บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. พืชทะเล

พืชทะเลที่ใช้ทดลอง ประกอบด้วยหญ้าทะเล *E. acoroedes*, *Halodul pinifolia* และ *Halophila ovalis* และ สาหร่ายทะเล *Dictyota* sp.

2. สารเคมี

2.1 เมทานอล [Methanol (MeOH): Commercial Grade]

2.2 ไดคลอโรมีเทน [Dichloromethane (CH_2Cl_2): Commercial Grade]

2.3 เฮกเซน [Hexane: Commercial Grade]

2.4 เอทิลอะซิเตด [Ethyl Acetate (EtOAc): Commercial Grade]

2.5 ซิลิกาเจล 60 PF254 Catalog Number 1.07749.2500 ของบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมัน ใช้สำหรับ Thin Layer Chromatography (TLC)

2.6 ซิลิกาเจล 60 เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.015-0.040 มิลลิเมตร Catalog Number 1.15111.1000 ของบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมัน ใช้สำหรับ Column Chromatography

2.7 ซิลิกาเจล 60 เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร Catalog Number 1.093385.1000 ของบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมัน ใช้สำหรับ Column Chromatography

2.8 แผ่นพลาสติก TLC ซิลิกาเจล 60 F254 หนา 0.2 มิลลิเมตร ของบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมัน

2.9 คลอโรฟอร์ม-ดี (Chloroform-D) 99.9 % Atom D จากบริษัท Aldrich Chemical, USA

3. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการสกัดและการแยก

3.1 เครื่องแก้วพื้นฐาน

3.2 เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator)

3.3 Flash Column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร

3.4 Flash Column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.5 เซนติเมตร ยาว 9 เซนติเมตร

3.5 ปั๊มสำหรับดูดอากาศ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.6 แผ่นกระจกทำ PTLC ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร และ 45.5 × 20 เซนติเมตร ความหนาของ Silica Gel ที่เคลือบ ประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร

3.7 แผ่นกระจกทำ TLC ขนาด 2.5 x 7.5 เซนติเมตร ความหนาของ Silica Gel ที่เคลือบ ประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร

3.8 หลอดกำเนิดแสงยูวี (UV-Lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.9 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AG 204, Mettler Toledo, Switzerland)

4. เครื่องมือสำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์

4.1 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR 400 MHz Ultrashield รุ่น AVANCE 400 ของบริษัท Bruker

4.2 เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS โดย Gas Chromatograph รุ่น 5890 SERIES II ต่อกับ Mass Spectrometer รุ่น 5989B ของบริษัท Hewlett Packard)

4.3 เครื่อง Ultraviolet-Visible Spectrophotometer (UV Spectrophotometer รุ่น HP 8453 ของบริษัท Hewlett Packard)

4.4 เครื่อง Infrared Spectrophotometer (IR Spectrophotometer รุ่น PARAGON 1000 ของบริษัท Perkin Elmer

4.5 เครื่อง Mass Spectrometer (MS รุ่น Micro TOF ของบริษัท Bruker)

4.6 เครื่องวัดการหมุนระนาบแสงโพลาไรด์ (Polarimeter รุ่น 341 ของบริษัท Perkin Elmer ขนาดเซลล์ 100 mm x 2 mm อุณหภูมิตลอดการทดลอง 20° C)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

การเก็บหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเล จะเก็บสดจากทะเล และในบ่อเลี้ยง จากนั้นบันทึกข้อมูลโดยให้หมายเลข หรือสัญลักษณ์แต่ละชนิดไว้ การเก็บรักษาโดยแช่แข็งโรยเกลือตั้งแต่นำออกจากทะเลและระหว่างการขนส่ง แล้วเก็บในตู้เย็นแช่แข็งที่ห้องปฏิบัติการเคมีอุณหภูมิ < 0° C เพื่อรอทำการสกัด โดยแยกข้อมูลส่วนหนึ่งเพื่อเป็นข้อมูลในการตรวจสอบหมวดหมู่ ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ทำ Herbarium Sheet ตัวอย่างที่ทำวิจัยเป็นหญ้าทะเล 3 ชนิด และสาหร่ายทะเล 1 ชนิด คือ

1.1 *E. acoroides* หรือหญ้าชะเงาใบยาว หญ้าอำพันหางหมู ว่านน้ำ หญ้าคา หมายเลข 46021 เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบน โดย Scuba Diving ที่ความลึก ประมาณ 2 เมตร เมื่อวันที่ 2 พฤศจิกายน 2546

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2 *Halodule pinifolia* หรือหญ้าชะเงาเขียวปลายใบแฉก กุยช่ายทะเล หมายเลข 46034 เก็บจากอ่าวคุ้งกระเบน บริเวณกลางอ่าวช่วงน้ำลง เมื่อวันที่ 24 มกราคม 2547

1.3 *Halophila ovalis* หรือหญ้าใบมะกรูด หญ้าใบกลม หญ้าเงา หญ้าอำพัน หมายเลข 46018 เก็บจากบ่อเลี้ยง โครงการพระราชดำริอ่าวคุ้งกระเบน เมื่อวันที่ 1 พฤศจิกายน 2546

1.4 *Dictyota* sp. สาหร่ายทะเลสีน้ำตาล หมายเลข 46009 เก็บจากหาดวอนนภา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เมื่อวันที่ 1 ตุลาคม 2546

1.5 *Dictyota* sp. สาหร่ายทะเลสีน้ำตาล หมายเลข 48001 เก็บจากหาดวอนนภา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เมื่อวันที่ 26 มีนาคม 2548

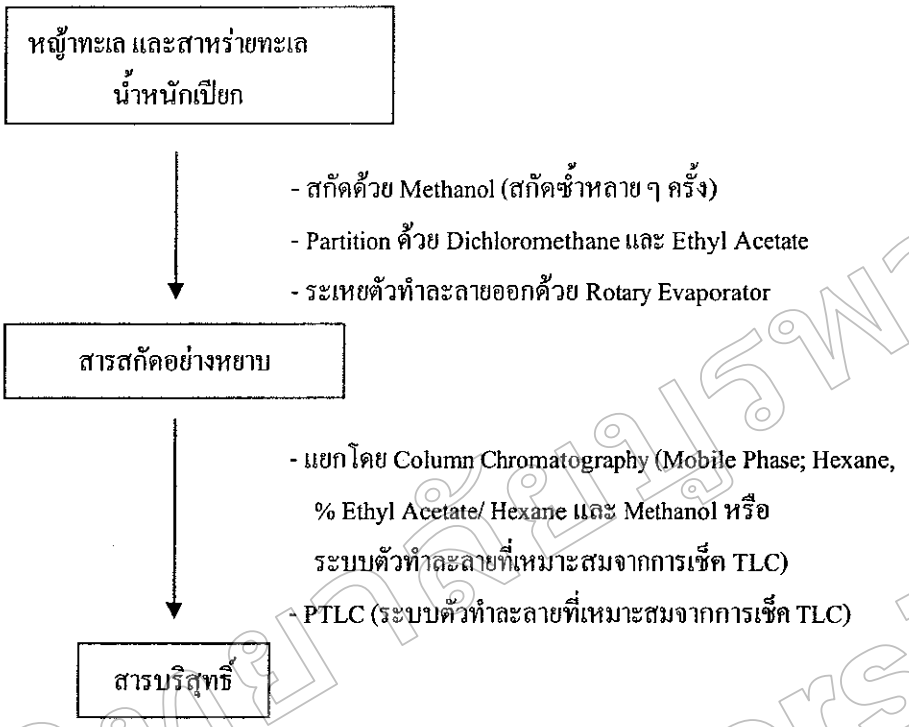
2. การทำ Herbarium Sheet

นำกระดาษแข็งสีขาวที่มีขนาดพอเหมาะกับขนาดหญ้าทะเล พร้อมทั้งบันทึกหมายเลขหรือสัญลักษณ์ไว้ที่มุมกระดาษ จากนั้นนำหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเลเปียกที่มีลักษณะสมบูรณ์มาวางไว้บนกระดาษแล้วทำให้หญ้าทะเลและสาหร่ายทะเลแบนราบเสมอไปกับกระดาษ เสร็จแล้วนำผ้าขาวบางมาวางทับไว้บนตัวอย่าง และนำกระดาษแข็งมาวางทับอีกชั้นพร้อมกับนำของหนัก ๆ ที่มีช่องอากาศมาวางทับอีกชั้นให้มีอากาศถ่ายเท เพื่อให้แห้งติดกระดาษแข็ง

3. การสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์จากหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเล

การสกัดหญ้าทะเลและสาหร่ายทะเลทำการสกัดสดด้วยตัวทำละลายเมทานอลโดยสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนได้สารสกัดอย่างหยาบ จากนั้นแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโท กราฟีโดยใช้ Flash Column Chromatography และ Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) กระบวนการสกัดและการแยกแสดงในภาพที่ 3-1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-1 แสดงวิธีการสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

NMR Spectroscopy

การวิเคราะห์สเปกตรัมจากเทคนิคทาง NMR ให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของสารอินทรีย์ ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ใช้เทคนิค 1D และ 2D NMR ในการวิเคราะห์โครงสร้าง ซึ่งแต่ละเทคนิคมีความสำคัญดังนี้

^{1}H ทราบจำนวนของสัญญาณ, ตำแหน่งของสัญญาณ และ Splitting ของสัญญาณ ซึ่งบอกถึงจำนวนของโปรตอนที่อยู่ติดกับโปรตอนที่พิจารณา

^{13}C ทราบจำนวนคาร์บอนเป็นอย่างน้อย

DEPT 135 ทราบประเภทของคาร์บอนแบบ CH_3, CH_2 และ CH

DEPT 90 ทราบประเภทคาร์บอนแบบ CH (จากข้อมูล ^{13}C, DEPT 135 และ DEPT 90 ทราบประเภทคาร์บอนแต่ละสัญญาณ)

NOE Difference (Nuclear Overhauser Effect) ใช้เทคนิคนี้เมื่อทราบโครงสร้าง เพื่อหา Relative Stereochemistry ซึ่งเป็นการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ H ที่ใกล้กันประมาณ 4 Å

COSY (COrrelation SpectroscopY) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ H แบบ Through Bond

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

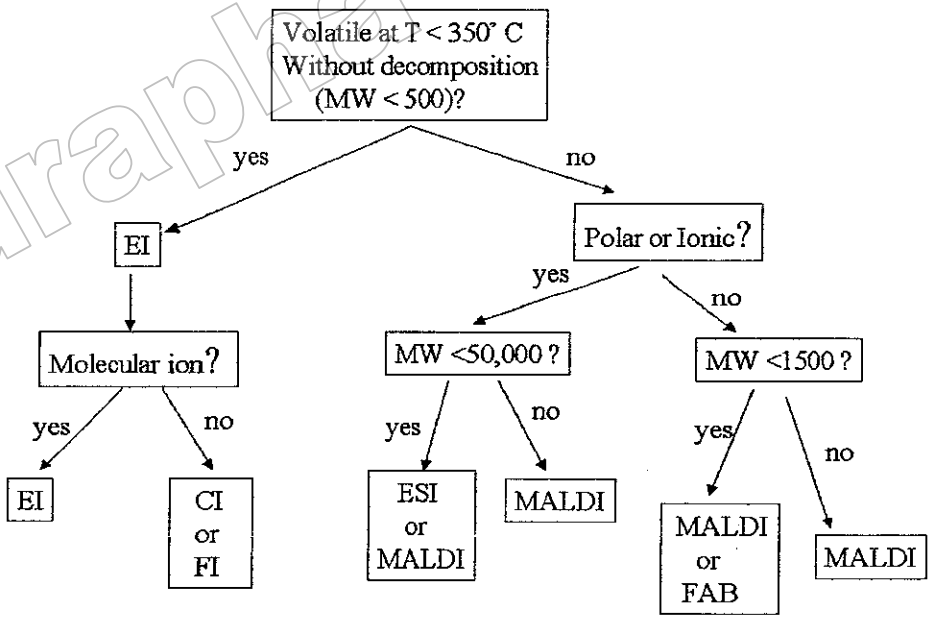
HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ C แบบ One-Bond

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ C แบบ Long-Range

NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ H ที่ใกล้กันประมาณ 4 Å แบบ Through Space

Mass Spectrometry

การวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้ บอกถึงน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนของสารแต่ละชนิดที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่งจะนำไปหาสูตรโมเลกุลที่แน่นอนได้ การวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับเทคนิคการเกิด Ionization เช่น Electron Impact (EI), Chemical Ionization (CI), Electro Spray Ionization (ESI), Fast Atom Bombardment (FAB), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) และ Field Ionization (FI) เป็นต้น ควรเลือกเทคนิคให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่ทำการวิเคราะห์ (Jones, 2002) ดังแสดงในภาพที่ 3-2 นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ยังแยกออกเป็นการวิเคราะห์มวลหรือวิเคราะห์มวลเบื้องต้น โดยวิธีละเอียดให้ทศนิยม 4 ตำแหน่งที่เรียกว่า High Resolution และให้ทศนิยม 2 ตำแหน่งที่เรียกว่า Low Resolution



ภาพที่ 3-2 แสดงการเลือกเทคนิคการเกิด Ionization ในการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของสาร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. การทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสารสกัดอย่างหยาบของหญ้าทะเล *E. acoroides, Halodule pinifolia* และ *Halophila ovalis* มาทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ต่อต้นผักกาดหอม และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์อาร์ทีเมีย เพื่อค้นหาว่ามีองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือไม่ ที่จะแยกต่อให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ดังกล่าว

5.1 ขั้นตอนการทดสอบสารสกัดอย่างหยาบกับเมล็ดผักกาดหอม

5.1.1 การเตรียมความเข้มข้น

นำสารสกัดอย่างหยาบที่ต้องการทดสอบมาชั่งน้ำหนักที่ต้องการจากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ทำการเจือจางจากสารละลายเริ่มต้น ให้ได้ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm

5.1.2 การทดสอบ

นำกระดาษทิชชูที่ตัดเป็นรูปวงกลมวางบนจานเพาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร ปิเปตสารที่เตรียมไว้ลงบนกระดาษทิชชู 4 มิลลิลิตร โดยทำ 5 ซ้ำแต่ละความเข้มข้น ส่วน Blank ปิเปตเมทานอลลงไป 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เมทานอลระเหยออกจนหมด จากนั้นนำสำลี 1 แผ่น น้ำหนักประมาณ 0.5 มิลลิกรัม มารองด้านล่างกระดาษทิชชูเพื่อเป็นที่ยึดเกาะของราก นำเมล็ดผักกาดหอมที่เพาะแล้ว 2 วัน (รากยาวประมาณ 0.1-0.2 เซนติเมตร) หยอดลงไปในจานเพาะ 10 เมล็ด ให้น้ำ 10 มิลลิลิตร ต่อวัน และบันทึกผลการเจริญเติบโตทุก ๆ วัน จนครบ 10 วัน โดยวัดส่วนที่เป็นลำต้น

5.2 ขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์อาร์ทีเมีย

5.2.1 นำสารสกัดอย่างหยาบที่ต้องการทดสอบมาชั่งน้ำหนักที่ต้องการจากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ทำการเจือจางจากสารละลายเริ่มต้น ให้ได้ระดับความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 ppm

5.2.2 นำขวดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร นำกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 55 มิลลิเมตร ตัดให้ได้ขนาดเท่าเส้นผ่านศูนย์กลางของขวด และวางไว้ในขวด ปิเปตสารที่เตรียมไว้ลงไปบนกระดาษกรองความเข้มข้นละ 4 มิลลิลิตร โดยทำ 5 ซ้ำต่อความเข้มข้น ส่วน Blank ปิเปตเมทานอลลงไปอย่างละ 4 มิลลิลิตรเหมือนกัน ตั้งทิ้งไว้ให้เมทานอลระเหยออกหมด แล้วเติมน้ำทะเล 4 มิลลิลิตรต่อขวด ใช้หลอดหยดดูดอาร์ทีเมียระยะตัวอ่อนที่ฟักแล้ว 30 ชั่วโมง มาใส่ขวดละ 10 ตัว สังเกตและบันทึกอัตราการตาย เมื่อเวลาครบ 24 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University