

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

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-butanol (n-BuOH)
3. chloroform (CHCl₃)
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

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

2. การสกัดสารสกัดหยาบ

-นำตัวอย่างฟองน้ำที่แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำความสะอาดฟองน้ำโดยแยกหินสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ หรือสิ่งเจือปนออก ชั่งน้ำหนักสด

-ตัดตัวอย่างฟองน้ำเป็นชิ้นเล็กๆ ทำการ homogenize ด้วยเอทานอล ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม . จากนั้นนำไปกรอง และนำส่วนของสารละลายแอลกอฮอล์ที่กรองได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยการระเหย

-สกัดส่วน solid residue ด้วยเอทานอลอีก 2 ครั้ง กรองและรวมในส่วนของสารละลาย แอลกอฮอล์ จากนั้นนำไประเหยให้เข้มข้นขึ้น แخذส่วนของ solid residue ด้วย acetone กรอง นำไประเหยให้เข้มข้นขึ้น จากนั้นนำไปรวมกับส่วนที่ได้จากการแช่แอลกอฮอล์

-ทำการ partition สารที่ระเหยข้างต้นด้วย Ethyl acetate (EtOAc-H₂O) (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) รวมชั้น EtOAc แล้วจึงนำไประเหยแห้งจะได้ “สารสกัดหยาบชั้น EtOAc ” ซึ่งนำหนักสารสกัดหยาบ

3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

-แบ่งสารสกัดหยาบชั้น EtOAc ไปตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (antituberculosis assay) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

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

4. การแยกสารประกอบเคมีให้บริสุทธิ์ (Isolation and Purification)

ฟองน้ำ *Smenospongia* sp. (U 48-15-1)

4.1 ตัวอย่างฟองน้ำ (Sample collection)

ฟองน้ำ *Smenospongia* sp. ถูกเก็บโดยวิธี scuba diving ที่ระดับความลึก 20 เมตร บริเวณเกาะรีน 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) ถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้น้ำแข็งละลาย ทำความสะอาดฟองน้ำและกำจัดสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆออก ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดตัวอย่างด้วย homogenizer และแช่ตัวอย่างด้วย Ethanol 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมารองผ่านกระดาษกรอง นำ residue ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วย EtOH จากนั้นนำสารละลาย

แอลกอฮอล์ที่กรองได้ไประเหย จนเหลือปริมาตรของสารละลายที่เป็นน้ำประมาณ 500 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปสกัดแยกส่วน (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) มาแยกสารด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Si gel column chromatography) (น้ำหนักซิลิกาเจล 170 กรัม) ด้วยคอลัมน์ขนาด 5x50 ซม. โดยใช้ตัวพาแบบ gradient system จาก Petroleum Ether-CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃-MeOH และ MeOH โดยเก็บ fraction ละ 200 มล. ทำการรวม fraction ด้วยพื้นฐานทาง TLC

4.2.3 การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ (Isolation & Purifications)

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 “aureol”

สารละลายสีน้ำตาล; ESI-MS m/z 315.2312 [M + H]⁺ (calcd. 315.2324 for C₂₁H₃₁O₂);

¹H NMR (360 MHz (CDCl₃)) : δ 6.58 (1H, d, J=8.7 Hz), 6.55 (1H, dd, J=8.7, 2.8 Hz), 6.47 (1H, d, J=2.8 Hz), 3.35 (1H, d, J=17.1 Hz), 2.08 (2H, m), 1.94 (1H, d, J=17.1 Hz), 1.79 (1H, dt, J=13.1, 4.0 Hz), 1.78 (1H, m), 1.65 (2H, m), 1.54 (1H, qd, J=13.6, 4.5 Hz), 1.42 (2H, m), 1.33 (1H, dm), 1.17 (1H, dm), 1.08 (3H, d, J=7.5 Hz), 1.04 (3H, s), 0.92 (3H, d, J=1.0 Hz), 0.76 (3H, s);

¹³C NMR (90 MHz (CDCl₃)) : δ 148.3 (s), 145.7 (s), 122.1 (s), 117.2 (d), 115.1 (d), 114.0 (d), 82.3 (s), 43.9 (d), 39.2 (d), 38.0 (s), 37.3 (t), 33.9 (t), 31.8 (q), 29.8 (q), 29.2 (t), 27.8 (t), 22.2 (t), 20.2 (q), 18.3 (t), 17.3 (q).



ฟองน้ำ *Iotrochota baculifera* (U 48-10-1)

4.1 ตัวอย่างฟองน้ำ (Sample collection)

ฟองน้ำ *Iotrochota baculifera* ถูกเก็บโดยวิธี scuba diving ที่ระดับความลึก 3-5 เมตร บริเวณเกาะล้าน จังหวัดชลบุรี ในเดือนมีนาคม 2548 โดยมีน้ำหนักสด 1.3 กิโลกรัม ตัวอย่างสดที่เก็บได้จะถูกเก็บในน้ำแข็งในระหว่างการเก็บ และจะถูกนำไปแช่แข็งที่ $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ จนกระทั่งนำมาทำการทดลอง ตัวอย่างฟองน้ำชนิดนี้ถูกตรวจเอกลักษณ์โดย ดร. สุเมตต์ ปุจฉาการ และลงทะเบียนตัวอย่างไว้ที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

4.2 การสกัดสาร (Extraction)

4.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

ตัวอย่างสดของฟองน้ำ *Iotrochota baculifera* (1.3 กก.) ถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำแข็งละลาย ทำความสะอาดฟองน้ำและกำจัดสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆออก ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดตัวอย่างด้วย homogenizer และแช่ตัวอย่างด้วย Ethanol 4 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมากรองผ่านกระดาษกรอง นำ residue ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วย EtOH จากนั้นนำสารละลาย แอลกอฮอล์ที่กรองได้ไประเหย จนเหลือปริมาตรของสารละลายที่เป็นน้ำประมาณ 700 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปสกัดแยกส่วน (partition) ด้วย EtOAc ปริมาตร 1,000 มล. (x 3) รวมสารละลายชั้น EtOAc นำไประเหยแห้ง จะได้สารสกัดหยาบชั้น EtOAc ของ “U48-10-1” (3.6 กรัม) แบ่งสารสกัดหยาบชั้น EtOAc ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค

4.2.2 การแยกสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบ U48-10-1 (3.6 กรัม) มาแยกสารด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Si gel column chromatography) (น้ำหนักซิลิกาเจล 4 กรัม) ด้วยคอลัมน์ขนาด 5x50 ซม. โดยใช้ตัวพาแบบ gradient system จาก Petroleum Ether-CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃-MeOH และ MeOH โดยเก็บ fraction ละ 100 มล. ทำการรวม fraction ด้วยพื้นฐานทาง TLC

4.2.3 การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ (Isolation & Purifications)

Fraction U48-10-1/7 (135.3 มิลลิกรัม)

ตกผลึกสาร U48-10-1/7 ด้วยวิธี recrystallization โดยใช้ Chloroform : MeOH จะได้ผลึกละเอียดสีขาวของสเตอรอยด์ “U48-10-1/7C” นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-10-1/8-12 (316.3 มิลลิกรัม)

ตกผลึกสาร U48-10-1/8-12 ด้วยวิธี recrystallization โดยใช้ Chloroform: MeOH จะได้ผลึกละเอียดสีขาวของสเตอรอยด์ “U48-10-1/8-12 C” นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-10-1/26-33 (115.3 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-10-1/26-33 ด้วยวิธี reverse phase C₁₈ Column chromatography โดยใช้ระบบ 70% MeOH โดยเก็บ fraction ละ 20 มล. จะได้สารบริสุทธิ์ของ “U48-10-1/26-33/1” และ “U48-10-1/26-33/2” นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-10-1/40-41 (154.6 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-10-1/40-41 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH 70:29:1 (x2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ “U48-10-1/40-41/1” นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-10-1/42-45 (65.0 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-10-1/42-45 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH 70:29:1 (x2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ “U48-10-1/42-45/1” นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR

Fraction U48-10-1/46-50 (36.5 มิลลิกรัม)

แยกสาร U48-10-1/46-50 ด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH 70:29:1 (x2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ “U48-10-1/46-50/1” และ “U48-10-1/46-50/2” นำไปหาโครงสร้างสารด้วย NMR