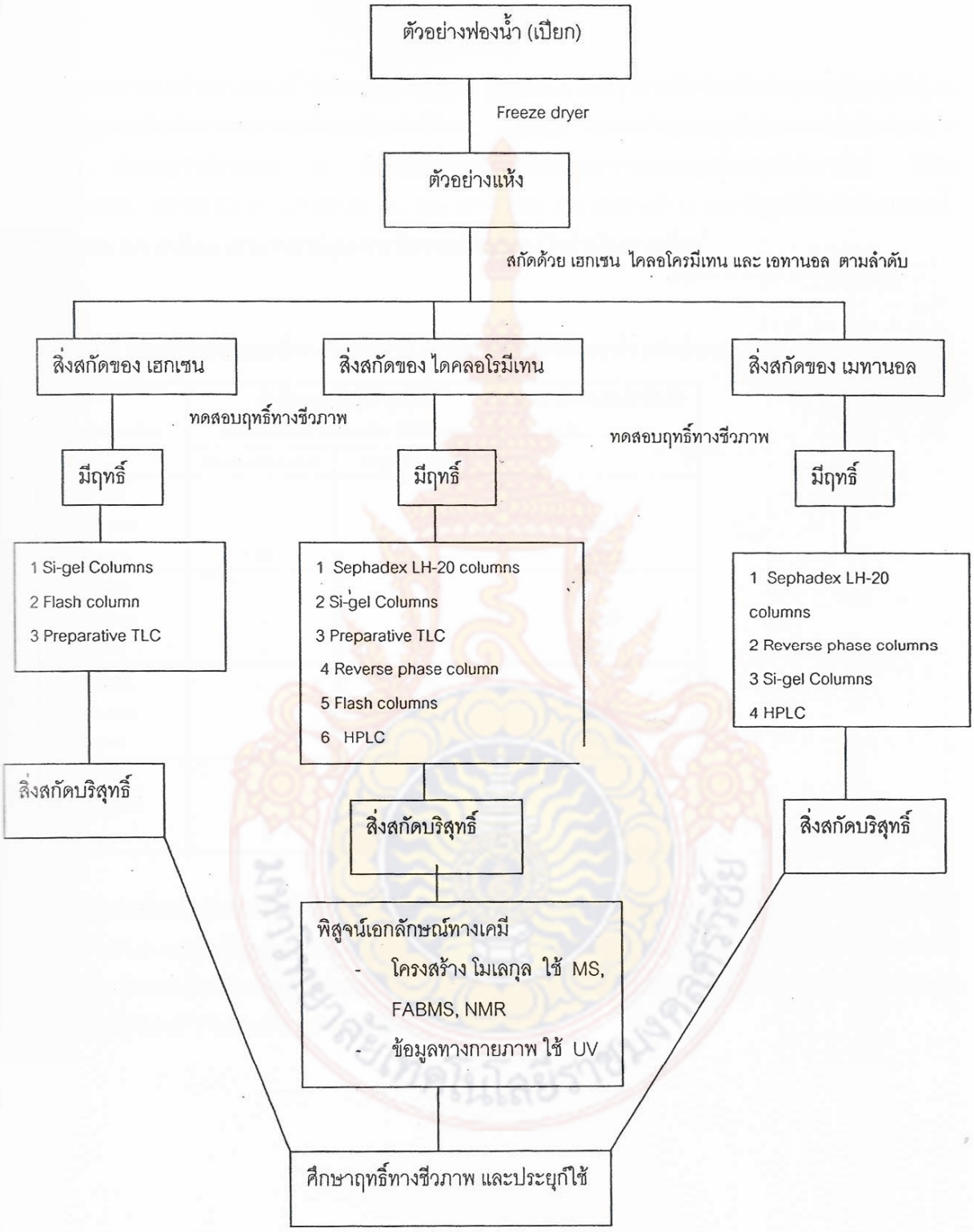
6.1 ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลชีพ

สิ่งสกัดหยาบ fractions และสารบริสุทธิ์จะถูกทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใช้ tryptic soy medium (Sigma, FRG) อาหาร

- การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียใช้วิธี agar diffusion ของ Aauer kirby-test ซึ่งพัฒนาโดย Bauer *et al* (1996) การทดสอบเบื้องต้น โดยการถ่ายเชื้อ 3 -10 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ปริมาณ 4 ml และบ่มเชื้อ 2-5 ชม.โดยเทียบความขุ่นของเชื้อกับ $BaSO_4$ มาตรฐาน ก่อนถ่ายเชื้อลงจานเพาะ
- การเตรียมสิ่งสกัด

สิ่งสกัดหยาบจะเตรียมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 μg/disc ส่วน fraction และสารบริสุทธิ์เตรียมที่ความเข้มข้น 20 μg/disc โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม

6.2 ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี brine shrimp assay ตามวิธีของ Sam (1999)



แผนภาพที่ 1 วิธีการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างฟองน้ำจำนวน 40 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่) มาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้ 80 สิ่งสกัดหยาบเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลชีพและความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม โดยพบว่ามีจำนวน 4 ตัวอย่างให้ผลตอบสนองต่อการทดสอบฤทธิ์อย่างมีนัยสำคัญ[1] ได้แก่ GT-03-01IIE, GT-03-02 IA, GT-03-02 IIA, และ GT-03-03 IIIA (ตารางที่ 1) จากข้อมูลนี้จึงคัดเลือกฟองน้ำ GT-03-03 IIIA มาศึกษาหาสารสำคัญเพราะมีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มมากที่สุด[2]

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำ (คัดเลือกเฉพาะที่มีนัยสำคัญ)

ระหัสตัวอย่าง	ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ (บริเวณยับยั้ง หน่วยเป็น มิลลิเมตร)		ความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม (LD_{50} µg/ml)
	Escherichia coli	*Bacillus subtilis*	
GT0301IIE			
Hexane part	-	-	125.5
EtoAc part	12	-	>1000
GT0302IA			
Hexane part	-	-	>1000
EtoAc part	-	-	500
GT0302 IIA			
Hexane part	-	-	>1000
EtoAc part	-	-	500
GT0303IIIC			
Hexane part	-	-	500
EtoAc part	-	-	15.25

เมื่อนำชั้นสกัดที่ออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม (EtOAc part) มาตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC พบว่าตัวอย่างฟองน้ำ GT-03-03IIIC มีองค์ประกอบสองส่วน (รูปผนวกที่) ซึ่งมีความเป็นขั้วไกล้เครียงกันมาก จึงนำมาแยกเอาสารออกฤทธิ์ได้ 1ชนิด ส่วนในชั้นเฮกเซนสามารถ แยกได้สารผสมสเตียรอยด์จำนวน 1 แฟรกชั่น (แผนภาพผนวกที่ 1)

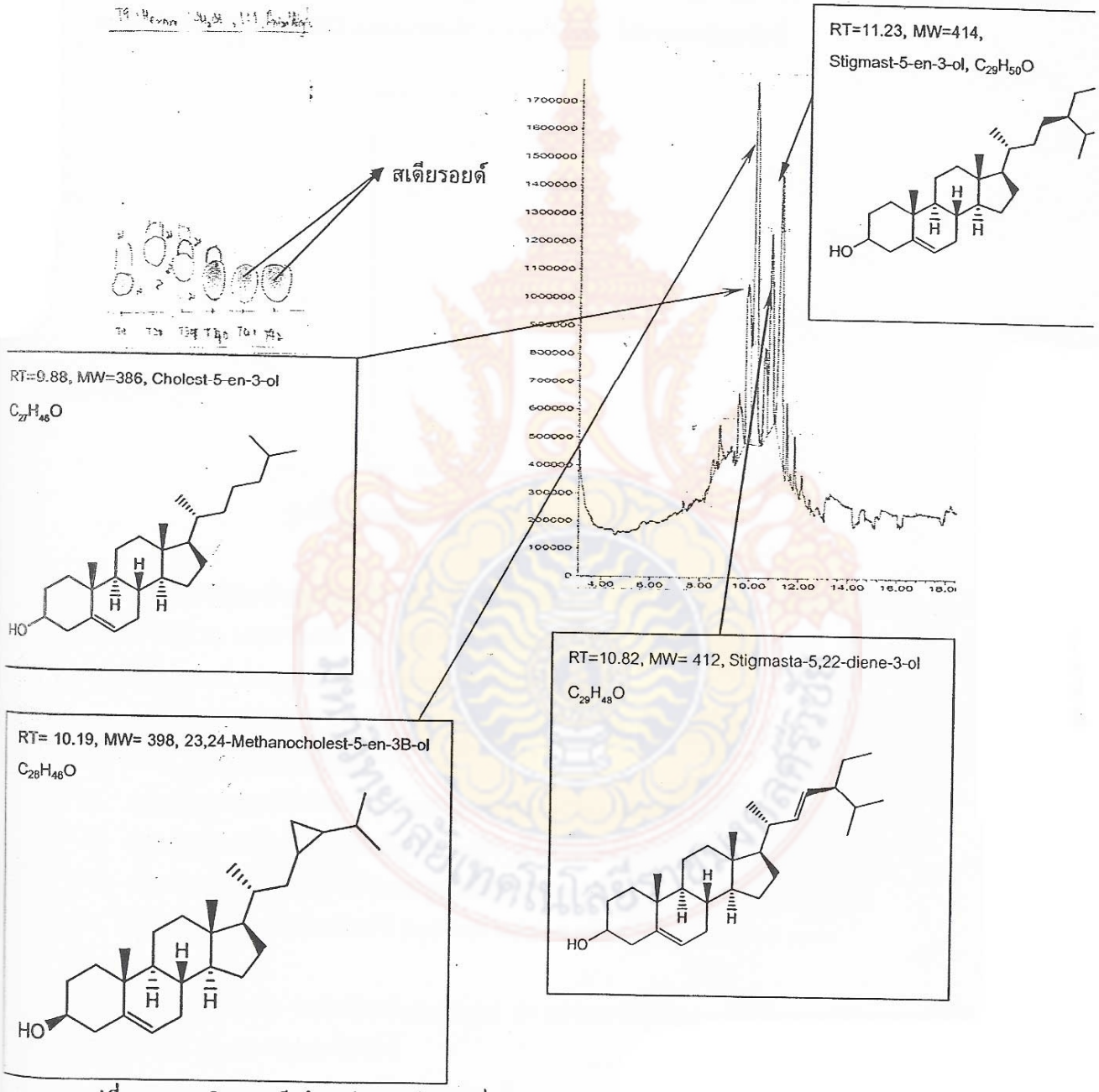
---

[1] ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพให้ผลบริเวณยับยั้ง ≥ 10 mm ส่วนความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ฒมีค่า $LC_{50} \leq 20$ µg/ml ถือว่าเป็นการออกฤทธิ์มีนัยสำคัญ

[2] สารที่มีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มส่วนใหญ่จะเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงใช้คุณสมบัตินี้เป็นแนวทางในการสกัดแยกหาสารต้านมะเร็ง

การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ทางเคมีผลึกสเตียรอยด์

สิ่งสกัดชั้นเฮกเซนถูกนำมาแยกด้วย vacuum Liquid Chromatography (VLC) พบผลึกรูปเข็มสีขาวจึงทำความสะอาดด้วยการตกผลึกและทดสอบกลุ่มสารด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) พบสารสเตียรอยด์ (ทดสอบด้วย Anisaldehyde Reagent, รูปที่ 1) เมื่อวิเคราะห์ด้วย GCMS (รูปที่ 2) พบว่าผลึกผสมนี้ประกอบด้วยสเตียรอยด์หลายอนุพันธ์และไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้จึงวิเคราะห์มวลโมเลกุลเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Willey พบว่ามีองค์ประกอบหลัก 4 ชนิด คือ Cholest-s-en-3-ol, 23,24-methanocholeat-5-en-3B-ol , stigmast-5 –en-3-ol , และ Stigmasta-5 , 21-dien-3-ol



รูปที่ 1 ผลการวิเคราะห์ผลึกสเตียรอยด์ด้วยเครื่อง GCMS

MW = มวลโมเลกุล, RT= Retention Time

จากการสืบค้นรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าสารในกลุ่มนี้ถูกแยกได้จากฟองน้ำทะเลหลายชนิด เช่น *Agelas scaptum*; *Spongia* sp.; *Petrosia weibergi* และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญคือ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Carcinima และ ยับยั้งการเจริญของไวรัส บางอนุพันธุ์ได้รับการพัฒนาให้เป็นสารต้นแบบในการผลิตยา (Feng *et al*., 2002; Aoki *et al.,* 1999; Luis *et al*., 1999)

การพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ทางเคมีของสาร aureol

จากการนำส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซีเตตมาแยกเอาสารออกฤทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี (แผนภาพที่) พบสารกลุ่ม sesquitergene hydroquinone จำนวนหนึ่งสาร มีลักษณะ เป็นของเหลวสีม่วงอ่อน มีค่า Rf เท่ากับ 0.3 บนแผ่น TLC แบบธรรมดา (normal phase) ตอบสนองต่อแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (nm) โดยมีลักษณะเป็น Quenching สีจางๆ (**รูปที่ 2**) เมื่อนำสารที่ได้ไปหาโครงสร้างโมเลกุลโดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์ (NMR) และแมสสเปกโตรเมตรี (MS) ได้รายละเอียดดังนี้

รูปที่ 2 ลักษณะ TLC ของสารบริสุทธิ์

ผลการทดสอบด้วยเครื่องเอ็นเอ็มอาร์แบบมิติเดียว (1D-NMR) ประกอบด้วยโปรตอนไอโซโทปหนึ่ง (^{1}H-NMR, **รูปที่ 3**) และคาร์บอนไอโซโทป 13 (^{13}C-NMR, **รูปที่ 4**) และเทคนิค DEPT 135° (**รูปที่ 5**) จากข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ พบกลุ่มสัญญาณจำนวน 5 กลุ่มได้แก่

1. กลุ่มสัญญาณเมทิล (CH_3) จำนวน 4 สัญญาณ (signal) ที่ค่าเคมีคัลชีฟ (chemical shift,δ) 0.72, 0.86, 1.23, 1.42 ppm ตามลำดับ
2. กลุ่มสัญญาณเมทิลีนโปรตอน (Methylene หรือ -CH_2) มีค่าเคมีคัลชีฟอยู่ในช่วง 1-2 ppm
3. กลุ่มสัญญาณมีไทน์ (Methine proton หรือ -CH) ที่ค่าเคมีคอลชีฟ 2.2 และ 3.19 ppm
4. กลุ่มสัญญาณอะโรมาติกโปรตอน (aromatic region) ที่ค่าเคมีคัลชีฟ 6.3-6.7 ppm
5. สัญญาณหมู่ฟังก์ชั่นไฮดร็อกซี (hydroxyl function หรือ OH group) ที่ 3.8 ppm

ข้อมูล ^{13}C-NMR พบว่ามีคาร์บอนจำนวน 21 อะตอม เมื่อวิเคราะห์ชนิดของคาร์บอนเหล่านี้ด้วยเทคนิค DEPT 135° สามารถจำแนกได้ดังนี้

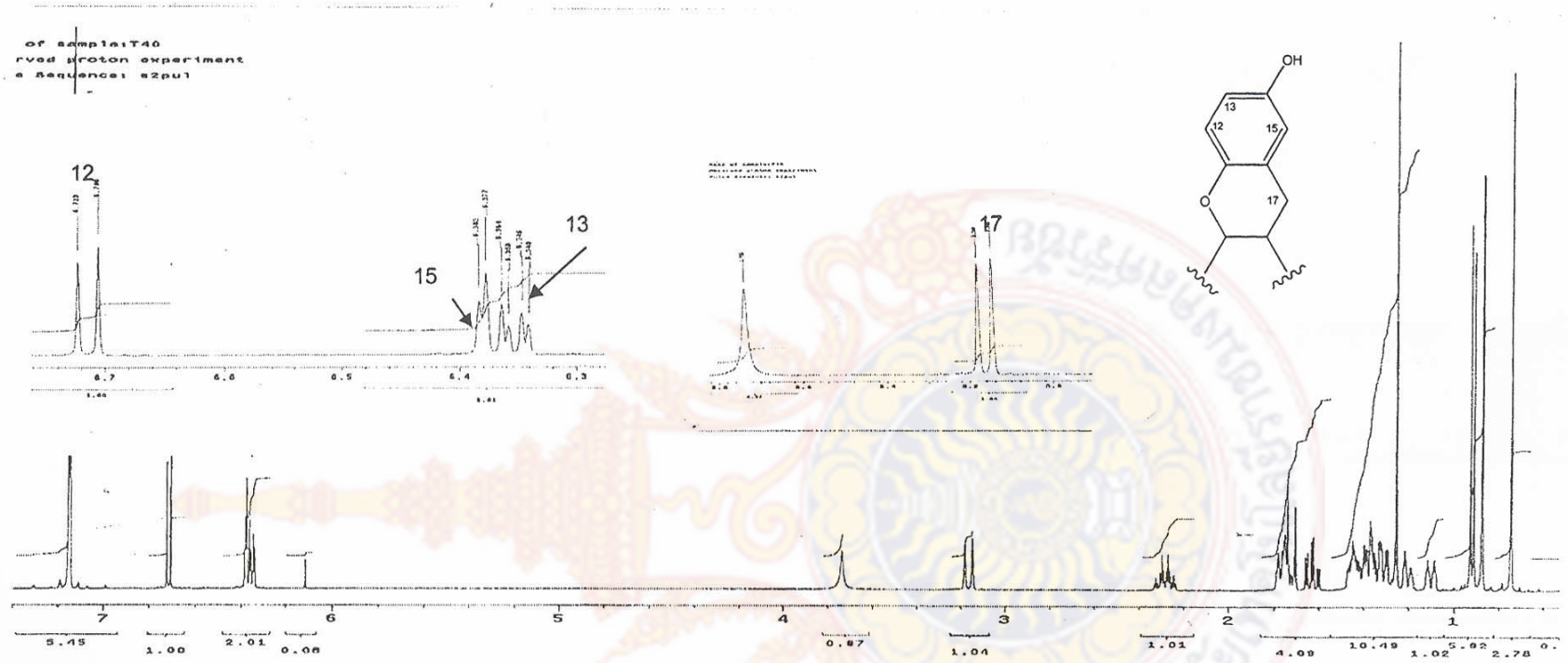
- เมทิลคาร์บอน (-CH_3) ได้แก่สัญญาณที่ค่า δ 17.4, 20.2, 30.2 และ 32.1 ppm
- เมทิลีนคาร์บอน (-CH_2) ได้แก่สัญญาณที่ค่า δ 18.7, 22.4, 27.9, 29.6, 34.2, 37.6 ppm

- มีไทน์โปรตอน (methine protone)

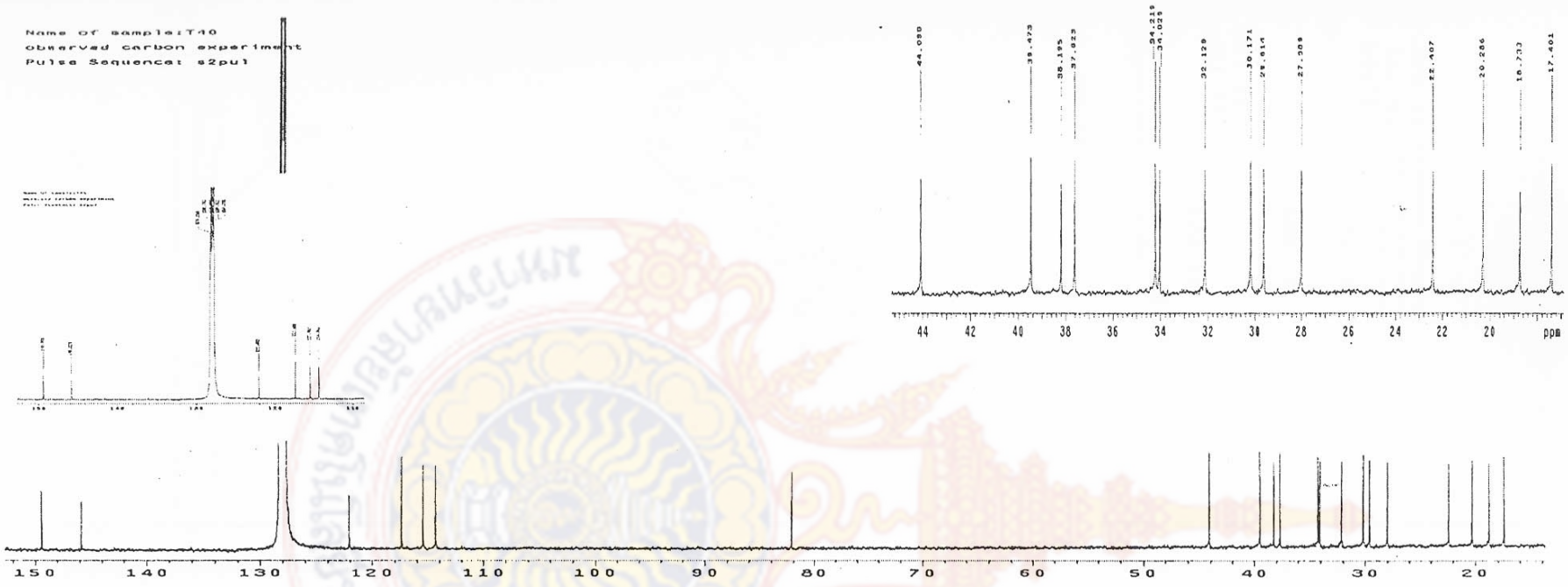
- อลิฟาติกมีไทน์ (aliphatic methane proton) คือสัญญาณที่ค่า δ 39.5 และ 44.1 ppm

- อโรมาติกมีไทน์ (aromatic methane๗ คือสัญญาณที่ค่า δ 114.4, 115.5 และ 117.4 ppm

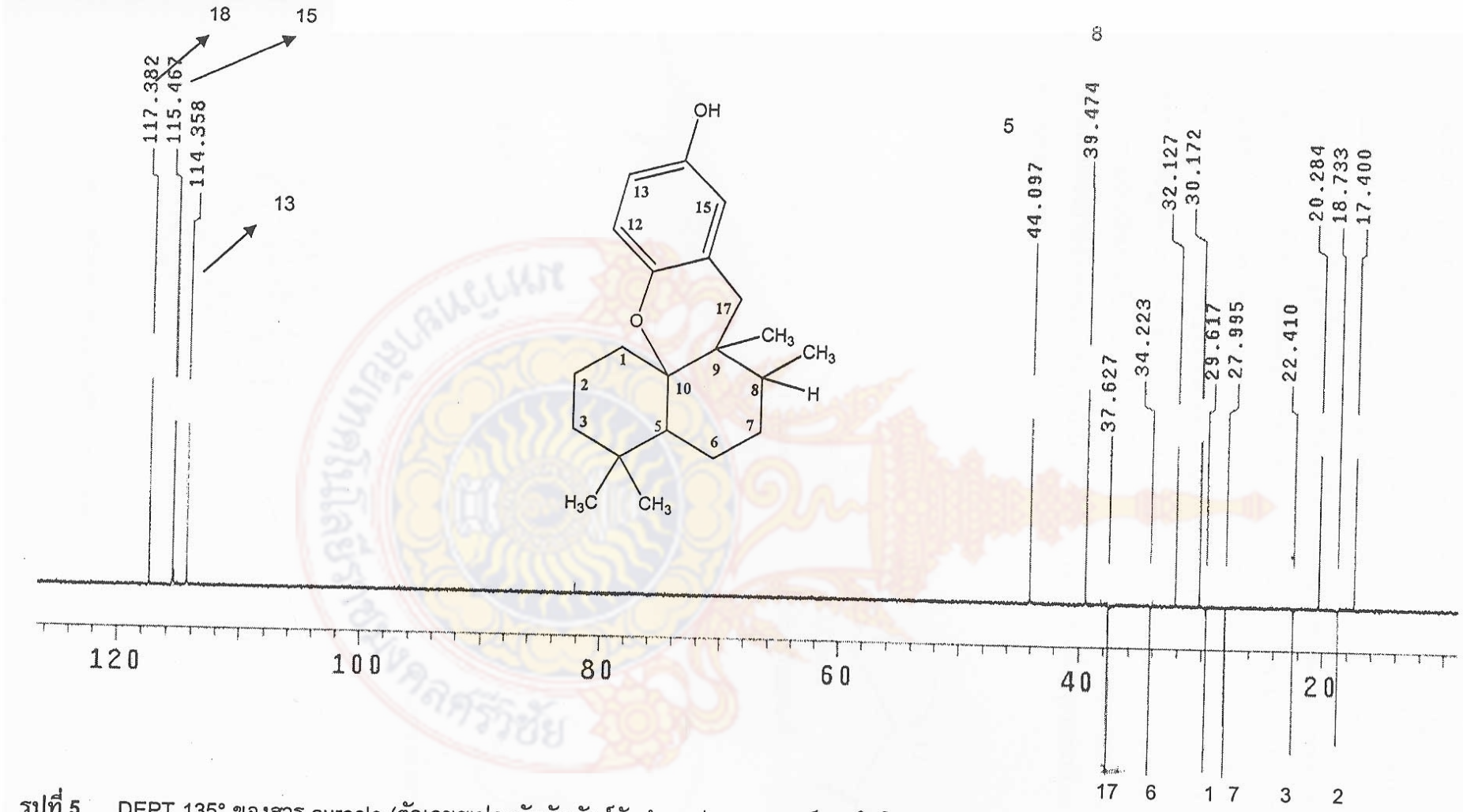
- ควอเทอนารี่คาร์บอน (Quaternary carbon) ซึ่งเป็นคาร์บอนที่สร้างพันธะกับอะตอมหรือหมู่อะตอมที่ไม่ซ้ำกันได้แก่ คาร์บอนที่ค่าδ 34.0, 38.2, 82.1, 122.1, 145.8 ppm (เชื่อมต่อกับเฮตเทอโรอะตอมในกรณีนี้คือออกซิเจน) และ 149.4 ppm (เชื่อมต่อกับไฮดร็อกซีฟังก์ชั่น) ข้อมูล 1D-NMR ทำให้เราทราบสูตรโมเลกุลของสารนี้คือ C_{21} $H_{29}O_2$ มีมวลโมเลกุล 314.46



รูปที่ 3 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{1}H-NMR) ของสาร aureol

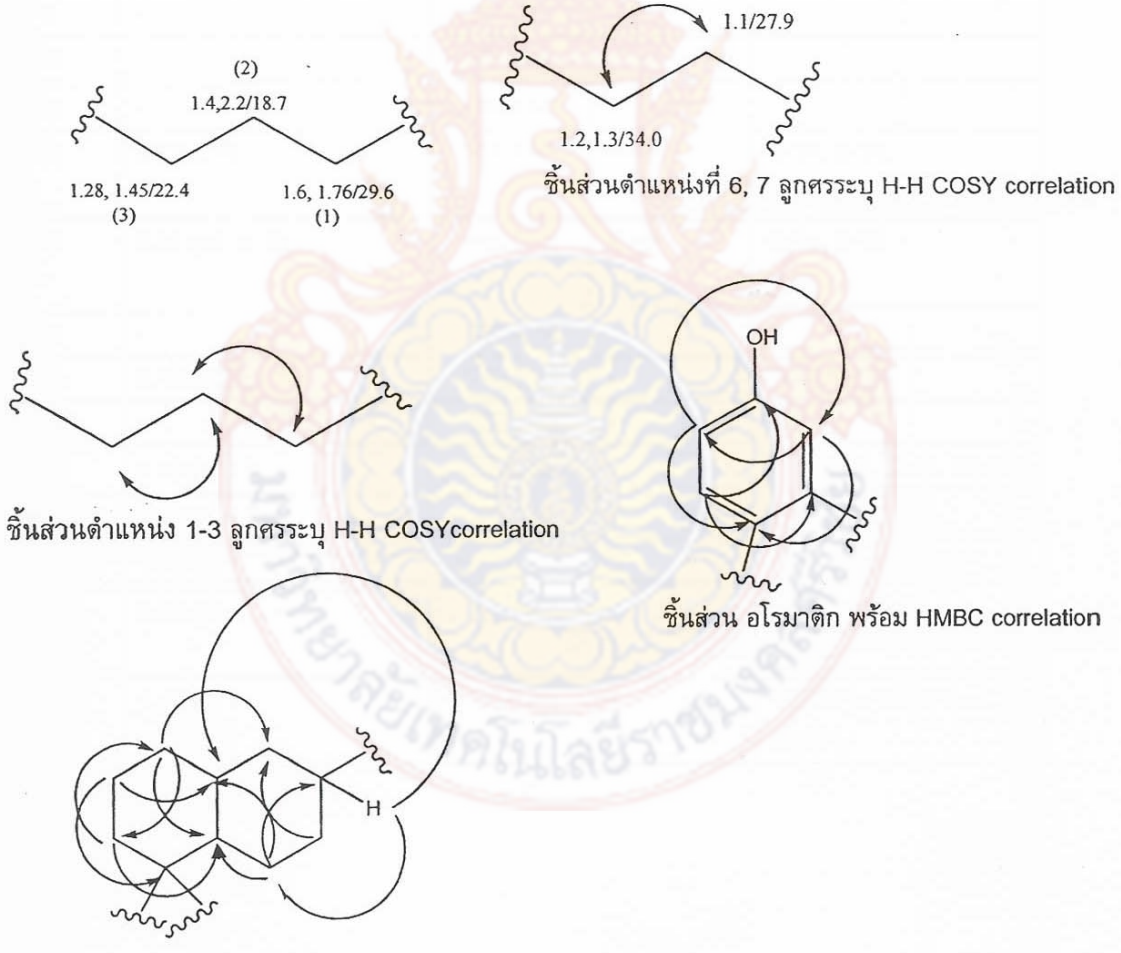


รูปที่ 4 คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์ (^{13}C-NMR) ของสาร aureole



รูปที่ 5 DEPT 135° ของสาร aureole (ตัวเลขสเปกตรัมสัมพันธ์กับตำแหน่งอะตอมคาร์บอนในโมเลกุล)

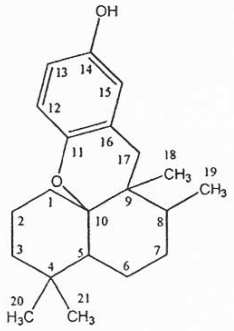
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 2D–NMR ได้แก่เทคนิค ^{1}H-detected Heteronuclear Multiple Quantum Cohererence (HMQC, รูปผนวกที่ 1) ทำให้เราสามารถกำหนดการเข้าคู่กันของคาร์บอนและโปรตอนได้ (ตารางที่ 2) เทคนิค Correlation Spectroscopy (COSY, รูปผนวกที่ 2) ทำให้เราสามารถวิเคราะห์ชิ้นส่วนโมเลกุลที่เป็นลักษณะ $CH_2CH_2CH_2$ และ CH_2CH_2ได้ สำหรับชิ้นส่วนอะโรมาติกพิจารณาจากรูปแบบของ ^{1}H-NMR Spectrum ค่าเคมีคัลชีฟ จากข้อมูล ^{1}H-NMR โปรตอนที่ค่าเคมีคัลชีฟเท่ากับ 6.32 ppm (dd), 6.7 (d), 6.4 ppm (brd) โดยมีค่าคงที่ของการเข้าคู่ (Coupling constants, *J*) เท่ากับ (5, 10) (10), (5) ตามลำดับ ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ในลักษณะ ortho-ortho และ ortho-meta ทำให้สามารถหาชิ้นส่วน 1, 2, 4- trisubstitution ได้ คาร์บอนที่ค่าเคมีคัลชีฟ 149 คือ อะตอมคาร์บอนที่มีไฮดร็อกซีฟังก์ชั่นมาเกาะ ส่วน 145 คือคาร์บอนเชื่อมต่อกับออกซีเจน เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ระยะไกล (^{1}H-detected Heteronuclear Multiple Bond Coherence, HMBC) ทั้งหมดทำให้ทราบว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดนี้เป็น Sesquiterpene hydroquinone ชื่อ Aureol ซึ่งสรุปค่าเคมีคัลชีฟทั้งโปรตอนและคาร์บอนพร้อมทั้งข้อมูลแบบ 2D-NMR ไว้ในตารางที่ 2 (รายละเอียด spectrum การกำหนดตำแหน่งดูจากภาคผนวก)



รูปที่ 6 การประกอบชิ้นส่วนต่างๆให้เป็นโมเลกุลโดยเทคนิค 2D-NMR

ตารางที่ 1 สรุปค่าเคมีคัลชีฟ (δ) ของสาร aureole

Position	^{1}H-NMR (multiplicity, *J* in Hz)	^{13}C-NMR	COSY	HMBC
1	1.60, 1.76 (tdd, *4.5, 4.5 4.5, 13.5, 13.5*)	29.6 (t)	H-2	C-2,C-3, C-5, C-10
2	1.42, (m), 2.2 (tttt, *4, 13, 4, 13,4, 13,4,13*)	18.7 (t)	H-1, H-3	C-4, C-10
3	1.28, (brd, *13*) 1.45 (m)	22.4 (t)	H-2	C-1, C-5
4	-	34.2 (s)	-	
5	-	44.1 (s)	-	
6	1.20 (brd, 13.0), 1.30 (m)	34.0 (t)	H-7	C-5, C-8, C-10
7	1.10 (m)	27.9 (d)	H-6	C-9, 19-CH_3
8	1.34 (s)	39.5 (d)	-	C-6, C-10
9	-	38.2 (s)	-	
10	-	82.1 (s)	-	
11	-	145.8 (s)	-	
12	6.71(d, *9*)	117.4 (d)	H-13	C-11, C-14, C-16,
13	6.32 (dd, *9, 3*)	114.3 (d)	H-12	C-11, C-14, C-15
14	-	149.4 (s)	-	
15	6.40 (d, *3*)	115.5 (d)	-	C-11, C-13
16	-	122.1 (s)	-	
17	3.19 (s, *17*)	37.6 (d)	-	C-8, C-15, C-16, 18-CH_3
18-CH_3	0.86 (d, *17*)	20.3 (q)	-	C-9, C-10, C-17
19-CH_3	1.23 (s)	30.2 (q)	-	C-6, C-7, C-8, C-9
20-CH_3	0.72 (s)	32.1 (q)	-	C-3, C-4, C-5, 21-CH_3
21-CH_3	1.42 (s)	17.4 (q)	-	C-3, C-4, C-5, 20-CH_3



สาร aureol ถูกแยกได้จากฟองน้ำหลายชนิด โดยเฉพาะสกุล *Dysidea* เช่น *D. cinerea*, *D. avara*, (Hisrsh *et al.*, Çrispino *et al.*, 1989; Minale, *et al.*, 1974) ส่วนฟองน้ำชนิดอื่นได้แก่ *Dactylospongia elegans* และ *Smenospongia* sp. (Mitome *et al.*, 2002; Kondracki and Guoyot, 2004) จากการศึกษาการจำแนกอย่างคร่าวๆโดยใช้คู่มือ Systema porfer (2002) พบว่าฟองน้ำที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้น่าจะอยู่ในสกุล *Smenospongia*

จากการศึกษาสาร aureol ของนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ทั้งการแยกสารจากฟองน้ำโดยตรงและการสังเคราะห์เช่น Shen *et al.*, (2006); Nakatani *et al.*, (2003); Hu *et al.*, (2002); Tasdemir *et al.*, (2002); Nakamura *et al.*, (2002); Urban *et al.*, (1994); Wright *et al.*, (1991); Guella *et al.*, (1988); Djura *et al.*, (1980) จนเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่าผสาร aureol มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการได้แก่ ต้านการเจริญของเชื้อไวรัส เช่น เชื้อไข้หวัดใหญ่ PR8 influenza (EC_{50}= 0.0063 µg/200 µl), ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เช่น P338 (IC_{50}= 9 µg/ml), เซลล์มะเร็งปอด A549 (IC_{50}=4.3 µg/ml) (Nakatani *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ ต่อมามีการทดสอบด้านคลินิกพบว่าสามารถลดการลุกลามของเชื้อไวรัสและมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) ได้ จึงมีการจดทะเบียนลิขสิทธิ์การใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มนี้ ได้แก่ลิขสิทธิ์เลขที่ U.S. Pat. 609931 และ U.S. Pat. 47,377,510 (PatentStorm, 1993)

จากผลการศึกษาครั้งนี้ควรมีการศึกษาต่อเนื่องในการหาปริมาณการสร้างสารตามฤดูกาลและศึกษาหาวิธีการเพาะเลี้ยงฟองน้ำชนิดนี้เพื่อใช้เป็นแหล่งสารเคมีชีวภาพต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

เอกสารอ้างอิง

Blunt J.W., Copp, B. R., Muro, M. H. G., Northcote, P. T., and Prinsep, M. R. 2003: Marine natural products., **Nat. Prod. Rep., *20*** : 1-48.

Crispino, A, Guilio A.D., Rosa, D.S., and Strazzullo, G., 1989, A new bioactive derivative of avarol from the marine sponge *Dysidea avara*, **J. Nat. Prod. 52(3):646-648**

Feng J., Keilly, M., Hamann, M.T., 2002, 26-Nor-25-isopropyl-ergosta-5,7,22*E*-trien-3β: a C_{29} sterol from the sponge Agelas sceptrum from Jamaica, **Steroids 67 (9): 743-747.**

Giner J.L., Gunasekera,, S.P., Pomponi, S.A., Sterols of the marine sponge *Petrosia weinbergi*; Implication for the absolute configurations of the antiviral orthoesterols and weinbersterols, **Steroids 64 (12);820-824**

Guella G., Mancini I., Zibrowirus H., and Petietra F., 1988, Novel Aplysinopsin-Type Alkaloids from Scleractinian Corals of the Family Dendrophylliidae of the Mediterranean and the Philippines. Configurational-assignment criteria, stereospecific synthesis, and photoisomerization, **Helv.Chim.Acta. 71: 773-781.**

Hirsch S., Rudi A., and Kashman Y., New avarone and derivative from the marine sponge *Dysidea cinera* **J. Nat. Prod, 54(1); 92-97**

Kondracki, M.L., Guyot, M., 2004, Biologically active quinine and hydroquinone sesquiterpenoids from the sponge *Semenospongia* sp. **Tetrahedron 45(7): 1995-2000**

Minale L.,Riccio, H., and Sodano, G., 1974, Avarol, A novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearrage drimane skeleton from sponge, *Dysidea avara*, **Tet. Lett. 38:3401-3404**

Mitome H., Nagasawa , T.,Miyaoka H., Yamada, Y., Van Soest, R.W.M., 2002, Dactyloquinone C, D and E novel sesquiterpenoid quinines, from the Okinawan marine sponge, *Dactylospongia elegant*, **Tetrahedron, 58: 1693-1696**

Munro, H.M.G. *et al*, 1999: The discovery and development of marine compounds with Pharmaceutical potential, **J. Biotech. 70: 15 – 25**

Nakamura M., Suzuki A., Nakatani M., Fuchikami T., Inoue M., Katoh T.,2002, An efficient synthesis of (+)-aureol via boron trifluoride etheterate-promoted rearrangement of (+)-aurenarol, **Tet. Lett. 39 (43): 6929-6932.**

Nakatani M., Nakamura M., Suzuki A., Fuchikami T., Inoue M., and Katoh T., 2003, Enantioselective total synthesis of (+)-aureol via a $BF_3.Et_2O$-promoted rearangemant/cyclization reaction of (+) aureole, **ARKIVOC. 8: 45-57**

PatentStorm,1993, US Patent 5204367-Novel antiviral and anti-leukemia terpene hydroquinones and method of use. **US Patent 20: 1-19**

Paul, V.J. and Pauglisi, 2004 : Chemical mediations among marine organisms, **Nat. Prod. Rep.,** 21: 189 – 209.

Pedpradab, S., Edrada, R.A., Ebel, R., Wray, V. and Proksch, P. 2004: New β-carboline alkaloids from the Andaman Sea spone *Dragmacidon* sp. **J. Nat. Prod.** 67 : 2113 - 2119

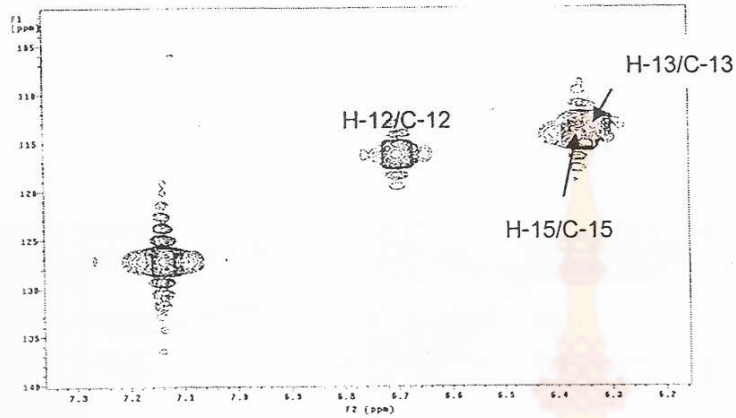
Shen Y.C., Liaw C.C., Ho J.R., Khalil A.T. and Kuo Y.H., 2006, Novel antiviral and antitimor terpene hydroquinones and method of use, **Nat. Prod. Res, 20(6): 578-585.**

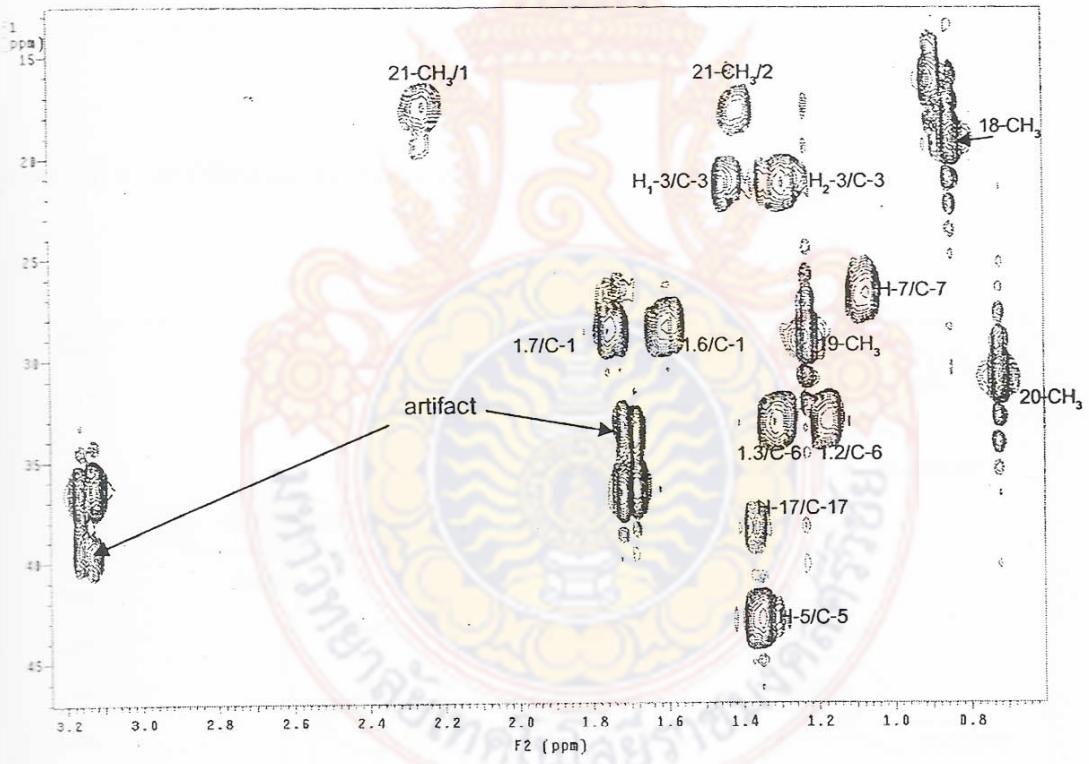
Suwanborirux, K.,1996 : Thai **marine organisms - challenging source of bioactive compounds : in current advances in natural products research, the third NRCT-JSPS joint seminar** 27-29 November 1996, Faulty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand : 24 -32

Tasdemir D., Bugni T., Mangalindan C.C., Concepcio′n, Harper M.K., Ireland, C.M.,2002, Cytotoxic bromoindole derivative and terpenes from the Philippine marine sponge *Smenospongia* sp., **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen: 914-921.**

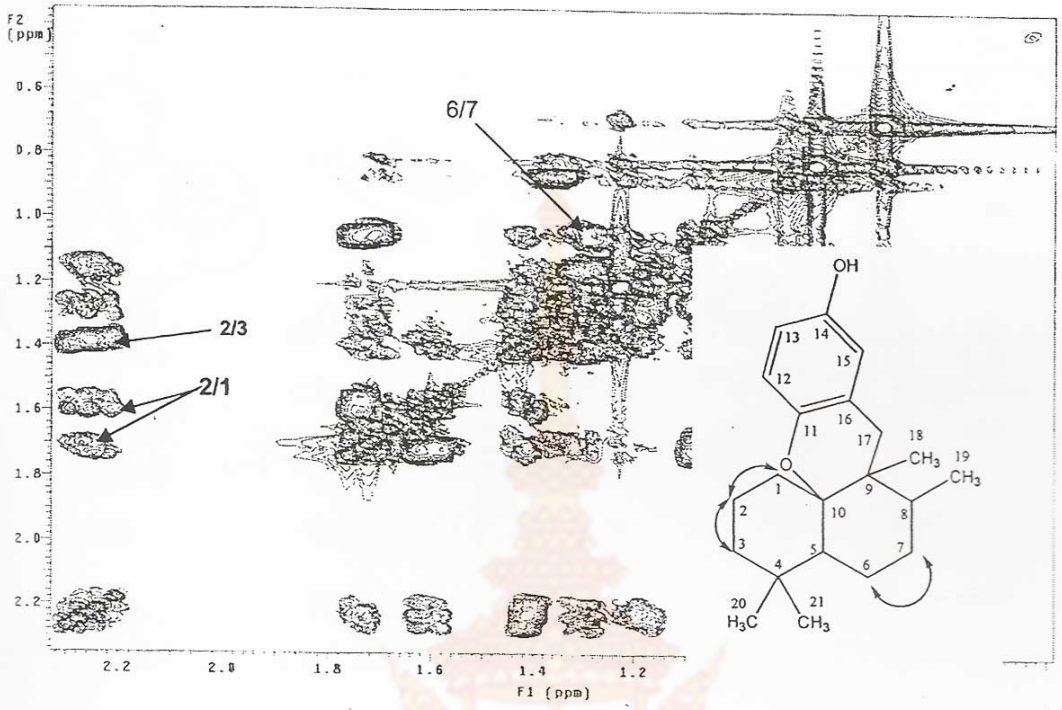
Urban S., and Capon J., 1994, Marine Sesquiterpene Quinones and Hydroquinones: Acid-Catalyzed Rearrangements and Stereochemical Investigations, **Aust. J. Chem. 47(6):1023-1029.**

ภาคผนวก

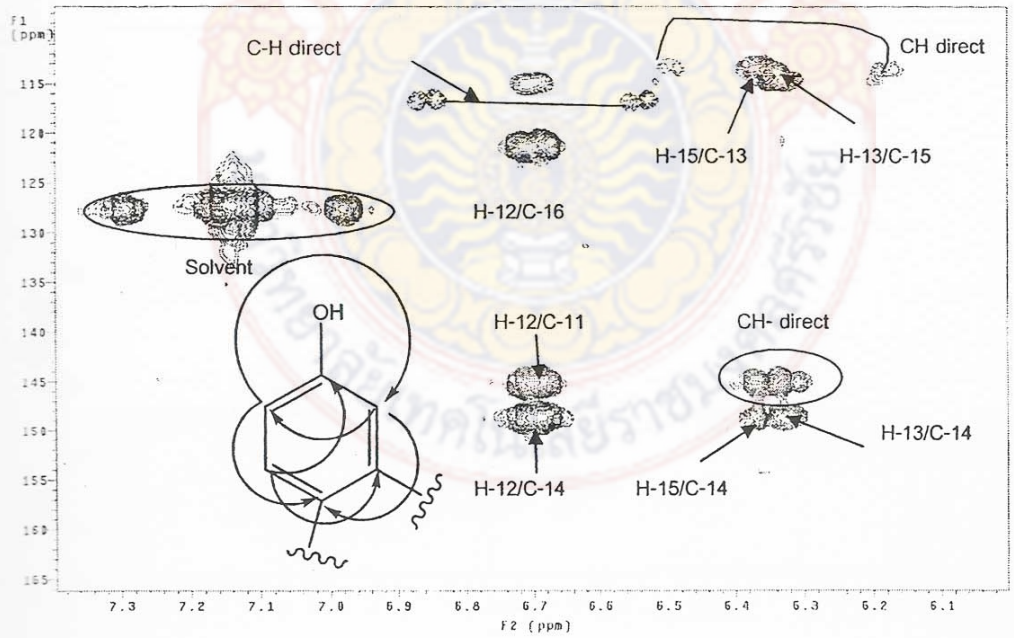




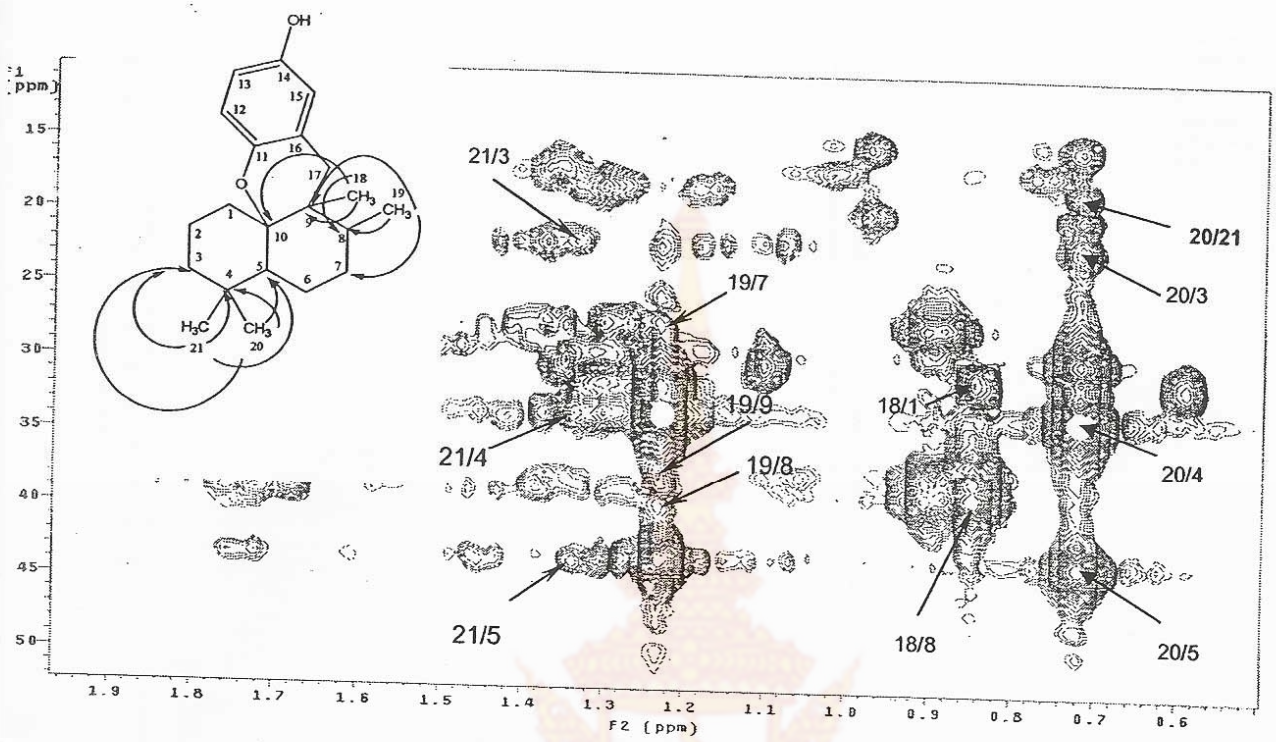
รูปผนวกที่ 1 ตัวอย่างการกำหนดการเข้าคู่กันของ C-H อะตอมภายในโมเลกุล (HMQC spectrum)



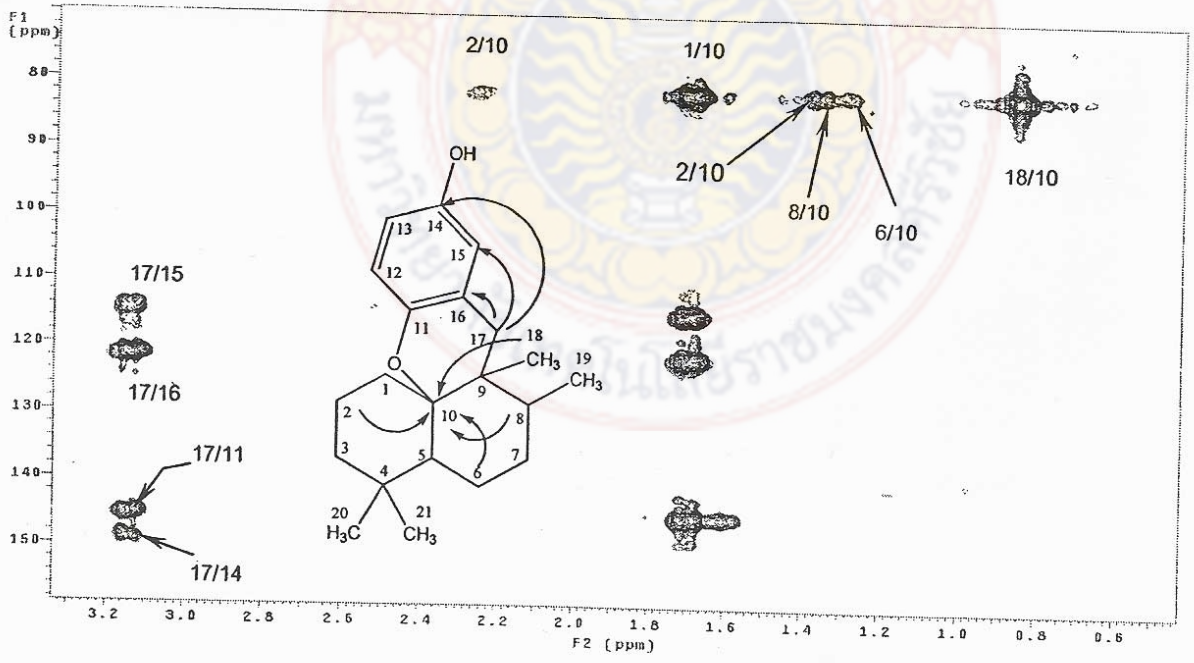
รูปผนวกที่ 2 การใช้เทคนิค H-H COSY เชื่อมต่อตำแหน่ง 1-3 และ 6,7



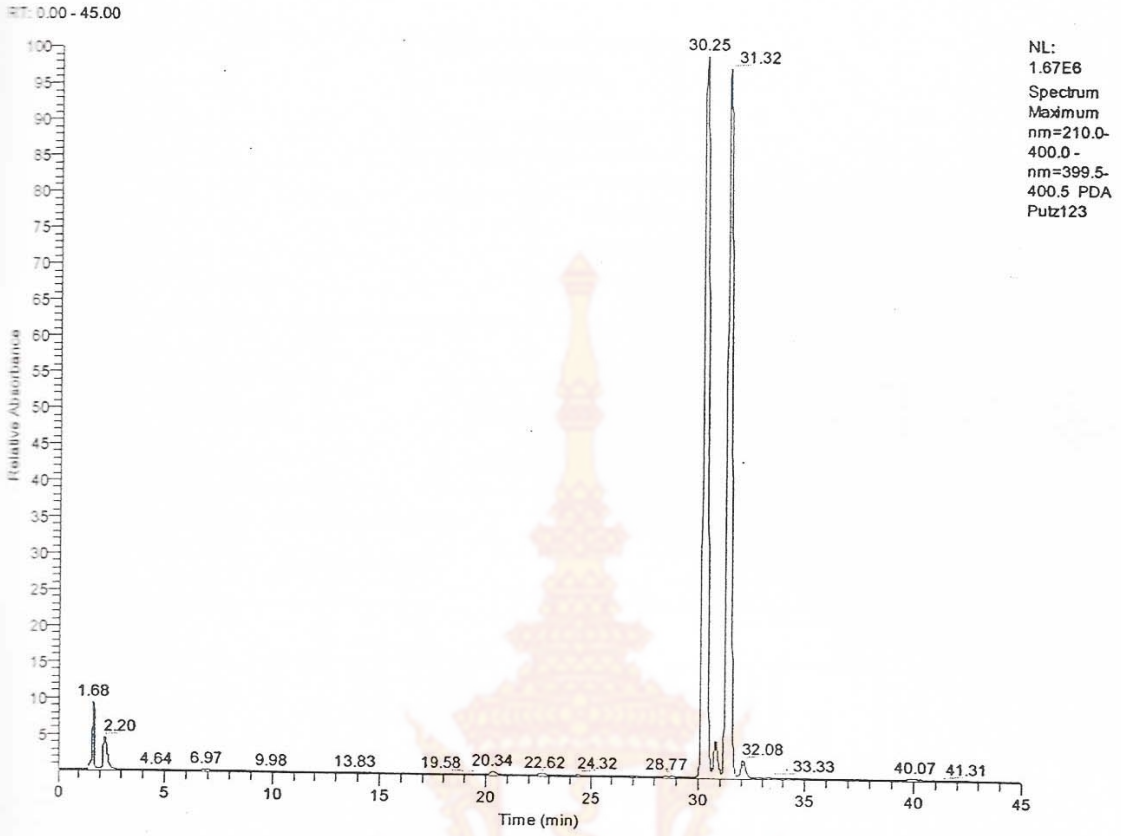
รูปผนวกที่ 3 HMBC correlation ของวงแหวนอะโรมาติก



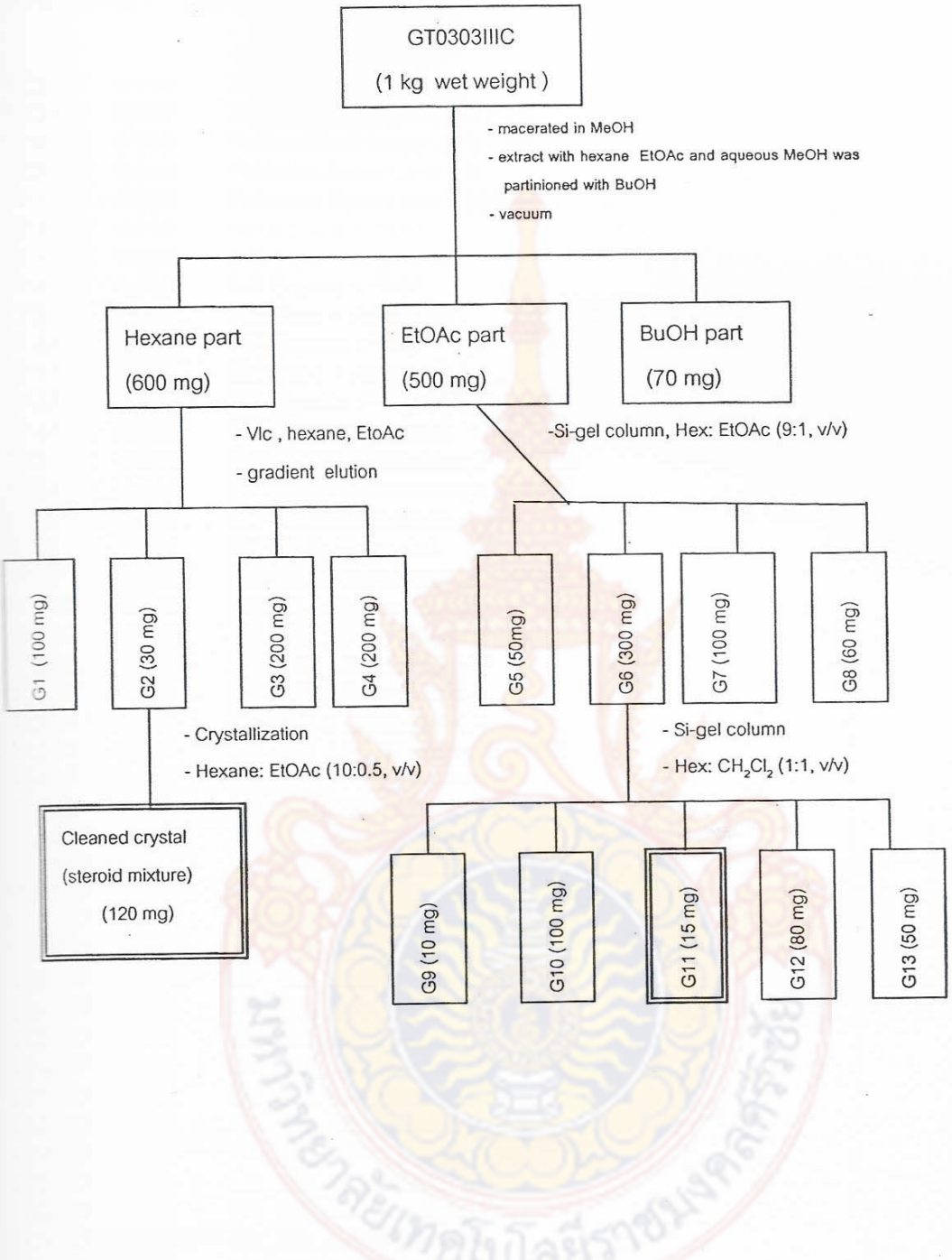
รูปผนวกที่ 4 การกำหนดตำแหน่งเมทิลฟังก์ชัน ($-CH_3$)



รูปผนวกที่ 5 การเชื่อมต่อระหว่างชิ้นส่วนอะลิฟาติกและอะโรมาติกรวมทั้ง key correlation ที่ใช้กำหนดตำแหน่ง C-10



รูปผนวกที่ 6 HPLC chromatogram ของสิ่งสกัดในชั้นเอทิลอะซีเตต



แผนภาพผนวกที่ 1 ขั้นตอนการสกัดแยกสารออกฤทธิ์

ตารางผนวกที่ 1 สภาวะเครื่อง HPLC

17:33:27	0.000	Temperature.Nominal = 20
17:33:27	0.000	Temperature.LowerLimit = 10
17:33:27	0.000	Temperature.UpperLimit = 30
17:33:27	0.000	Pressure.LowerLimit = 5
17:33:27	0.000	Pressure.UpperLimit = 350
17:33:27	0.000	%A.Equate = "%A"
17:33:27	0.000	%A.Type = Automatic
17:33:27	0.000	%B.Equate = "%B"
17:33:27	0.000	%B.Type = Automatic
17:33:27	0.000	%C.Equate = "%C"
17:33:27	0.000	%C.Type = Automatic
17:33:27	0.000	%D.Equate = "%D"
17:33:27	0.000	%D.Type = Automatic
17:33:27	0.000	3DFIELD.MaxWavelength = 595.2
17:33:27	0.000	3DFIELD.MinWavelength = 200.0
17:33:27	0.000	3DFIELD.BunchWidth = 1.9
17:33:27	0.000	3DFIELD.Step = 0.5
17:33:27	0.000	3DFIELD.RefWavelength = 600.0
17:33:27	0.000	3DFIELD.RefBandwidth = 1.9
17:33:27	0.000	UV_VIS_1.Wavelength = 235
17:33:27	0.000	UV_VIS_1.Bandwidth = 1
17:33:27	0.000	UV_VIS_1.Step = Auto
17:33:27	0.000	UV_VIS_1.Average = On
17:33:27	0.000	UV_VIS_1.RefWavelength = 600
17:33:27	0.000	UV_VIS_1.RefBandwidth = 1
17:33:27	0.000	UV_VIS_2.Wavelength = 254
17:33:27	0.000	UV_VIS_2.Bandwidth = 1
17:33:27	0.000	UV_VIS_2.Step = Auto
17:33:27	0.000	UV_VIS_2.Average = On
17:33:27	0.000	UV_VIS_2.RefWavelength = 600
17:33:27	0.000	UV_VIS_2.RefBandwidth = 1
17:33:27	0.000	UV_VIS_3.Wavelength = 280
17:33:27	0.000	UV_VIS_3.Bandwidth = 1
17:33:27	0.000	UV_VIS_3.Step = Auto
17:33:27	0.000	UV_VIS_3.Average = On
17:33:27	0.000	UV_VIS_3.RefWavelength = 600
17:33:27	0.000	UV_VIS_3.RefBandwidth = 1
17:33:27	0.000	UV_VIS_4.Wavelength = 340
17:33:27	0.000	UV_VIS_4.Bandwidth = 1
17:33:27	0.000	UV_VIS_4.Step = Auto
17:33:27	0.000	UV_VIS_4.Average = On
17:33:27	0.000	UV_VIS_4.RefWavelength = 600
17:33:27	0.000	UV_VIS_4.RefBandwidth = 1
17:33:27	0.000	UV.Autozero

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

17:33:27	0.000	Flow = 1.000
17:33:27	0.000	%B = 10.0
17:33:27	0.000	%C = 0.0
17:33:27	0.000	%D = 0.0
17:33:27	0.000	Wait Ready
17:33:29	0.000	Wait finished
17:33:29	0.000	Inject
17:33:29	0.000	Injecting from vial position RA3.
17:33:29	0.000	Injection Volume is 20.00 ดL.
17:33:29	0.000	Waiting for inject response on ASI100InjectState.
17:34:06	0.000	Got inject response
17:34:06	0.000	3DFIELD.AcqOn
17:34:06	0.000	UV_VIS_1.AcqOn
17:34:06	0.000	UV_VIS_2.AcqOn
17:34:06	0.000	UV_VIS_3.AcqOn
17:34:06	0.000	UV_VIS_4.AcqOn
17:34:06	0.000	Flow = 1.000
17:34:06	0.000	%B = 10.0
17:34:06	0.000	%C = 0.0
17:34:06	0.000	%D = 0.0
17:39:06	5.000	%B Gradient Start = 10.0, End = 100.0, Duration = 30.000
18:09:06	35.000	%B = 100.0
18:19:06	45.000	%B Gradient Start = 100.0, End = 10.0, Duration = 5.000
18:24:06	50.000	%B = 10.0
18:34:06	60.000	3DFIELD.AcqOff
18:34:06	60.000	UV_VIS_1.AcqOff
18:34:06	60.000	UV_VIS_2.AcqOff
18:34:06	60.000	UV_VIS_3.AcqOff
18:34:06	60.000	UV_VIS_4.AcqOff
18:34:06	60.000	Flow = 1.000
18:34:06	60.000	%B = 10.0
18:34:06	60.000	%C = 0.0
18:34:06	60.000	%D = 0.0

รายละเอียดสภาวะเครื่อง GCMS

- Inlet temperature: 250^{o}C, Helium carrier flow 1.0 ml/min
- Oven initial temperature 230^{o}C for 1 minute
- Ramp to 325^{o}C for 10 minute at 10^{o}C/minute
- Column: Rtx-5MS, 30 meters length, film thickness 0.25 µm, ID 0.25 mm
- Mass spectrometer: EI mode
  - Acquisition mode: Scan 35-500 amu
  - Solvent delay time: 3.0 minute
  - Tranfer line temperature: 325 ^{o}C

ตารางผนวกที่ 2 บันทึกการเก็บตัวอย่างฟองน้ำภาคสนาม

Sample No.	Location	Depth[m]	Abundance	Habitat	Secretion	Colour (inner-outer)	Texture	Frozen material
GT-02-28I A	MUK	3	rare	On rocks and bivalves	No	Purple-beige	Rough, strong spicules	medium
GT-02-28I B	MUK	3-5	abundant	On rocks, sand	No	Transparent-blue	Smooth	medium
GT-02-28II A	MUK	3-5	abundant	Sand	No	Orange-orange	Smooth	medium
GT-02-28IIB	MUK	1-2	abundant	Rocks, encrusting	No	Brilliant blue-light blue	Smooth	All extracted
GT-02-28IIC	MUK	6	abundant	Rocks, encrusting	Little	Beige-geige	Strong fibres	medium
GT-02-28IID	MUK	6	abundant	Rocks, encrusting	Little	Pale grey-white	Rough, strong spicules	medium
GT-02-28III A	MUK	1.2	abundant	Sand	No	Green		All extracted
GT-03-01I A	Laoliang	5.5	abundant	rocks	No	Brown/black	sticky	All extracted
GT-03-01IB	Laoliang	6	rare	Rocks and on soft coral	No	Blue-light blue	smooth	medium
GT-03-01I A	Laoliang	7	medium	Rocks, encrusting	No	Brown-beige	Rough	All extracted
GT-03-01IIB	Laoliang	4.3	rare	Rocks	No	Purple-beige	Rough	medium
GT-03-01IIC	Laoliang	1/5	rare	Encrustring on rock, on sand (party cover)	No	Brilliant red-red	Rough	medium
GT-03-01II D	Laoliang	2	rare	Rocks, encrusting	No	Brown/yellow-beige	smooth	All extracted
GT-03-01IIE	Laoliang	1	rare	Rocks, encrusting	No	Blue-blue	smooth	All extracted

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

GT-03-01IIF	Laoliang	3-4	medium	Rock, between corals	Yes	Green-green	Smooth; finger-like	medium
GT-03-02IA	Laoliang	10	medium	Rock, covered with sediment	No	Orange-orange	smooth	Big amount
GT-03-02IB	Laoliang	10	medium	Sand	Yes	Plink-plink	Tubes above sediment, remaining part covered	Big amount
GT-03-02IC	Laoliang	10	rare	On rock and bivalves	No	Black/brown-beige	Smooth	Big amount
GT-03-02 ID	Laoliang	10	medium	overgrows corals	No	Beige-beige	Many spicules, fragile	Big amount
GT-03-02IE	Laoliang	1.5	abundant	on sand, dead coral	No	Green/brown with white stripes	Hard tissue	All extracted
GT-03-02IF	Laoliang	1.5	abundant	Sand	No	Green	Soft and fragile	All extracted
GT-03-02IA	Laoliang	3	rare	Buried in sand	No	Plink-plink	Finger-like structure out of sediment, remaining part buried	Extremely little, All
GT-03-02IIIA	Laoliang	2-3	abundant	Encrusting, on rock and barnacles	No	Violet-violet	Smooth	All extracted
GT-03-02IIIB	Laoliang	2-3	abundant	Rocks, encrusting	No	White-white	Smooth	Extremely little, All
GT-03-02IIIC	Laoliang	7	rare	On rocks and bivalves, encrusting	No	Brown/purple- beige	Smooth	All extracted
GT-03-02 IIID	Laoliang	9	rare	Rocks	No	Beige/pink-beige	Rough, fragile	Little remainder

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

GT-03-02 IIIE	Laoliang	5	medium	Rocks	No	Green/white/pink-white	Smooth	medium
GT-03-02 IV A	Laoliang	1.5	medium	Rocks, encrusting	No	Violet-beige	Smooth	Extremely little, All
GT-03-02 IV B	Laoliang	2	medium	Rocks, encrusting	No	Red/yellow	Smooth	Extremely little,
GT-03-02 IV C	Laoliang	2	medium	Rocks, encrusting	No	Green/red/brown-green/yellow	Rough	All extracted
GT-03-02 IV D	Laoliang	3-4	abundant	Rocks, encrusting	No	Black/brown-black/brown	Smooth	Little remainder
GT-03-02 IV E	Laoliang	2	abundant	Rocks, encrusting	No	Yellow/green-beige	Smooth	All extracted
GT-03-03 IA	Laoliang	4	rare	Rock, shadow	No	White-white	fragile	medium
GT-03-03 IB	Laoliang	2-4	medium	Rocks, encrusting	No	Yellow/brown-beige	Smooth	medium
GT-03-03 IA	Laoliang	2-4	abundant	Rocks, sand	No	Yellow/brown-yellow	Round like a ball, covered by sediment	medium
GT-03-03 IB	Laoliang	3-5	abundant	Rocks, encrusting, covered by sediment	Extreme	Yellow/orange-orange	Rough	Big amount
GT-03-03 IC	Laoliang	5.3	abundant	Rocks, encrusting	No	Brown-beige	Rough, sticky	Big amount
GT-03-03 ID	Laoliang	5	rare	Rock	No	Black/brown-beige	Smooth	All extracted
GT-03-03 IE	Laoliang	4.3	rare	Rock	No	Brown/red-beige	Rough	All extracted
GT-03-03 IF	Laoliang	4	rare	rock	No	Purple/violet-purple/violet	soft	All extracted