

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ข้อมูลการเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

จากการเก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันตก บริเวณเกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี ในช่วงระหว่างเดือนมกราคม 2553 – กุมภาพันธ์ 2553 ได้ตัวอย่างฟองน้ำทั้งสิ้นจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นฟองน้ำ order Haplosclerida จำนวน 1 ตัวอย่าง, Hadromerida จำนวน 2 ตัวอย่าง, order Thorectida จำนวน 1 ตัวอย่าง และorder Dictyoceratida จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)



Spheciospongia congenera (MUS-A-01)



Ircinia mutans (MUS-B-10)



Ircinia mutans (MUS-B-11)



Haliclona cymaeformis (TAN-A-01)



Cervicornia cuspidifera (TAN-D-01)



Cacospongia sp. (TAN-E-03)

ภาพที่ 2 ตัวอย่างฟองน้ำทะเลจากอ่าวไทยฝั่งตะวันตก บริเวณเกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี

ส่วนของตัวอย่างฟองน้ำใน phase ที่ 1 ซึ่งเก็บบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก บริเวณจังหวัด ชลบุรี ระยอง และจันทบุรี ในช่วงระหว่างเดือนมีนาคม 2548 - กุมภาพันธ์ 2549 ได้นำมา ทำการศึกษาสารต้านเชื้อวัณโรคทั้งสิ้นจำนวน 4-5 ตัวอย่าง ที่ให้ค่า MIC ที่ไม่เกิน 100 µg/ml ได้แก่ ฟองน้ำ *Smenospongia* sp., *Cathria reinwardti*, *Ircinia* sp., *Ircinia mutans* และ *Iotrochota baculifera* (ตารางที่ 2)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ (anti-tuberculosis activity)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากฟองน้ำทะเลในชั้น EtOAc จำนวน 6 ตัวอย่างของอ่าวไทยฝั่งตะวันตก และ 8 ตัวอย่างของอ่าวไทยฝั่งตะวันออก มีผลการ ทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

- การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคในส่วนของสารสกัดหยาบจากฟองน้ำใน phase ที่ 1

เป็นการทดลอง *in vitro* โดยยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ด้วยวิธี Microplate Alamar Blue Assay (MABA) การทดสอบนี้ทำที่ความเข้มข้น 100-200 µg/ml จาก ผลการทดสอบสารสกัดชั้น EtOAc จากฟองน้ำจำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างแสดง ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ (MIC) 100-200 µg/ml (ตารางที่ 2)

- การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดหยาบจากฟองน้ำจากอ่าวไทยฝั่งตะวันตก

ในปัจจุบันทางห้องปฏิบัติการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ BIOTEC ได้เปลี่ยนการ ทดลอง *in vitro* โดยยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ด้วยวิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFMA) การทดสอบนี้ทำที่ความเข้มข้น 50 µg/ml จากผลการทดสอบสารสกัดชั้น EtOAc ของฟองน้ำจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ พบว่าสารสกัดจาก ฟองน้ำในชั้น EtOAc ทุกตัวไม่แสดงฤทธิ์ในการทดสอบนี้ (ตารางที่ 1)

จากผลการทดสอบที่ได้นี้ ทางผู้วิจัยได้สอบถามไปยังผู้ทดสอบถึงเทคนิคที่แตกต่างกันระหว่าง MABA และ GFMA ทางผู้ทดสอบได้แจ้งว่าทั้ง 2 เทคนิคให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกัน โดยดูได้ จากผลของ control และมีการรายงานผลของทั้ง 2 เทคนิคว่าใช้แทนกันได้ จากข้อมูลทำให้ผู้วิจัย พิจารณาเป็น 2 ประเด็น

1. ผลการทดสอบที่ต่างกันนี้อาจจะมาจากความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบต่างกันถึง 50% ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้ ทำการทดสอบสารสกัดจากฟองน้ำฝั่งตะวันตกที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/ml อีกครั้ง ซึ่งขณะนี้ยังรอผลการทดสอบ

2. อาจจะเป็นไปได้ที่ habitat ของฟองน้ำในอ่าวไทยฝั่งตะวันตก (เกาะสมุย) สะอาดกว่า หรือมีจุลินทรีย์ทะเลในบริเวณนั้นน้อยกว่า ทำให้ฟองน้ำในแถบนั้นไม่ผลิตสาร chemical defense ขึ้นมา หรือผลิตมาเพียงเล็กน้อย ทำให้ความรุนแรงของสารสกัดไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ระดับความ เข้มข้นต่ำ ซึ่งการผลิตสาร secondary metabolite ของฟองน้ำนั้นมาจากหลาย factor เช่น ความเค็ม กระแสน้ำ pH และจุลินทรีย์ เป็นต้น

ตารางที่ 1 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันตก หมู่เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

รหัส	Order	ชื่อวิทยาศาสตร์	วันที่เก็บ	สถานที่เก็บ	ความลึก (เมตร)	น้ำหนักสด	สารสกัดหยาบ EtOAc (กรัม)	Anth-TB µg/ml
TAN-A-01	Haplosiderida	<i>Halidona cymaeformis</i>	29 ม.ค. 53	เกาะแตนทิศตะวันตก	1.5-2.0	1.24 kg	5.49	inactive
TAN-D-01	Hadromerida	<i>Cervicornia cuspidifera</i>	30 ม.ค. 53	อ่าวออก เกาะแตนทิศตะวันออก	1.5-2.0	1.3 kg	3.55	inactive
TAN-E-03	Thorectidae	<i>Cacospongia</i> sp.	2 ก.พ. 53	อ่าวหัวไทร เกาะแตนทิศเหนือ	8.0-13.0	625 gm		inactive
MUSA-A-01	Hadromerida	<i>Sphaciospongia congenera</i>	31 ม.ค. 53	เกาะมดส้มทิศเหนือ	1.5-3.0	860 gm	8.1102	inactive
MUSB-10	Dictyoceratida	<i>Ircinia mutans</i>	1 ก.พ. 53	เกาะมดส้มทิศตะวันตกเฉียงเหนือ	6	2.6 kg	8.4992	inactive
MUSB-11	Dictyoceratida	<i>Ircinia mutans</i>	1 ก.พ. 53	เกาะมดส้มทิศตะวันตกเฉียงเหนือ	6	550 gm	5.6791	inactive

MIC of positive control; Rifampicin=0.00312-0.0250 µg/ml; Streptomycin=0.156-0.313 µg/ml; Isoniazide=0.0234-0.0468 µg/ml;

Ofloxacin=0.391-0.781 µg/ml; Ethambutol=0.234-0.469 µg/ml

วิธีทดสอบ: Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA) ต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

ความเข้มข้นที่ทดสอบ : 50 µg/ml



ตารางที่ 2 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

รหัส	Order	ชื่อวิทยาศาสตร์	วันที่เก็บ	สถานที่เก็บ	ความลึก (เมตร)	น้ำหนักสด	สารสกัดหยาบ EtOAc (กรัม)	Anti-TB µg/ml
U 48-4	Poedilosclerida	<i>Coelocarteria singaporensis</i>	มี.ค. 2548	เกาะลัน จ. ชลบุรี	12	1.24 kg	5.49	+
U 48-10	Poedilosclerida	<i>Iotrochota baculifera</i>	มี.ค. 2548	เกาะลัน จ. ชลบุรี	3-5	1.3 kg	3.55	100
U 48-15	Dictyoceratida	<i>Smenospongia</i> sp.	พ.ค. 2548	เกาะลัน จ. ชลบุรี	20	860 gm	8.1102	100
U 48-17	Dictyoceratida	<i>Ircinia</i> sp.	พ.ค. 2548	เกาะลัน จ. ชลบุรี	3	2.6 kg	8.4992	+
U 48-20	Dictyoceratida	<i>Dysidea</i> sp.	พ.ค. 2548	แหลมสาร จ. ชลบุรี	2	550 gm	5.6791	+
U 48-22	Poedilosclerida	<i>Biemna fortis</i>	ต.ค. 2548	เกาะกูด จ. ระยอง	10	950 gm	0.8795	+
U 48-24	Poedilosclerida	<i>Cathira reinwardti</i>	ต.ค. 2548	เกาะเสม็ด จ. ระยอง	3-10	610 gm	12.543	100
U 48-26	Dictyoceratida	<i>Ircinia mutans</i>	ก.พ. 2549	หาดเจ้าหลาว จ. จันทบุรี	6	1.45 kg	6.22	100

MIC of positive control; Rifampicin=0.0095 µg/ml; Kanamycin=2.5 µg/ml; Isoniazide=0.0025-0.05 µg/ml

วิธีทดสอบ: Microplate Alamar Blue Assay (MABA) ต่อเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

ความเข้มข้นที่ทดสอบ : 100-200 µg/ml

(+) หมายถึง ผลการทดสอบ active ในระดับความเข้มข้นไม่เกิน 200 µg/ml

ผู้วิจัยจึงทำการค้นหาสารต้านเชื้อวัณโรคจากฟองน้ำทะเล บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ที่มีค่า MIC ไม่เกิน 200 µg/ml ได้แก่ *Smenospongia* sp., *Ircinia mutans*, *Cathria reinwardti* และ *Iotrochota baculifera*

- ผลการแยกสารประกอบจากฟองน้ำ *Smenospongia* sp. (U 48-15-1)

1. ผลการแยกสารสกัดหยาบชั้น EtOAc ด้วยวิธี Si gel column chromatography โดยระบบ gradient eluent system (เก็บ fraction ละ 200 ml)

Eluent systems	Fraction
Petrol.- CHCl ₃ 60:40	1-13
Petrol.- CHCl ₃ 40:60	14-28
Petrol.- CHCl ₃ 20:80	29-40
CHCl ₃	41-47
CHCl ₃ - MeOH (98:2)	48-63
CHCl ₃ - MeOH (95:5)	64-80
CHCl ₃ - MeOH (90:10)	81-91
CHCl ₃ - MeOH (70:30)	92-in process

รวม fractions ที่แยกได้ทั้งสิ้น 20 fractions บนพื้นฐานของ TLC

2. ผลการแยกสารให้บริสุทธิ์ (Isolation & Purification)

จากการแยกสารสกัดจากฟองน้ำ *Smenospongia* sp. ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี ได้แก่ Preparative TLC, column chromatography และ HPLC ในแต่ละ fraction ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลสารประกอบที่แยกจากฟองน้ำ *Smenospongia* sp.

Fraction	pure compounds	สถานะ
U48-15-1/28-31	U48-15-1/28-31/1	วิเคราะห์โครงสร้าง NMR, MS
U48-15-1/32-35	U48-15-1/32-35/1	วิเคราะห์โครงสร้าง NMR, MS
U48-15-1/41-50/5-8	U48-15-1/41-50/5-8/1	วิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR
	U48-15-1/41-50/5-8/2	วิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR
U48-15-1/41-50/12-18	U48-15-1/41-50/12-18/1	วิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR
U48-15-1/41-50/19-21	U48-15-1/41-50/19-21/1	วิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR
U48-15-1/51-54	U48-15-1/51-54/1	วิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR
U48-15-1/55-58	U48-15-1/55-58/1	"
	U48-15-1/55-58/2	"
U48-15-1/59-64	U48-15-1/59-64/5	"
U48-15-1/68/1-2	U48-15-1/68/3	"

จากการแยกสารที่ได้ อาจจะเป็นสารตัวเดียวกันหรือกลุ่มเดียวกัน หรืออาจจะเป็นสารประกอบตัวใหม่ ซึ่งยังอยู่ในขั้นตอนการหาโครงสร้าง จะได้ทำการรายงานโครงสร้างในครั้งต่อไป จากนั้นจะทำการประเมินฤทธิ์ด้านเชื้อวัณโรคต่อไป