อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการเก็บรักษาตัวอย่างฟองน้ำ

1.1 ขวดเก็บตัวอย่างขนาดเล็กพร้อมฝาปิด

1.2 กระดาษ label

2. อุปกรณ์สำหรับการสกัดสารสกัดหยาบ

2.1 เครื่องชั่งน้ำหนัก

2.2 homogenizer

2.3 เครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator)

2.4 vial สำหรับใส่สารสกัดหยาบ

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบ และการแยกสารประกอบ

1. acetone
2. n-buthanol (n-BuOH)
3. chloroform ($CHCl_3$)
4. 95% ethanol & ethanol (commercial grade) (EtOH)
5. ethyl acetate (EtOAc)
6. methanol (MeOH)
7. Petroleum ether 60-80 °C
8. Formic acid (HCOOH)

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างฟองน้ำ

การเก็บตัวอย่างฟองน้ำในการวิจัยในปีที่ 1 นี้จะทำการเก็บร่วมกันทุกโครงการ โดยจะทำการเก็บจากบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันตก บริเวณเกาะสมุย จังหวัสุราษฎร์ธานี โดยจะเก็บด้วยวิธี scuba diving จำนวนประมาณ 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างฟองน้ำที่เก็บได้จะถูกแช่แข็งใน deep freezer (-20°C ถึง -40°C) จนกระทั่งนำมาสกัด และตัวอย่างฟองน้ำที่ได้ทำการสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคจากโครงการใน phase ที่ 1 บางส่วน ซึ่งเป็นฟองน้ำจากอ่าวไทยฝั่งตะวันออก

2. การสกัดสารสกัดหยาบ

-นำตัวอย่างฟองน้ำที่แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำความสะอาดฟองน้ำโดยแยกหินสิ่งมีชีวิตอื่นๆหรือสิ่งเจือปนออก ชั่งน้ำหนักสด

-ตัดตัวอย่างฟองน้ำเป็นชิ้นเล็กๆ ทำการ homogenize ด้วยเอทธานอล ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม . จากนั้นนำไปกรอง และนำส่วนของสารละลายแอลกอฮอล์ที่กรองได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยการระเหย

-สกัดส่วน solid residue ด้วยเอทธานอลอีก 2 ครั้ง กรองและรวมในส่วนของสารละลายแอลกอฮอล์ จากนั้นนำไประเหยให้เข้มข้นขึ้น แช่ส่วนของ solid residue ด้วย acetone กรอง นำไประเหยให้เข้มข้นขึ้น จากนั้นนำไปรวมกับส่วนที่ได้จากการแช่แอลกอฮอล์

-ทำการ partition สารที่ระเหยข้างต้นด้วย Ethyl acetate (EtOAc-H_2O) (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) รวมชั้น EtOAc แล้วจึงนำไประเหยแห้งจะได้ **"สารสกัดหยาบชั้น EtOAc "** ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ

3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

-แบ่งสารสกัดหยาบชั้น EtOAc ไปตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (antituberculosis assay) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซล (Cytotoxicity)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคจะทำการทดสอบกับเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ด้วยวิธี Green fluorescent protein microplate assay (GFPMA) และทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซล (cytotoxicity test) ของสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค โดยการตรวจสอบฤทธิ์ในส่วนนี้จะส่งไปทดสอบที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

4. การแยกสารประกอบเคมีให้บริสุธิ์ (Isolation and Purification)

ฟองน้ำ *Smenospongia* sp. (U 48-15-1)

4.1 ตัวอย่างฟองน้ำ (Sample collection)

ฟองน้ำ *Smenospongia* sp. ถูกเก็บโดยวิธี scuba diving ที่ระดับความลึก 20 เมตร บริเวณเกาะริ้น หมู่เกาะล้าน จังหวัดชลบุรี ในเดือนพฤษภาคม 2548 โดยมีน้ำหนักสด 860 กรัม ตัวอย่างสดที่เก็บได้จะถูกเก็บในน้ำแข็งในระหว่างการเก็บ และจะถูกนำไปแช่แข็งที่ –40 °C จนกระทั่งนำมาทำการทดลอง ตัวอย่างฟองน้ำชนิดนี้ถูกตรวจเอกลักษณ์โดย ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ และลงทะเบียนตัวอย่างไว้ที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

4.2 การสกัดสาร (Extraction)

4.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

ตัวอย่างสดของฟองน้ำ *Smenospongia* sp. (860 กรัม) ถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำแข็งละลาย ทำความสะอาดฟองน้ำและกำจัดสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆออก ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดตัวอย่างด้วย homogenizer และแช่ตัวอย่างด้วย Ethanol 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมากรองผ่านกระดาษกรอง นำ residue ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วย EtOH จากนั้นนำสารละลายแอลกอฮอลล์ที่กรองได้ไประเหย จนเหลือปริมาตรของสารละลายที่เป็นน้ำประมาณ 500 มิลลิลิตร

นำสารสะลายที่ได้ไปสกัดแยกส่วน (partition) ด้วย EtOAc ปริมาตร 700 มล. (x 3) รวมสารละลายชั้น EtOAc นำไประเหยแห้ง จะได้สารสกัดหยาบชั้น EtOAc ของ "U48-15-1" (15.6 กรัม) แบ่งสารสกัดหยาบชั้น EtOAc ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

4.2.2 การแยกสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบ U48-15-1 (15.6 กรัม) มาแยกสารด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟี (Si gel column chromatography) (น้ำหนักซิลิกาเจล 170 กรัม) ด้วยคอลัมน์ขนาด 5x50 ซม. โดยใช้ตัวพาแบบ gradient system จาก Petroleum Ether-$CHCl_3$, $CHCl_3$, $CHCl_3$-MeOH และ MeOH โดยเก็บ fraction ละ 200 มล. ทำการรวม fraction ด้วยพื้นฐานทาง TLC

4.2.3 การแยกสารประกอบให้บรสุทธิ์ (Isolation & Purifications)

Fraction U48-15-1/28-31 (163.8 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-15-1/28-31 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา petroleum ether : Chloroform : formic acid 2 : 8 : 0.1 (x 2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ "U48-15-1/28-31/1" นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-15-1/32-35 (632.3 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-15-1/32-35 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา petroleum ether : Chloroform : formic acid 2 : 8 : 0.1 (x 2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ "U48-15-1/32-35/1" นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-15-1/41-50 (392.5 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-15-1/41-50 ด้วยวิธี SiO_2 Column chromatography โดยใช้ระบบ gradient: Hexane:EtOAc:MeOH 70:28:2 (fractions 1-17); Hexane:EtOAc:MeOH 50:40:10 (fractions 18-25) และ MeOH (fractions 26-27) โดยเก็บ fraction ละ 100 มล. ทำการรวม fraction

Sub fraction U48-15-1/41-50/5-8

แยกสาร subfraction U48-15-1/41-50/5-8 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา $CHCl_3$ จะได้สารบริสุทธิ์ของ "U48-15-1/41-50/5-8/1" "U48-15-1/41-50/5-8/2" นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Sub fraction U48-15-1/41-50/12-18 และ U48-15-1/41-50/19-21

แยกสาร subfraction U48-15-1/41-50/12-18 และ U48-15-1/41-50/19-21 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา $CHCl_3$:MeOH 95:5 จะได้สารบริสุทธิ์ของ "U48-15-1/41-50/12-18/1" และ U48-15-1/41-50/19-21/1 นำไปหาโครงสร้างสารต่อไป

Fraction U48-15-1/51-54 (732.3 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-15-1/51-54 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา Chloroform:MeOH:formic acid 98:2:1 (x 2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ "U48-15-1/51-54/1" นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-15-1/55-58 (123.0 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-15-1/55-58 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา $CHCl_3$:MeOH:formic acid 98:2:1 (x2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ "U48-15-1/55-58/1 และ U48-15-1/55-58/2" นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-15-1/59-64 (146.1 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-15-1/59-64 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา $CHCl_3$:EtOAC:MeOH 80:1.5:0.5 (x2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ "U48-15-1/59-64/5" นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-15-1/68 (136.9 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-15-1/68 ด้วยวิธี ODS-column chromatography โดยใช้ระบบ gradient: MeOH-H_2O 70-100%, Chloroform-MeOH-H_2O 70:30:0.5 ระบบละ 200 มล. โดยเก็บ fraction ละ 10 มล. ทำการรวม fractions

Sub fraction U48-15-1/68/1-2 (9.2 mg)

แยกสาร subfraction U48-15-1/68/1-2 ด้วยวิธี HPLC โดยใช้ระบบ 20% MeOH-H_2O จะได้สารบริสุทธิ์ของ "U48-15-1/68/3" นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR