



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ประจำปี 2561

เรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีของกระต่ายทะเล
Bursatella leachii จากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

Chemical constituents of sea hare *Bursatella leachii*
from Bangsaen beach, Chonburi province

โดย

นสภ.สุกฤษฎี	ศรีสวัสดิ์	58210252
นสภ.Kan	Vannyta	58210257

โครงการวิจัยเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

กระต่ายทะเล (Seahare) เป็นสัตว์ทะเลตระกูลเดียวกับหมึกและทากทะเล มักพบการกระจายตัวอยู่มากตามแนวชายหาดบริเวณประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศไทย สัตว์ชนิดนี้สังเคราะห์สารเคมีที่ได้จากอาหารที่กิน เช่น สาหร่ายทะเล แพลงก์ตอน เพื่อดำรงชีวิตให้อยู่รอด และ เพื่อป้องกันตัวจากอันตรายต่าง ๆ ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้สนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสัตว์ชนิดนี้เป็นจำนวนมากเพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ พัฒนาเป็นสารต้นแบบ หรือใหม่ที่ใช้ในการรักษาโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

การวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ที่พบบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี

คณะผู้จัดทำ

นสภ.สุกฤษฎี	ศรีสวัสดิ์	58210252
นสภ.Kan	Vannyta	58210257

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ปีการศึกษา 2561

เรื่อง องค์ประกอบทางเคมีของกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* จากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | | |
|----------------|------------|------|----------|
| 1. นสภ.สุกฤษฎี | ศรีสวัสดิ์ | รหัส | 58210252 |
| 2. นสภ.Kan | Vannyta | รหัส | 58210257 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | |
|--------------------|------------------|
| 1. ญญ.อ.ดร.ธัญชนก | ศิริรักษ์ |
| 2. ญญ.อ.ดร.เนตรชนก | เจียงสืบชาติวิระ |
| 3. ญญ.อ.ดร.ชฎาพร | พรมปัญญา |

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเบื้องต้นสารสกัด methanol ของกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ที่พบบริเวณหาดบางแสนในช่วงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase จึงได้นำตัวอย่างดังกล่าวมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี เมื่อสกัดแยกกระต่ายทะเลโดยแยกส่วนที่เป็นเครื่องในและส่วนที่เป็นผิว (mantle) ด้วยตัวทำละลาย hexane dichloromethane และ butanol เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค TLC และ ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนของเครื่องในและส่วนเปลือกมีองค์ประกอบไม่แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำสารสกัด dichloromethane จากส่วนของเครื่องใน น้ำหนัก 5.11 กรัมมาสกัดแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ได้แก่ vacuum chromatography, flash column chromatography และ size exclusion chromatography ได้สารบริสุทธิ์ 3 รายการได้แก่ BURI 1-10-3 (3.1 mg, 0.05%), BURI 1-10-4 (12.1 mg, 0.20%) และ BURI 1-10-5 (2.8 mg, 0.04%) ทั้งนี้โครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 3 รายการอยู่ในระหว่างการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H , ^{13}C NMR, 2D NMR, IR, UV และ mass spectrometry

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2018

: Chemical component of *Bursatella leachii* from Bangsan beach, Chonburi province

By

- | | | | |
|--------------|----------|----|----------|
| 1. Mr.Sukrit | Srisawat | ID | 58210252 |
| 2. Miss Kan | Vannyta | ID | 58210257 |

Advisor:

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1. Dr. Thanchanok | Sirirak |
| 2. Dr. Nadechanok | Jiangseubchatveera |
| 3. Dr. Chadaporn | Prompanya |

Abstract

From the preliminary study of methanol extract of seahare *Bursatella leachii* collected from Bangsaen Beach during December 2017 showed inhibition of α -glucosidase enzyme. The chemical constituents of the seahare was further studied. The seahare was separated into two part including organ and mantle. The methanol, dichloromethane, and butanol extracts of organ and mantle parts were determined using TLC and ^1H NMR spectroscopy. Each solvent extracts from organ and mantle parts were similar. In this study, the dichloromethane extract from organ part (5.11 g.) was subjected to separate using chromatographic techniques including vacuum chromatography, flash column chromatography and size exclusion yielded three pure compounds BURI 1-10-3 (3.1 mg, 0.05%), BURI 1-10-4 (12.1 mg 0.20%), and BURI 1-10-5 (2.8 mg, 0.04%). The structure of all three compounds are being analyzed with ^1H , ^{13}C NMR, 2D NMR, IR, UV and mass spectroscopy

Major advisor.....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก
ผอ.อ.ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์ ผอ.อ.ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวิระ และผอ.อ.ดร.ชฎาพร พรหมปัญญา ซึ่งเป็น
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ผู้ซึ่งคอยเพิ่มเติมข้อเสนอแนะ ตลอดระยะเวลาทำโครงการวิจัยครั้งนี้
จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

คณะผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบคุณผู้สนับสนุนโครงการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย
บูรพา ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยครั้งนี้

คณะผู้จัดทำ

นสภ.สุกฤษฎี	ศรีสวัสดิ์	58210252
นสภ.Kan	Vannyta	58210257

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
บทที่ 1 บทนำ	
ที่มาความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
กรอบแนวคิด.....	5
ความสำคัญขอบเขตงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ลักษณะทางชีวภาพของกระต่ายทะเล.....	6
2.2 ลักษณะองค์ประกอบทางเคมีและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	6

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษา.....	10
3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และ สารเคมี	10
3.2.1 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษา.....	10
3.2.2 สารเคมี.....	10
3.2.3 เครื่องมือ.....	10
3.3 การเตรียมสารสกัด.....	11
3.3.1 ขั้นตอนการทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง.....	11
3.3.2 ขั้นตอนการสกัด.....	11
3.4 การสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction).....	12
3.5 การตรวจสอบและติดตามสารเคมี.....	13
3.6 การแยกสารด้วย vacuum chromatography	13
3.6 การแยกสารด้วย flash column chromatography	14
3.7 การแยกสารสกัดโดยใช้ Sephadex LH-20.....	14
3.8 การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์.....	15

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างกระต่ายทะเล.....	16
4.2 ผลการเตรียมสารสกัด.....	16
4.3 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction).....	17
4.4 แยกสารด้วย vacuum chromatography	18
4.5 แยกสารด้วย flash column chromatography	19
4.6 การแยกสารสกัดโดยใช้ Sephadex LH-20	21
4.7 การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์.....	22

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การเก็บตัวอย่างกระต่ายทะเล.....	23
5.2 ผลการเตรียมการสกัด.....	23
5.3 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction).....	23
5.4 แยกสารด้วย vacuum chromatography	24
5.5 แยกสารด้วย flash column chromatography.....	24
5.6 การแยกสารสกัดโดยใช้ Sephadex LH-20	25

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก ก ,ข ,ค

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่

หน้า

1. ลักษณะภายนอกกระต่ายทะเล.....	7
2. ขั้นตอนการเตรียมสารสกัด.....	11
3. การสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย.....	13
4. ลักษณะบนผิวน้ำของกระต่ายทะเล.....	16
5. ผลวิเคราะห์ TLC ของสารสกัดชั้น butanol, dichloromethane และ hexane.....	17
6. ผลวิเคราะห์ TLC จากการทำ vacuum chromatography.....	19
7. ผลวิเคราะห์ TLC จากการทำ flash column chromatography.....	20
8. ผลวิเคราะห์ TLC จากการทำ Sephadex LH-20.....	21

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1. ผลการสกัดกระต่ายทะเลด้วยวิธีหมัก methanol.....16
2. แสดงน้ำหนักในแต่ละชั้นของสารสกัดส่วนเครื่องในและ %yield.....16
3. แสดงน้ำหนักในแต่ละชั้นของสารสกัดส่วนเปลือกและ %yield.....16
4. แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย vacuum chromatography18
5. แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย flash column chromatography20
6. แสดงน้ำหนักของสารที่ได้จากการแยกด้วย Sephadex LH-20.....21

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เนื่องจาก 70% ของผิวโลกถูกปกคลุมด้วยมหาสมุทร ทะเลจึงเป็นที่อยู่อาศัยที่ใหญ่ที่สุดของสิ่งมีชีวิต และเนื่องจากระบบนิเวศน์ของท้องทะเลที่มีความหลากหลายดังเช่น ความลึก กระแสน้ำ ความเค็ม เป็นตัวกำหนดความหนาแน่นของน้ำซึ่งส่งผลต่อการหมุนเวียนของน้ำ ความสว่างเป็นสิ่งสำคัญต่อสัตว์ และพืชในการสังเคราะห์อาหารและแร่ธาตุที่แตกต่างจากบนบกจึงมีแนวโน้มที่จะสร้างสารสำคัญทางชีวภาพ ที่แตกต่างไปจากสิ่งมีชีวิตบนบกด้วย นอกจากนี้กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลที่ถูกคุกคามจากสัตว์ ผู้ล่าด้วยลักษณะลำตัวที่อ่อนนุ่มไม่มีกระดองปกคลุมและเคลื่อนช้าจึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีการสร้างกลไกป้องกันตัว เช่น การผลิตสารเคมีในการป้องกันตัวเองจากผู้ล่าโดยสารเคมีที่สร้างขึ้นนี้อาจมีผลต่อการขับไล่สัตว์อื่นทำให้ ฆ่า บาดเจ็บ หรือ ตายได้ [1]

โดยจากรายงานการศึกษา สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิตในท้องทะเลได้รายงานว่าปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิตในทะเลและค้นพบสารใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพกว่า 20,000 ชนิด โดยส่วนใหญ่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้านการอักเสบเป็นต้น โดยมีหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาเป็นยาซึ่งมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นยาในปัจจุบัน

ดังตัวอย่างเช่น spongothymidine, spongouridine จากฟองน้ำทะเล *Cryptotethia crypta* เป็น สารกลุ่ม arabino nucleosides ที่มีโครงสร้างแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตบนบกและเป็นต้นแบบในการพัฒนายา ด้านไวรัส Ara-A (Vidarabine®) และยาด้านมะเร็ง Ara-C (cytarabine) ตามลำดับ มีการปรับปรุงโครงสร้าง สารต่อมาได้เป็นยาด้านไวรัส Acyclovir นอกจากนี้ยังมีสาร trabectedin (Yondelis®) จากเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia turbinata* เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลชนิดแรกที่มีการพัฒนาเป็นยาด้านมะเร็ง และมีการรับรองในสหภาพยุโรปในปี ค.ศ. 2017 [2]

ฤทธิ์ทำให้ชาและลดอาการเจ็บปวด (Analgesic Properties) ตัวอย่างเช่น ยาแก้ปวดที่ตัวแรกถูก ค้นพบมีชื่อว่า ziconotide (Prialt®) เป็น omega-conotoxin ที่ได้จากหอยเต้าปูน *Conus magus* ซึ่งมีฤทธิ์ ระงับปวดได้ดีกว่า morphine ถึง 1,000 เท่า โดยในปีค.ศ. 2004 มีการอนุมัติให้ใช้ในสหรัฐอเมริกา และต่อมา มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในสหภาพยุโรป [2]

ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-inflammatory and Wound-Healing) ตัวอย่างเช่น บริษัท Esteē Lauder ได้คิดค้นผลิตภัณฑ์เวชสำอางชนิดใหม่ ซึ่งมีส่วนผสมของ pseudopterosin ที่ได้จาก *Pseudopterosin elisabethae* ซึ่งมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ [2] นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์อีกหลายชนิดที่ปัจจุบัน ได้รับการอนุมัติให้ใช้เช่น Collagenase KK ซึ่งผ่านการวิจัยและพัฒนาโครงสร้างโดย The Pacific Institute

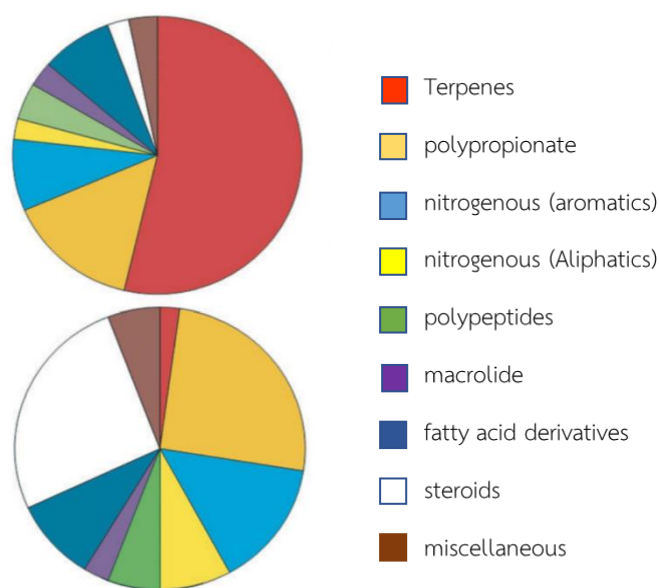
of Bioorganic Chemistry, Far East Division of the Russian Academy of Scientists ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีเป็น collagenolytic proteases ที่ได้จาก Kamchatka King crab (*Paralithodes chamtschaticus*) เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดแผล ที่นิยมใช้หลังการส่องกล้องการผ่าตัดศัลยกรรม และ รักษาเยื่อช่องท้องอักเสบในเด็ก [2]

สารเคมีที่ได้จากผลิตภัณฑ์ทางทะเลหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ เช่น Mycalamide B จากฟองน้ำ *Mycale* sp. มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา pseudopteroxazol มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย tuberculosis และ benzoxazole ซึ่งเป็น diterpine alkaloid ที่ได้จากกัลปังหา *Pseudopterogorgia elisabethae* ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง mycobacterium โดย ในความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งได้ถึง 97% ในขณะที่ (+)-8-hydroxymanzamine ที่ได้จากฟองน้ำ *Pachypellina* sp มีฤทธิ์ยับยั้งได้เล็กน้อยที่ความเข้มข้น 0.91 $\mu\text{g/mL}$ [2]

จากรายงานวารสารที่มีชื่อหัวข้อ Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine mollusk ได้ระบุว่าปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์จากหลากหลายสถาบันที่ทำการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบสารเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพใน สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังไฟลัม mollusk เนื่องจาก mollusk เป็นไฟลัมที่ใหญ่เป็นอันดับสองของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในโลกซึ่งมีประมาณ 52,000 สายพันธุ์ [3] และคาดการณ์ว่าอาจจะมีมากถึง 100,000 – 200,000 สปีชีส์ [3] โดยลำดับที่ใหญ่ที่สุดในไฟลัมนี้คือ Gastropoda ดังนั้นจึงมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเคมีในลำดับนี้เป็นจำนวนมากดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลการวิจัยเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในไฟลัม mollusca (Benkendorff. et al.,2010)

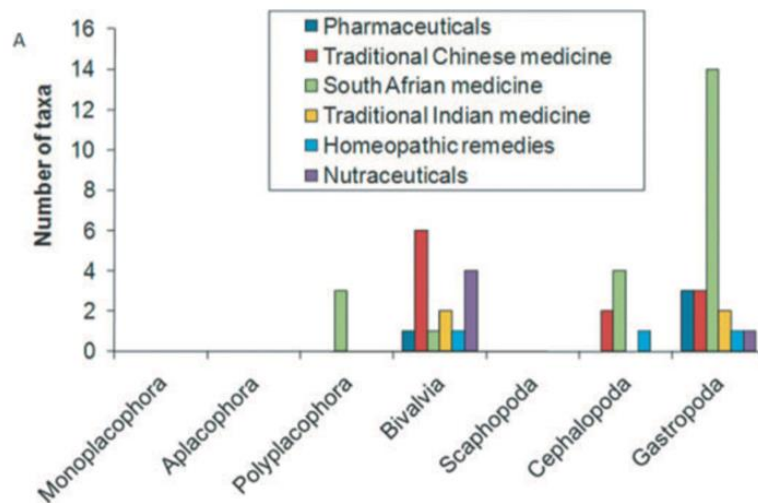
ลำดับ	จำนวนสาร (รายงาน)	งานวิจัย (ฉบับ)	สายพันธุ์	ร้อยละ
Aplacophora	0	0	0	0
Monoplacophora	0	0	0	0
Polyplacophora	49	11	10	1.5
Scaphopoda	<10	2	4	1.1
Cephalophoda	24	11	13	1.3
Bivalvia	190	146	61	0.3
Gastropoda	948	878	817	1.0



รูปที่ 1 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างสารเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในไฟลัม Mollusk [3]

ตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบัน mollusk ถือว่าเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน ที่ให้ประโยชน์แก่มนุษย์ โดยพบว่ามีสารเคมีมากมายใน mollusk ที่ถูกนำไปใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ และเป็นภูมิปัญญาโรมโบราณมีการใช้หอยสองฝา (Mytilidae) เพื่อการบำบัดรักษาในสมัยกรีกโบราณ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารสกัดกลุ่ม mollusk ในทางการแพทย์ของประเทศแอฟริกาใต้ ประเทศอินเดีย และสาธารณรัฐประชาชนจีน [3]

ในปัจจุบันยาสำหรับใช้ในทางเภสัชกรรมจากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม mollusk ตัวอย่างเช่น Ziconotid® ที่สกัดได้จากสารพิษของหอยเต้าปูน *Conus magus* มีฤทธิ์รักษาอาการปวดเรื้อรัง สาร dolastatin 10 ที่สกัดได้จากกระด่ายทะเล *Dolabella auriculata* ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งในขณะนี้มีการพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งอยู่ระหว่างขั้น Phase II clinical trials นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาฤทธิ์ในหอยเป่าฮือซึ่งเป็นสมุนไพรจีนโบราณ โดยเชื่อว่ามีฤทธิ์รักษาโรคตับ ช่วยในการมองเห็น ลดความดันในผู้ป่วยความดันสูง และแก้เวียนศีรษะ ต่อมาก็ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมและพบว่าสารสกัดจากหอยเป่าฮืออุดมไปด้วยแร่ธาตุ วิตามิน และโอเมกา 3 นอกจากนี้สารที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้วยังมีสารสกัดที่สกัดได้จาก Gastropoda ซึ่งยังอยู่ในระหว่างขั้นตอนการวิจัยและพัฒนาอีกหลายชนิด [3]



รูปที่ 2 แสดงจำนวนลำดับของ mollusk ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์

กระต่ายทะเลเป็นสัตว์ทะเลในลำดับ gastropod ที่ไม่มีกระดูกสันหลังมักพบในประเทศเขตร้อนที่ตั้งอยู่ตามแนวเส้นศูนย์สูตรหรือตามแนวชายฝั่งที่มีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นโดยพบมากในประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ประเทศไทยตั้งอยู่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีชายฝั่งทะเลทั้งฝั่งตะวันออกและฝั่งตะวันตก ยาวกว่า 350,000 ตารางกิโลเมตร อีกทั้งยังตั้งอยู่ในเขตร้อนตามแนวศูนย์สูตร ซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพทางทะเลสูง เหมาะแก่การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ [4] โดยจากการศึกษาวิจัยของ Arkronat w et al., 2016 ศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมของ ragged sea hare ซึ่งเก็บตัวอย่างกระต่ายทะเลได้จากชายฝั่งทะเลในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจากงานวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของกระต่ายทะเลของ Suntornchashweij S et al., 2005 ระบุว่าสามารถพบกระต่ายทะเล (sea hare) ในบริเวณอ่าวไทยอาจสืบเนื่องมาจาก สภาพภูมิศาสตร์และอุณหภูมิน้ำที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตและดำรงชีวิตของกระต่ายทะเลพบว่ากระต่ายทะเลเจริญเติบโตได้ดี ในน้ำที่อุณหภูมิ 27.2-32.9 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิปกติของทะเลอ่าวไทย จึงสามารถพบกระต่ายทะเลในบริเวณอ่าวไทยได้มาก

จากการสำรวจชายหาดบางแสนในช่วงเดือนธันวาคม 2560 พบว่ามีกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* บริเวณชายหาดบางแสนจำนวนมาก เมื่อนำสารสกัดกระต่ายทะเลมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดเมธานอลของกระต่ายทะเล *B. leachii* มีฤทธิ์ยับยั้ง α -glucosidase จึงสนใจทำตัวอย่างกระต่ายทะเล *B. leachii* มาทำการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

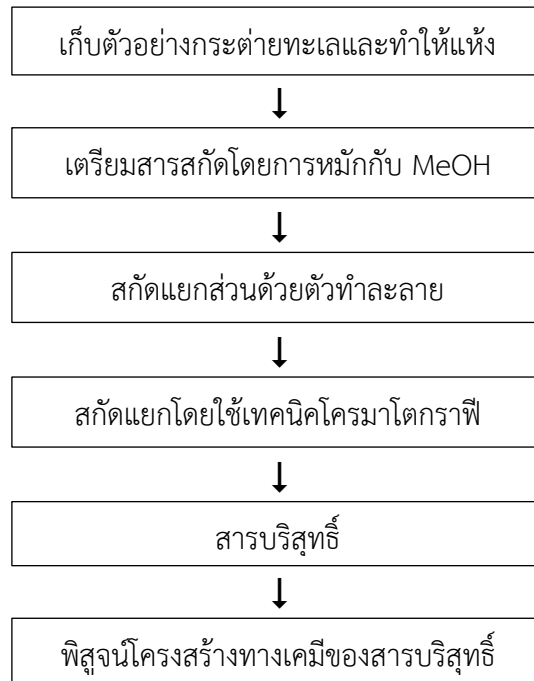
วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ที่เก็บจากชายฝั่งตะวันออก บริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อทราบองค์ประกอบทางเคมีของกระต่ายทะเล *Bursatella leachii*

กรอบแนวคิด



ขอบเขตงานวิจัย

สกัดสารสำคัญจากกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ที่เก็บจากชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี

นิยามศัพท์

กระต่ายทะเล (sea hare) หมายถึง สิ่งมีชีวิตในทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัม Gastropoda และลำดับ Mollusca โดยมีลำตัวอ่อนนุ่ม ปกคลุมด้วยกระดองบาง ๆ เคลื่อนตัวโดยใช้หนวด

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ทางชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย บริเวณชายหาดบางแสน จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้องค์ความรู้เกี่ยวกับลักษณะทางชีวภาพ และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในสัตว์ชนิดนี้

ลักษณะทางชีวภาพของกระต่ายทะเล

กระต่ายทะเล *Bursatella leachii* เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในไฟลัม Mollusca ซึ่งแพร่กระจายอยู่ในประเทศเขตร้อนบริเวณเส้นศูนย์สูตรตามแนวชายฝั่งที่มีอากาศร้อนชื้น โดยจัดอยู่ในอนุกรมวิธานดังต่อไปนี้

Kingdom	Animalia
Phylum	Mollusca
Class	Gastropoda
Subclass	Heterobranchia
Order	Aplysida
Family	Aplysidae
Genus	<i>Bursatella</i>
Species	<i>Bursatella leachii</i>

กระต่ายทะเลมีความยาวถึง 10 เซนติเมตร มีลักษณะลำตัวอ่อนนุ่ม หุ้มด้วยกระดองในช่วงที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่และสลัดกระดองออกเมื่อเจริญเต็มวัย เหลือเพียงกระดองบาง ๆ ลำตัวที่อ่อนนุ่มถูกปกคลุมไปด้วย papillae ซึ่งมีลักษณะคล้ายนิ้วยื่นออกมาทั่วลำตัว ตรง papillae จะมีจุดสีดำอมน้ำตาล บริเวณลำตัวสีน้ำตาลจะมีจุดสีน้ำเงินกระจายอยู่ทั่วลำตัว ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของกระต่ายทะเลชนิดนี้ บริเวณส่วนหัวแบ่งออกเป็น 4 ส่วน (รูปที่ 3) คือ Dorsal part ส่วนหุ้มเส้นประสาทรับรู้กลิ่น (olfactory tentacle) 2 เส้น หนวดที่ยื่นออกมาจากปาก 2 เส้น ส่วนของปากเรียกว่า radular ส่วนนี้ทำหน้าที่กลืนอาหาร และแลกเปลี่ยนแก๊สเพื่อหายใจ กระต่ายทะเลเคลื่อนที่แบบ immobile โดยใช้ส่วนของหน้าท้องที่มีขาเล็กยื่นออกมาในการเคลื่อนที่ และ มักพ่นน้ำหมึกสีน้ำเงินเมื่อสิ่งภายนอกมาสัมผัส เพื่อป้องกันตัว



รูปที่ 3 A ลักษณะภายนอกของกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ; B เป็นส่วนลำตัวที่ปกคลุมด้วยกระดองอ่อน ๆ และ papillae ; C ลักษณะด้านข้าง ; D ส่วนหน้าท้องด้านล่าง โดยจะสังเกตเห็น radular และ olfactory tentacle ในส่วนนี้

กระต่ายทะเลมีลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ที่แตกต่างจากสัตว์น้ำชนิดอื่นโดยสามารถเปลี่ยนเพศสภาพได้ภายในตัว (hermaphroditic) ในช่วงผสมพันธุ์เพศผู้จะค่อย ๆ ยื่นส่วนของลำตัวไปเกาะบริเวณแผ่นหลังส่วนหน้าของเพศเมีย จากนั้นจึงเริ่มการปฏิสนธิจนได้ไข่ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นยาวคล้ายเส้นบะหมี่ ตัวอ่อนจะเริ่มเจริญเติบโตในระยะเวลา 20 วัน และโตเต็มที่ภายในระยะเวลา 2-3 เดือนและจะมีอายุสูงสุดเพียง 1 ปี เมื่อโตเต็มวัยมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 18.9 g [1]

กระต่ายทะเลเป็นสัตว์น้ำที่อยู่ในพื้นที่เขตร้อน มักอาศัยอยู่ตามแนวชายฝั่งบริเวณ น้ำตื้น [12] ปัจจัยการเจริญเติบโตของกระต่ายทะเลขึ้นกับ อุณหภูมิ น้ำ ความลึก ความหนาแน่น ค่าความเค็ม ค่าเป็นกรด-ด่าง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วงเจริญเติบโตจะอยู่ระหว่าง 27.2-32.4 องศาเซลเซียส ค่าความเค็ม 31-33 ddt ค่าปริมาณออกซิเจนที่อยู่ในน้ำเท่ากับ 4.11-6.27 mg/L และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ pH 7.92-8.59

สัตว์ชนิดนี้มักอาศัยอยู่บริเวณริมฝั่งเขตนํ้าตื้นและบางส่วนอยู่บริเวณใกล้แหล่งอาหารและมักพบการรวมกลุ่มกันเป็นจำนวนมากในช่วงเย็น อาหารหลักของกระต่ายทะเลคือสาหร่ายทะเลเช่นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) ซึ่งเป็นอาหารที่กระต่ายทะเลนิยมมากที่สุดโดยจะส่งผลกระทบต่อการผลิตสารเคมีเพื่อดำรงชีวิต [12]

องค์ประกอบทางเคมีและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

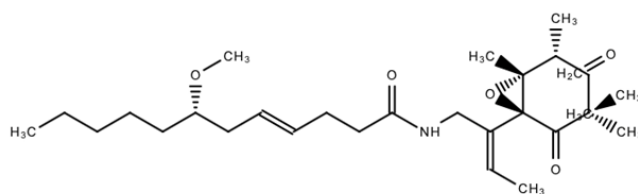
ส่วนประกอบสำคัญในโครงสร้างของกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* มีดังนี้ ความชื้น (moisture content) เท่ากับ 35.5% ปริมาณเถ้า (ash content) เท่ากับ 10.1% ปริมาณโปรตีน (protein content) 32.0% ปริมาณไขมัน (crude fat content) เท่ากับ 5.52% ซึ่งพบไขมันอิ่มตัว

(saturated fatty acid) 228 mg/g หรือเท่ากับ 68% ของไขมันทั้งหมด ประเภทไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุด คือ palmitic acid (45%) รองลงมาคือ eicosapentaenoic acid 16%

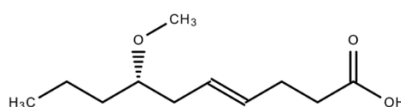
จากการนำสารสกัดอาทานอล อาซิโตน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอาซิเตท ของกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ส่งผลให้สารสกัดแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สารสกัดอาซิโตนที่สกัดได้จากกระต่ายทะเลพบปริมาณ phenolic compounds (TPC) เท่ากับ 40.9 mg GAE/g ปริมาณ flavonoids (TFC) เท่ากับ 228 mg RE/g ปริมาณ tannins เท่ากับ 23.52 mg CE/g ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.54 mg/mL นอกจากนี้ มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.073 mg/mL และจากการทดสอบฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ด้วย H_2O_2 ที่กระตุ้นการเกิดพิษใน human neuroblastoma cells (SH-SY5Y cell line) ไม่พบฤทธิ์ต้าน H_2O_2 จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ประสาทของ bacteria lipopolysaccharide พบค่า IC_{50} เท่ากับ 5.74 μ g/mL สารสกัดเมทานอล ไดคลอโรมีเทน และ เอทิลอาซิเตด ที่สกัดได้จากกระต่ายทะเลพบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.41 mg/mL , 0.53mg/mL และ 1.21 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่า positive control arbutin ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.17 mg/mL จากการรายงานผลข้างต้น จึงสรุปได้ว่า พบฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดอาซิโตนที่ได้จากกระต่ายทะเลได้มากกว่าสารสกัดชนิดอื่น [6]

กระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ที่เก็บได้จากประเทศนิวซีแลนด์พบสาร malynamide S (1) ซึ่งสกัดได้จากสารสกัดของกระต่ายทะเล และ (-)-7S-methoxydodec-4E-enoic (2) ที่ได้จากการทำ hydrolysis สารทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิต superoxide โดยลดการกระตุ้นการอักเสบ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ human leukemic HL60 cells ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6-8 μ g/mL นอกจากนี้จากการทดสอบยังพบฤทธิ์ ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Trichophyton mentagrophytes* และ *Candida albicans* [7]



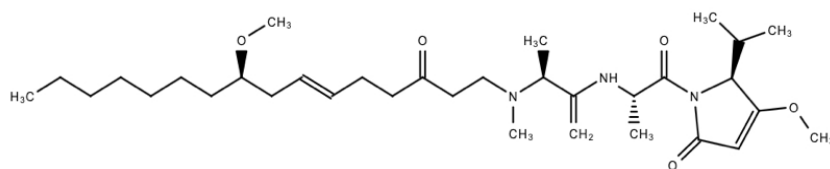
1



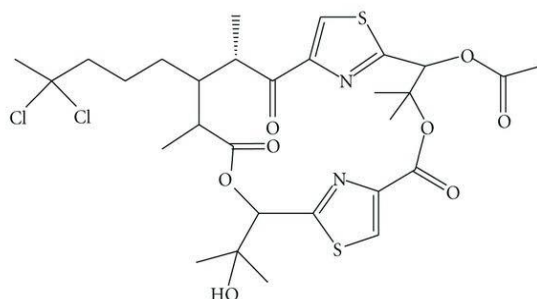
2

สารคัดหลั่งสีม่วงของ *Bursatella leachii* พบโปรตีน bursatellanin-P เป็นองค์ประกอบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV การสกัดสารชนิดนี้เริ่มต้นจากการสกัดแยก protein โดยนำสารคัดหลั่งสีม่วงที่ได้จากกระต่ายทะเลมา aliquot จากนั้นนำไปแยกอนุภาค (dialysis) เพื่อแยกโปรตีนโดยใช้ distilled water เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเพื่อได้ supernatant A จากนั้นนำ supernatant A ไป precipitate ในเอทานอลและนำไปแยกอนุภาค (dialysis) เพื่อแยกเกลือออกจากโปรตีน ต่อมานำโปรตีนที่ได้มา purified ใน DEAE-sephacel I column ทำอีกรอบใน DEAE-sephacel II [8]

ในประเทศไทยมีรายงานพบสาร malyngamide X (3) จากกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ซึ่งเป็น สารกลุ่ม malyngamide ชนิดแรกที่มี tripeptide เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลประมาณ 0.71% จากการศึกษาทางเคมีของกระต่ายทะเล ที่เก็บใหม่สามารถแยกสารที่มีรายงานว่า มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อของเซลล์คือ สาร hectochlorin (4) และ สารชนิดใหม่เพิ่มอีก 2 ชนิด ประกอบด้วย สารอนุพันธ์ของ hectochlorin คือ deacetylhectochlorin (5) และสารที่มีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างจากสาร hectochlorin คือ สาร syn-3-isopropyl-6-(-4-methoxy-benzyl)-4-methyl-morpholine-2,5-dione ได้เป็นปริมาณ 0.25, 0.08 และ 0.007 % โดยน้ำหนักสกัดหยาบตามลำดับ สาร malyngamide X มีฤทธิ์ความเป็นพิษอย่างแรงต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ NCL-H187 โดยมีค่า ED_{50} 0.86 และ 1.20 μM ตามลำดับ สาร deacetylhectochlorin แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีค่า ED_{50} = 0.31 และ 0.32 μM ตามลำดับ [9] นอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ต้านมาลาเรีย และ *mycobacterium tuberculosis* [13]



3

4 R=COCH₃

5 R=H

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างกระด่ายทะเล *Bursatella leachii* เก็บตัวอย่างด้วยมือ จากบริเวณชายหาดบางแสน ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 โดยหลังจากที่เก็บตัวอย่างได้นำตัวอย่างล้างด้วยน้ำทะเลเพื่อกำจัดทราย จากนั้นนำไปแช่ในตู้แช่แข็งภายใต้อุณหภูมิ -20°C เก็บจนกระทั่งกระบวนการสกัด

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นโดยการใช้การเทียบลักษณะภายนอกของกระด่ายทะเลกับรายงานการศึกษาเดิม

2. เครื่องมือและอุปกรณ์สารเคมี

2.1 สารเคมี

- 2.1.1) Methanol
- 2.1.2) Dichloromethane grade AR
- 2.1.3) Ethyl acetate
- 2.1.4) Hexane grade AR
- 2.1.5) Butanol
- 2.1.6) TLC silica gel ยี่ห้อ silicycle ultrapure silica gels
- 2.1.7) Sephadex LH-20
- 2.1.8) Anisaldehyde reagent
- 2.1.9) Dimethyl sulfoxide-d₆ (DMSO d₆)
- 2.1.10) Chloroform-d (CDCl₃)

2.2 เครื่องมือ

- 2.2.1) เครื่อง freeze dry ยี่ห้อ LABCON รุ่น LCC-1 7382030
- 2.2.2) เครื่อง rotary evaporator ยี่ห้อ Buchi Multivator รุ่น p-6
- 2.2.3) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น MS 30026
- 2.2.4) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น MS 204
- 2.2.5) เครื่อง NMR 400 MHz (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)
- 2.2.6) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometry) ยี่ห้อ CAMA6
- 2.2.7) เครื่อง FI-IR รุ่น NICOLET 6700

3 การเตรียมสารสกัด

3.1 ขั้นตอนการทำแห้งด้วยวิธีแช่แบบเยือกแข็ง

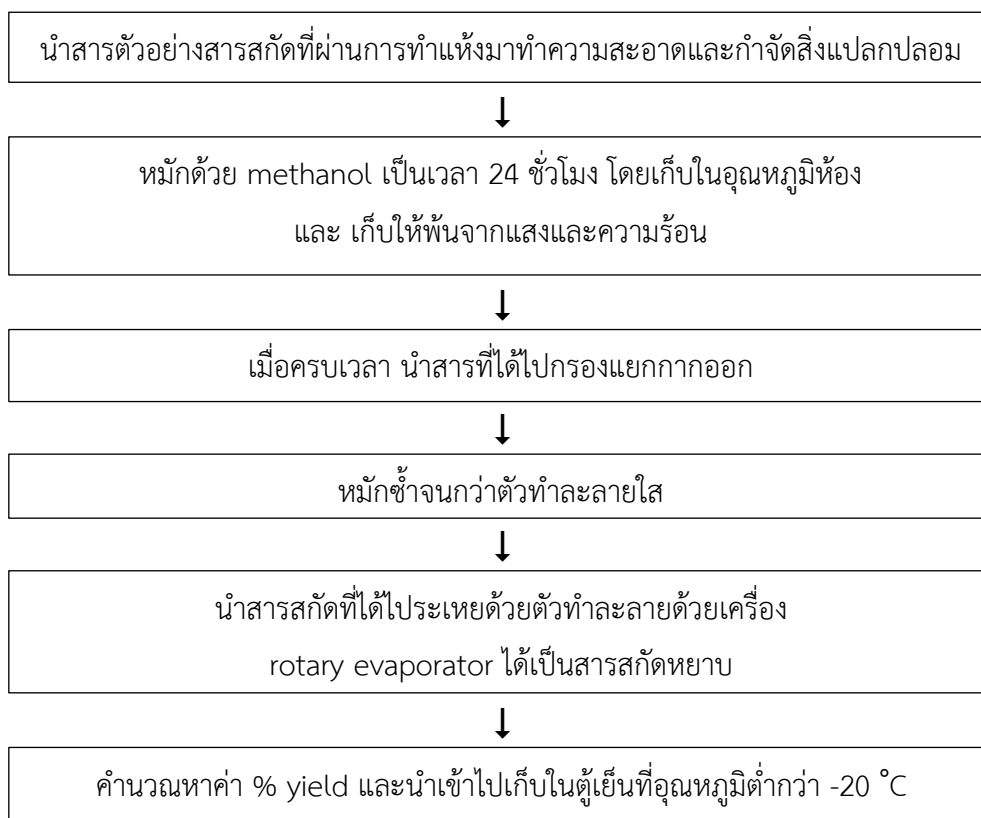
แยกส่วนของอวัยวะภายใน และ เปลือก (mantle) ออกจากกัน จากนั้นหั่นย่อยให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปแช่เยือกแข็งและทำให้แห้งโดยระบบสุญญากาศ (freeze dehydration หรือ lyophilization) ที่อุณหภูมิ -97°C ที่ความดัน 0.05 mbar

3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัด

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาหมักด้วย methanol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บในอุณหภูมิห้อง และเก็บให้พ้นแสง จากนั้นเมื่อครบเวลาจึงนำมากรองแยกกาก และหมักซ้ำจนกว่าตัวทำละลายใส ต่อมานำสารสกัดที่ได้รวมกันและระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้เป็นสารสกัดหยาบ methanol เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะถึงกระบวนการสกัดแยก

คำนวณหาค่า % yield ของสารสกัดเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดที่ได้กับปริมาณสารตั้งต้น

$\% \text{ yield (w/w)} = (\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัด} / \text{น้ำหนักเปียกของตัวอย่างกระต่ายทะเล}) \times 100$

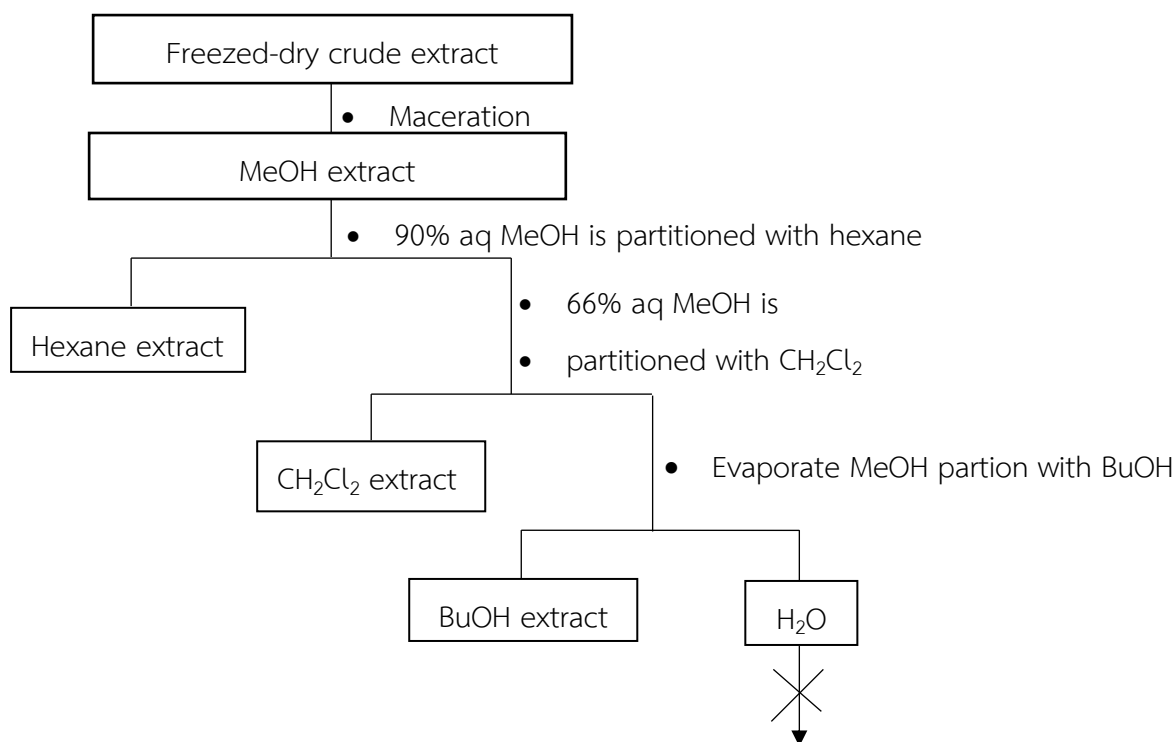


รูปที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัด

4. การสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction)

นำสารสกัด Methanol มาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ hexane ,dichloromethane และ butanol โดยใช้วิธีการสกัดแปลงมาจาก Kupchan *et al.*, 2008 [11]

- 1) นำสารสกัด Methanol มาละลายด้วยด้วย 90% aq methanol
- 2) นำสารละลายใส่ลงไปในกรวยแยก (separating funnel)
- 3) สกัดแยกด้วย hexane
- 4) ไขเก็บสารละลายชั้น hexane
- 5) นำสารชั้น 90% aq methanol มาสกัดซ้ำด้วย hexane จนกว่าชั้น hexane ใส นำสารละลาย hexane ที่ได้ทั้งหมดมาเทรวมกันแล้วนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator
- 6) นำสารสกัดส่วน 90% aq methanol ที่เหลือไปเจือจางด้วยน้ำเพื่อให้ได้เป็น 66% aq methanol
- 7) สกัดด้วย dichloromethane ไขเก็บชั้น dichloromethane สกัดต่อจนกว่าจะได้ชั้น dichloromethane ที่ใส
- 8) นำสารละลายชั้น dichloromethane มารวมกัน จากนั้นนำไประเหยแห้ง
- 9) นำ 66% aq methanol ที่เหลือไประเหยตัวทำละลาย methanol ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator แล้วนำส่วนที่เหลือมาสกัดแยกด้วย butanol จนกว่าสารละลายชั้น butanol ใสได้เป็น สารละลาย butanol และชั้นน้ำ
- 10) นำสารละลายชั้น butanol มารวมกัน จากนั้นนำไประเหยแห้งใช้เครื่อง rotary evaporator



รูปที่ 5 การสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย ดัดแปลงมาจาก Kubchan et al., 2008

5. การตรวจสอบและติดตามสารเคมี

นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละชั้นมาตรวจสอบสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ SiO₂ 5% MeOH ใน CH₂Cl₂ จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วย UV Visible spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm และใช้ spraying reagent ได้แก่ anisaldehyde

6. การสกัดแยกด้วย vacuum chromatography

นำสารสกัดในชั้น dichloromethane ที่มีน้ำหนัก 5.11 g มาละลายด้วย dichloromethane แล้วบดเข้ากับ silica gel ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อระเหย organic solvent หลังจากนั้นสกัดแยกให้เป็นแต่ละ fraction ด้วยวิธี vacuum chromatography โดยใช้ Silica gel 60 โดยใช้คอลัมน์เป็น ROBU GLASFILTER 1000 mL ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลายคือ 5% MeOH ใน CH₂Cl₂, 10% MeOH ใน CH₂Cl₂, 30% MeOH ใน CH₂Cl₂, 50% MeOH ใน CH₂Cl₂ จะคอลัมน์ตามลำดับจนกระทั่งไม่มีสารติดอยู่บน silica gel หลังจากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วติดตามสารในแต่ละ fraction ด้วยการทำให้ TLC silica gel โดยใช้ mobile phase 10% MeOH ใน CH₂Cl₂ แล้วรวม fraction ที่มี spot บน TLC ใกล้เคียงกัน นำ fraction ที่รวมกันแล้วมาระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator อีกครั้งจนได้

crude extract แล้วระเหยแห้งในระบบสุญญากาศ (freeze dry) ที่อุณหภูมิ -97°C และ ที่ความดัน 0.005 psi ชั่งน้ำหนักในแต่ละ fraction ติดตามสารสำคัญด้วย TLC โดยใช้ UV-visible spectrophotometry ที่มีความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm และพ่นด้วย anisaldehyde agent อีกครั้ง

7. การแยกสารด้วย flash column chromatography

นำสารสกัด BURI2 น้ำหนัก 0.3450 g ที่ได้จากการสกัดแยกด้วย vacuum chromatography มาสกัดแยกด้วยวิธี flash column chromatography โดยใช้ silica gel 60 ปริมาณ 120 mg และชะด้วยตัวทำละลาย MeOH : EtOAc : CH_2Cl_2 สัดส่วน 5 : 40 : 65 ภายใต้ความดัน เก็บ fraction ตามสีที่ปรากฏ โดยค่อย ๆ ปรับเพิ่มความเข้มข้นของ mobile phase และเพิ่มขึ้นจากอัตราส่วน 5 : 40 : 55 เป็น 10 : 40 : 50 , 20 : 40 : 40 และ 30 : 40 : 30 ตามลำดับ ล้างด้วย 50% MeOH ใน ติดตามสารแต่ละ fraction ด้วย TLC silica gel โดยใช้ mobile phase 10% MeOH ใน CH_2Cl_2 และ ใช้ UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm และ ตรวจสอบคุณสมบัติสารเบื้องต้นด้วย anisaldehyde spray reagent ทำการรวม fraction ที่มี spot บน TLC คล้ายกันรวมเข้าด้วยกัน

8. การแยกสารสกัดโดยใช้ Sephadex LH20

การแยก Sephadex LH20 เป็นการแยกด้วยวิธี size exclusion โดยนำส่วนสกัด BURI2 fraction ที่ 8 ปริมาณ 0.0375 g มาแยกด้วย sephadex LH-20 column chromatography โดยใช้ methanol เป็นตัวชะสาร (eluting solvent) เก็บ fraction ตามสีที่ปรากฏ ชะจนกระทั่งไม่มีสารติดอยู่บน Sephadex จากนั้น ติดตามสารสำคัญด้วย TLC Silica gel โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมคือ 10% MeOH ใน CH_2Cl_2 และ ใช้เครื่อง UV Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ spot เหมือนกัน ต่อมานำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dry และนำไปติดตามสัญญาณ

$^1\text{H-NMR}$ 400 MHz โดยใช้ CDCl_3

พิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ สารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้นำมาพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี คือ เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนตัสเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy , NMR)

9. การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์

1. Ultraviolet Visible spectrophotometer (UV-VIS) : ใช้หา Maximum absorption wave length (λ_{max})
2. Infrared spectrophotometer (IR) : ตรวจสอบประเภทของ Functional group
3. Mass spectrophotometer : บอกน้ำหนักโมเลกุล
4. Proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C -NMR) spectra บอกชนิดของอะตอมไฮโดรเจนในโมเลกุล และชนิดของอะตอมคาร์บอน

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างกระต่ายทะเล *Bursetella leachii*

กระต่ายทะเล *Bursetella leachii* เก็บได้จากบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีน้ำหนักเปียกทั้งหมด 995.03 g โดยกระต่ายทะเลสายพันธุ์นี้มีลักษณะผิวสีน้ำตาลเข้ม จุดสีฟ้า มีหมึกสีม่วงเข้ม ซึ่งถูกเก็บในช่วงเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2559 และแช่แข็งในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20°C ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และเปรียบเทียบลักษณะกับรายงานวิจัย Suntornchashweij S et al., 2007

2. ผลการเตรียมสารสกัด



รูปที่ 6 ลักษณะบนผิวหนังของกระต่ายทะเล *Bursatella leachii*

แยกส่วนประกอบของกระต่ายทะเล ได้แก่ อวัยวะภายใน เปลือก และส่วนน้ำที่ออกมาจากกระต่ายทะเล โดยนำส่วนอวัยวะภายในและเปลือกไประเหยแห้งในเครื่อง freeze dry ได้น้ำหนักแห้งของอวัยวะภายใน 493.95 g และน้ำหนักแห้งของเปลือก (ชั้น mantle) เท่ากับ 148.88 g และหมักด้วย methanol ได้สารสกัดหยาบของอวัยวะภายใน 84.00 g และ ส่วนเปลือกเท่ากับ 15.79 g

ตารางที่ 2 แสดงผลการสกัดกระต่ายทะเล ด้วยวิธีการหมักด้วย methanol และค่า % yield

ตัวอย่าง	น้ำหนักแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด Methanol (g)	% yield	ลักษณะสารสกัด
เครื่องใน	493.95	84.00	17.00	สีดำข้นเหนียว
เปลือก	148.88	15.79	10.60	สีดำข้นเหนียว

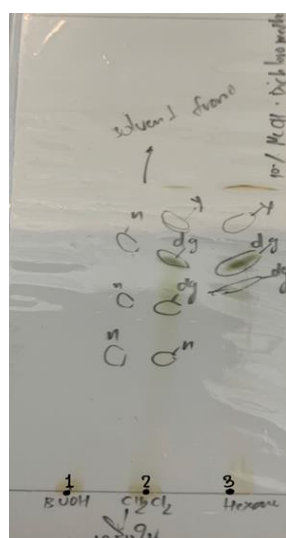
3. การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction)

นำส่วนเครื่องในมาทำการสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลาย hexane, dichloromethane, butanol โดยพบว่าส่วนเครื่องในและและเปลือกให้ปริมาณสารสกัดชั้น hexane มากที่สุดคือ 12.53 g ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการละลายเป็นสัตว์ที่มีองค์ประกอบกลุ่ม steroid, fatty acid ปริมาณมาก ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีขั้วต่ำ รองลงมาคือสารสกัดชั้น dichloromethane และ butanol ที่มีปริมาณ 5.11 g และ 2.92 g ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักในแต่ละชั้นของสารสกัด และ % yield

สารสกัด	ส่วนเครื่องใน			ส่วนเปลือก		
	รหัส	น้ำหนักสาร (g)	% yield	รหัส	น้ำหนักสาร (g)	% yield
hexane	BURI-1	12.53	20.96	BURM-1	3.03	19.18
dichloromethane	BURI-2	5.11	8.31	BURM-2	0.57	6.33
butanol	BURI-3	2.92	4.86	BURM-3	0.97	6.14

นำสารสกัดแต่ละชั้นมาทดสอบด้วยเทคนิค Thin layer chromatography โดยมี stationary phase เป็น silica gel ที่เคลือบอยู่บนแผ่นอะลูมิเนียม และ mobile phase ที่เหมาะสมที่สุดคือ 10 % MeOH ใน CH_2Cl_2 เนื่องจากสารสามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน และมีค่า R_f ที่เหมาะสม พบว่าสารสกัดในชั้น dichloromethane มีจำนวนสารสำคัญมากที่สุดถึง 4 spot และเมื่อนำไปพ่น anisaldehyde spray ให้ผล negative ด้วย



รูปที่ 7 แสดงผลวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารสกัดชั้นต่าง ๆ (SiO_2 : 10% MeOH ใน CH_2Cl_2)

1. สารสกัด butanol, 2. สารสกัด dichloromethane, 3. สารสกัด hexane

ติดตามสารเคมีด้วยเทคนิค NMR พบว่า สารสกัดจากเครื่องในและเปลือกของกระต่ายทะเลในสารสกัดแต่ละชนิด ไม่แตกต่างกัน ดังรูป ก.1.1 และ ก.3.2

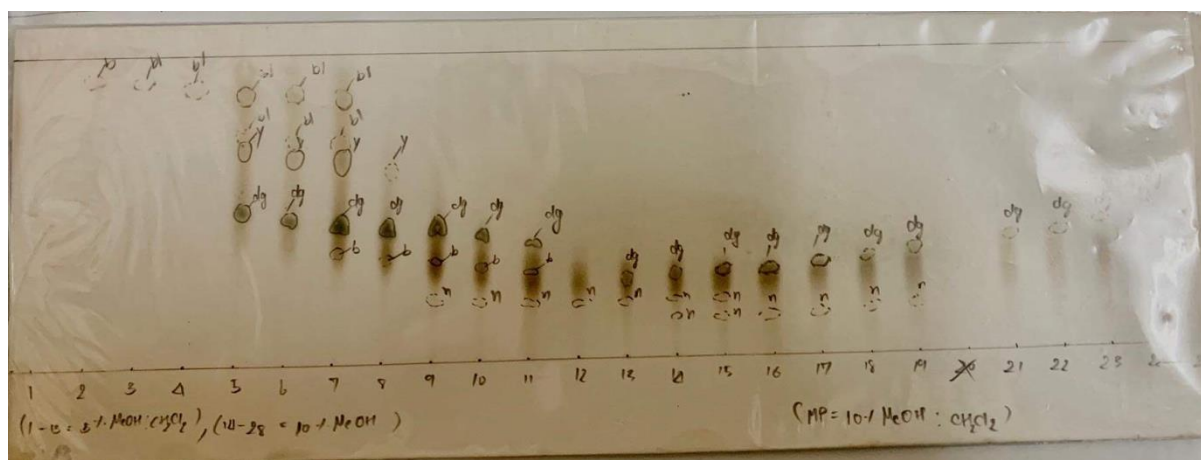
เมื่อพิจารณาปริมาณสารสกัดซึ่งส่วนเครื่องในมีปริมาณมากกว่าส่วนของเปลือก จำนวนองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค TLC และสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ ที่แสดงสัญญาณในช่วง 4-7 ppm ซึ่งแสดงถึงองค์ประกอบทางเคมี ที่มีพันธะคู่ และหมู่ aromatic ซึ่งเป็นกลุ่ม pharmacophore ที่สำคัญ จึงเลือกสารสกัดชั้น dichloromethane ของส่วนเครื่องในขั้นตอนต่อไป

4.4 แยกสารด้วย vacuum chromatography

นำสารสกัดในชั้น dichloromethane จากส่วนเครื่องในน้ำหนัก 5.11 g สกัดแยกด้วยเทคนิค vacuum chromatography โดยนำสารสกัดบดผสมกับผง silica gel ปริมาณเล็กน้อยและทำให้แห้ง จากนั้น 370.10 g ลงใน column หรือ sinterater funnel ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 cm ชะด้วยตัวทำละลาย MeOH : EtOAc : CH_2Cl_2 ในอัตราส่วน 5 : 40 : 55 ได้ทั้งหมด 7 fractions (BURI-1 – BURI-7) ดังตาราง ที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักของสารสกัดแต่ละส่วนที่แยกโดย vacuum chromatography

รหัส	Fractions	น้ำหนักสารสกัดแห้ง (g)
BURI1	5-8	0.3450
BURI2	9-11	0.0700
BURI3	12-15	0.0800
BURI4	16-19	0.0800
BURI5	21-23	0.1300
BURI6	24-29	0.1800
BURI7	30	0.2200



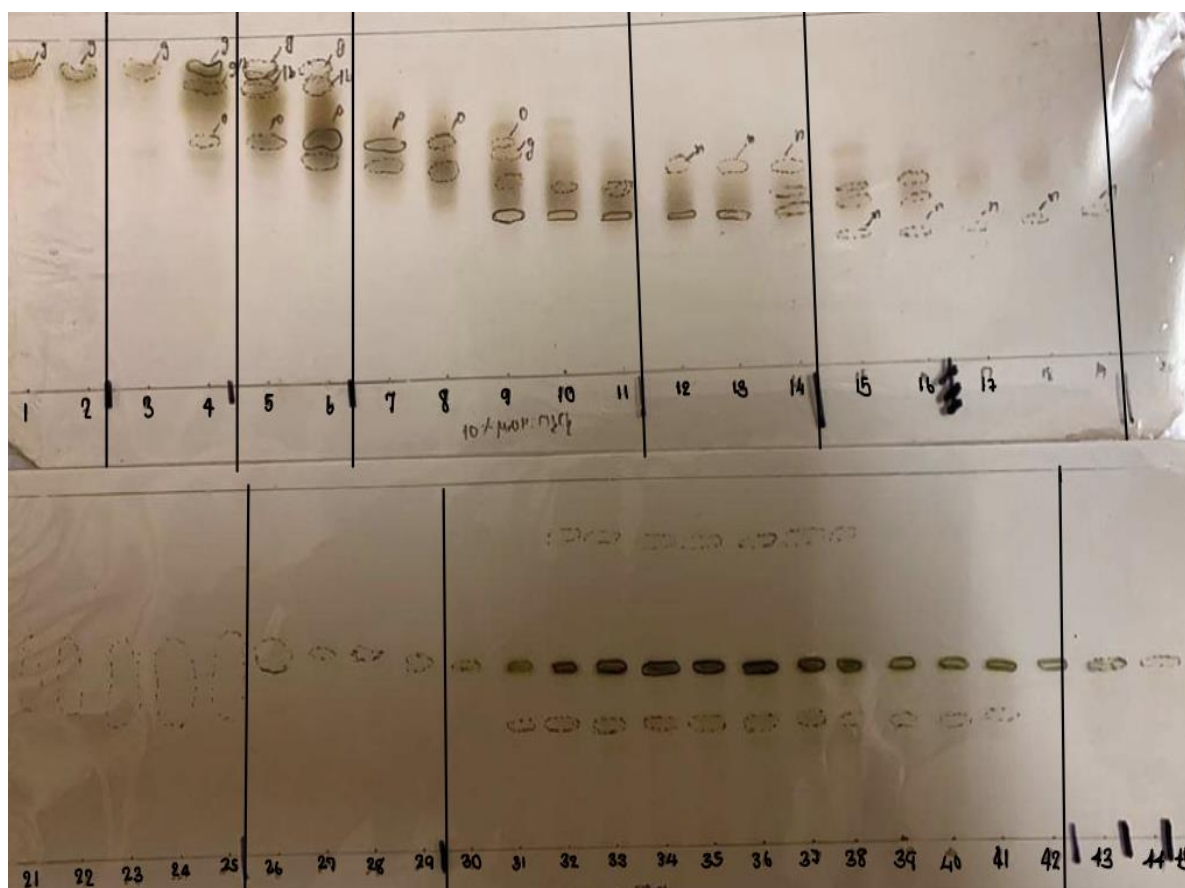
รูปที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC ของ BURI1-BURI7 (SiO_2 :10% MeOH ใน CH_2Cl_2)

5. แยกสารด้วย flash column chromatography

นำสารสกัด BURI1 0.3450 g ที่ได้จากการสกัดแยกด้วย vacuum chromatography มาสกัดแยกด้วยวิธี flash column chromatography โดยใช้ silica powder 60 ปริมาณ 120 mg และ ชะด้วยตัวทำละลาย MeOH : EtOAc : CH_2Cl_2 ในอัตราส่วน 5 : 40 : 55 เก็บ fraction ตามสีที่ปรากฏ โดยค่อย ๆ ปรับ mobile phase เพิ่มขึ้นจาก 5 : 40 : 55 เป็น 10 : 40 : 50, 20 : 40 : 40 และ 30 : 40 : 30 ตามลำดับ แล้วชะสารด้วย 50% MeOH ใน CH_2Cl_2 ได้ทั้งหมด 11 fractions (BURI1-2 – BURI1-11) นำ fraction ที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator แล้วติดตามสารแต่ละ fraction ด้วย TLC silica gel โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมคือ 10% MeOH ใน CH_2Cl_2 และ ใช้ UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm และ ตรวจสอบคุณสมบัติสารเบื้องต้นด้วย anisaldehyde spray reagent ทำการรวม fraction ที่มี spot บน TLC คล้ายกันรวมเข้าด้วยกัน เมื่อรวมกันแล้วได้ทั้งหมด 11 fractions

ตารางที่ 5 น้ำหนักของสารแต่ละส่วนที่แยกโดย Flash Column chromatography

รหัส	Fractions	น้ำหนักของสารสกัดแห้ง (g)
BURI 1-2	1-3	0.0128
BURI 1-3	4	0.0255
BURI 1-4	5-6	0.0433
BURI 1-5	7-11	0.1052
BURI 1-6	12-14	0.0217
BURI 1-7	15-19	0.0218
BURI 1-8	20-25	0.0127
BURI 1-9	26-29	0.0398
BURI 1-10	30-42	0.0357
BURI 1-11	43	0.0007



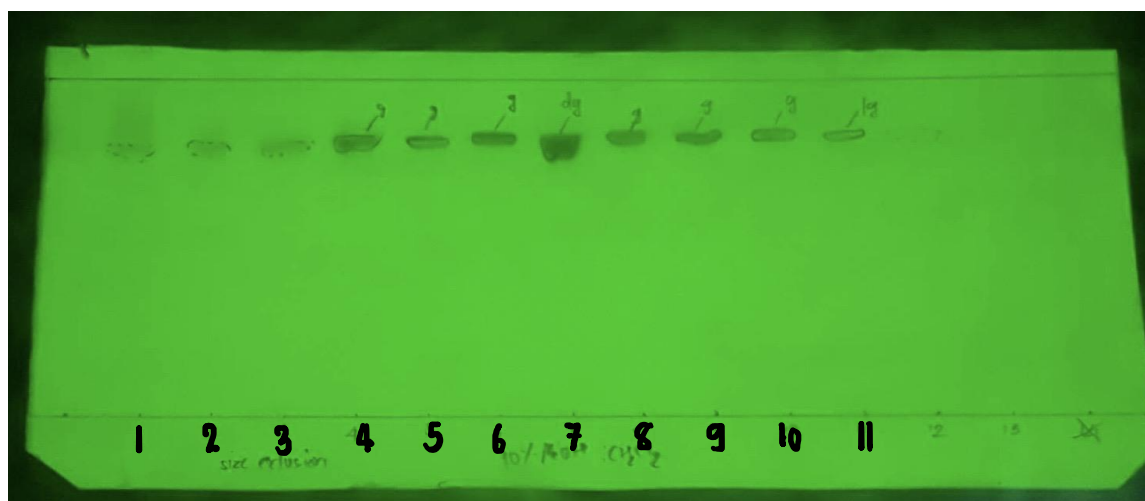
รูปที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC (SiO_2 : 10% MeOH ใน CH_2Cl_2)

6. การแยกสารสกัดโดยใช้ Sephadex LH-20

การแยก Sephadex LH20 เป็นการแยกด้วยวิธี size exclusion โดยนำส่วนสกัด BURI2 ปริมาณ 0.0375 g ที่ได้จากการสกัดด้วย flash column chromatography มาแยกด้วย sephadex LH-20 column chromatography โดยชะด้วย methanol เก็บ fraction ตามสีที่ปรากฏ ชะจนกระทั่งไม่มีสารติดอยู่บน Sephadex ได้ทั้งหมด 8 fractions (ดังตารางที่ 6) จากนั้นติดตามสารสำคัญด้วย TLC Silica gel โดยใช้ mobile phase ที่เหมาะสมคือ 10% MeOH ใน CH_2Cl_2 และ ใช้เครื่อง UV Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm จากนั้นรวม fraction ที่มีลักษณะ spot เหมือนกัน ต่อมานำมาระเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dry และนำไปติดตามสัญญาณ H-NMR 400 MHz โดยใช้ CDCl_3

ตารางที่ 6 น้ำหนักของสารที่ได้จากแยกด้วย Sephadex LH-20

รหัส	Fractions	น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้ (g)
BURI 1-10-1	1-3	0.0202
BURI 1-10-2	4	0.0029
BURI 1-10-3	5-6	0.0031
BURI 1-10-4	7	0.0121
BURI 1-10-5	8-9	0.0028
BURI 1-10-6	10	0.0007
BURI 1-10-7	11	0.001
BURI 1-10-8	12-13	0.0016



รูปที่ 10 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC (SiO_2 :10% MeOH ใน CH_2Cl_2)

7. การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์

พิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ สารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้นำมาพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี คือ เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy , NMR) พบว่าได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 3 รายการได้แก่ BURI 1-11-3, BURI 1-11-4 และ BURI 1-11-5

BURI 1-10-3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum สัญญาณช่วงแสดง 1.357-2.730 ppm บ่งชี้ถึงหมู่ aliphatic พบสัญญาณที่ δ_{H} 3.25 (3H), 3.65 (3H), และ 3.71 (3H) บ่งชี้ถึงหมู่ methoxy จำนวน 3 หมู่ในโครงสร้าง พบสัญญาณช่วง δ_{H} 4.34 (1H) และ 4.49 (1H) แสดงถึง methyl ที่ต่อกับอะตอม O และ N พบสัญญาณที่ δ_{H} 5.11 (1H), 5.26 (1H), 6.17 (1H), และ 6.20 (1H) แสดงถึง alkene proton สัญญาณ δ_{H} 8.01 (1H), 8.26 (1H), 9.39 (1H) และ 9.50 (1H) บ่งชี้ถึงโปรตอนบน heteroatomic ring หรือ conjugate carboxylic acid แต่เนื่องจากข้อมูล IR spectrum พบสัญญาณที่ 1693 cm^{-1} แต่ไม่พบสัญญาณที่บ่งชี้ถึง aromatic ring ดังนั้นสัญญาณที่ δ_{H} 9.39 และ 9.50 จึงอาจเป็น conjugated carboxylic acid

BURI 1-10-4 พบสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ คล้ายกับ BURI 1-10-3 แต่พบสัญญาณ methoxy group ทั้งหมด 4 หมู่ ได้แก่ δ_{H} 3.27 (3H), 3.43 (3H), 3.51 (3H) และ 3.69 (3H) และพบจำนวนโปรตอนในช่วง δ_{H} 1.36-2.73 มากกว่าใน BURI 1-10-3

BURI 1-10-5 พบสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ คล้ายกับ BURI 1-10-3 โดยพบสัญญาณ methoxy group ทั้งหมด 3 หมู่ ได้แก่ δ_{H} 2.73 (3H), 3.27 (3H) และ 3.71 (3H) ซึ่งแตกต่างจาก BURI 1-10-3 บ่งชี้ว่าเป็นสารตัวอย่างคนละรายการ

ทั้งนี้มีสารทั้ง 3 รายการ อยู่ในระหว่างการวิเคราะห์ $^{13}\text{C-NMR}$, 2D NMR และ mass spectroscopy

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างกระต่ายทะเล *Bursatella leachii*

กระต่ายทะเล *Bursatella leachii* เก็บได้จากบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีน้ำหนักเปียกทั้งหมด 995.03 g โดยกระต่ายทะเลสายพันธุ์นี้มีลักษณะผิวสีดำ เข้ม จุดสีฟ้า มีหมึกสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งถูกเก็บในช่วงเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2559 และแช่แข็งในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -20 °C ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยการเก็บตัวอย่างนี้จำเป็นอย่างมากที่จะต้องนำมาเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -20 °C ทันทีเพื่อรักษาสภาพ *Bursatella leachii* จนกว่าจะนำไปทำการสกัด

2. ผลการเตรียมสารสกัด *Bursatella leachii*

จากผลการเตรียมสารสกัดกระต่ายทะเล *Bursatella leachii* ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนอวัยวะภายใน และส่วนของเปลือก ด้วยวิธีหมัก methanol เพื่อทำให้เซลล์ของสิ่งมีชีวิตแตก ทำให้ได้สารสกัดที่มีสีเขียวเข้มถึงดำ และ มีค่า %yield เท่ากับ 17.00% และ 10.60% ตามลำดับ

คำนวณจากสูตร $\% \text{ yield (w/w)} = (\text{น้ำหนักของสารสกัด} / \text{น้ำหนักแห้งของสาร}) \times 100$

3. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid-liquid extraction)

การแยกองค์ประกอบทางเคมีจาก *Bursatella leachii* ด้วยวิธีการ partition ด้วยตัวทำละลายซึ่งแบ่งตามขั้วของสารละลาย สามารถแยกได้ทั้งหมด 3 ชั้นได้แก่ hexane, dichloromethane และ butanol สารสกัดส่วนอวัยวะภายในได้ทั้งหมด 3 ชั้น ได้ $\% \text{ yield} = 20.88, 8.51, \text{ และ } 4.86$ ตามลำดับ สารสกัดส่วนเปลือกชั้นนอกได้ทั้งหมด 3 ชั้น ได้ $\% \text{ yield}$ เท่ากับ 19.18, 6.33 และ 6.14 ตามลำดับ

จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติความมีขั้วของสารด้วยเทคนิค thin layer chromatography ในตัวอย่างสารสกัดส่วนอวัยวะภายใน และ ส่วนเปลือกนั้น มีลักษณะ spot ที่คล้ายคลึงกัน และ เมื่อนำไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm พบว่าส่วนของสารสกัด dichloromethane เป็นส่วนที่มีการแยกของสารชัดเจนมากที่สุดและจากสภาพขั้วปานกลางของ dichloromethane คาดว่าสารสกัด ที่ได้มักเป็นสารที่มีขั้วปานกลาง

สารสกัด hexane เป็นสารสกัดที่มีน้ำหนักมากที่สุด อันเนื่องมาจากกระต่ายทะเลมีสารกลุ่มขั้วต่ำในปริมาณสูงและอาจมีไขมันเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ หากนำมาสกัดแยกอาจได้สารกลุ่ม steroid

สารสกัด butanol เป็นสารสกัดที่มีขั้วสูงอันเนื่องมาจากสามารถละลายได้ดีในน้ำ ซึ่งองค์ประกอบสำคัญของสิ่งมีชีวิตทางทะเลคือสารในกลุ่มของเกลือและกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี และจากคุณสมบัติความมีขั้วที่สูงนี้ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการนำไปแยกองค์ประกอบต่อ เนื่องจากอาจใช้เวลาค่อนข้างนานในการแยก

เมื่อทดสอบคุณสมบัติความมีขั้วของสารในแต่ละชั้นของ สารสกัดตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดได้แก่ส่วนที่ได้จากเครื่องใน และจากเปลือก เมื่อมีการวิเคราะห์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ส่วน มีองค์ประกอบหลักไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ในการวิเคราะห์ยังคงเป็นสารสกัดหยาบจึงทำให้เห็นสัญญาณของสารในปริมาณน้อยได้ไม่ชัดเจน

จากการตรวจสอบสัญญาณพบว่า สารสกัดตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งพบสัญญาณในช่วง 3-4 และ 5-6 ppm ในสารสกัด hexane ในสารสกัดส่วน Butanol พบสัญญาณในช่วง 3-4 ppm และ 5-8 ppm และ ในสารสกัดส่วน dichloromethane พบสัญญาณในช่วง 0.8-2, 3-4, 5-9 ppm ดังภาพผนวกที่ ก.1 ก.2 ก.3 ซึ่งบ่งชี้ว่าสารสกัดชั้นดังกล่าวมีสารที่มี หมู่ methoxy, chromophore ในกลุ่ม amine และ aromatic เป็นส่วนประกอบ

เนื่องจากสารสกัดส่วนของเปลือกมีลักษณะสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ ที่คล้ายคลึงกับส่วนของ สารสกัดส่วนเครื่องในแต่มีปริมาณเพียงเล็กน้อย จึงเลือก สารสกัดส่วนเครื่องในมาทำการสกัดแยกต่อ โดยจากการศึกษาคุณสมบัติความมีขั้วของสาร พบว่าสารสกัดในชั้น dichloromethane มีคุณสมบัติความมีขั้วที่เหมาะสมต่อการนำไปสกัดแยกในขั้นตอนต่อไปมากที่สุด

4. การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี vacuum Chromatography

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีจาก *Bursatella leachii* โดยวิธี column chromatography โดยใช้ระบบ 10% MeOH ใน CH_2Cl_2 ทำให้ได้สารสกัด BUR ทั้งหมด 7 fractions ดังตารางที่ 4

จึงทำการตรวจสอบสารสำคัญด้วย thin layer chromatography และ นำไปส่อง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm พบว่า BUR1 1 มีจำนวนสารที่ดูดกลืนแสงภายใต้แสง UV มากกว่าส่วนอื่นๆ จึงเลือกมาสกัดในขั้นตอนต่อไป

5. การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี flash column chromatography

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีจาก *Bursatella leachii* โดยวิธี column chromatography ทำให้เลือก BURI 1 มาทำการสกัด โดยการชะระบบแบบเพิ่มขีดด้วยระบบ MeOH : EtOAc : CH₂Cl₂ ในอัตราส่วน 5 : 40 : 55, 10 : 40 : 50, 20 : 40 : 40 และ 50 : 40 : 10 ตามลำดับ และแยกเก็บ fractions ตามแถบสีที่ปรากฏได้ทั้งหมด 11 fractions ดังตารางที่ 5 ต่อมาจึงทำการตรวจสอบสารสำคัญด้วยเทคนิค TLC และ นำไปส่องภายใต้แสง UV-lamp พบว่า fractions BURI 1-11 มีจำนวนสารที่ดูดกลืนแสงภายใต้เครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm น้อยกว่า BURI 1-2 และ BURI 1-11 มีสาร 2 ชนิดที่แยกออกจากกันชัดเจนจึงนำมาทำการแยกสกัดในขั้นตอนต่อไป

6. การแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี sephadex LH-20

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีจาก *Bursatella leachii* โดยวิธี flash column chromatography ทำให้เลือก BURI 1-11 มาทำการสกัดด้วยวิธี sephadex ชะด้วย methanol และ แยกเก็บ fractions ตามแถบสีที่ปรากฏ ได้ทั้งหมด 8 fractions ดังตารางที่ 6 ต่อมาตรวจสอบสารสำคัญด้วย TLC ที่ส่องภายใต้แสง UV lamp พบว่าในแต่ละ fractions มีจำนวนสารปนเปื้อนที่ลดน้อยลง และ ¹H-NMR พบว่าในแต่ละ fractions พบสัญญาณปนเปื้อนที่ตำแหน่งอื่น ๆ ลดน้อยลง

จากการตรวจสอบสัญญาณในทั้ง 8 Fractions พบว่า BURI 1-11-3, BURI 1-11-4 และ BURI 1-11-5 มีสัญญาณที่แสดงถึงความบริสุทธิ์ของสาร โดยทั้ง 3 fractions นี้มีลักษณะสัญญาณที่คล้ายคลึงกัน แต่หากสังเกตที่ค่า intégration ของสัญญาณ ในแต่ละ fractions จะเห็นว่าได้ค่าเท่ากับ 20, 12, 9 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่แตกต่างกันจะแสดงให้เห็นถึงจำนวน aliphatics protein ในแต่ละ Fractions ที่ต่างกันโดยบ่งชี้ขนาดของโมเลกุลที่สอดคล้องกับลำดับการแยกด้วย sephadex LH-20 และในทั้ง 3 fractions ข้างต้นมีลักษณะของสัญญาณดังนี้

BURI 1-11-3 พบสัญญาณ ¹H-NMR ที่มีหมู่ aliphatics ตั้งแต่ 1.357-2.730 ppm หมู่ methoxy (OCH₃) ที่ 3.712 ppm หมู่ amine และอนุพันธ์ของ phenol ที่ช่วงตั้งแต่ 5.108-6.324 ppm และ หมู่ aromatic ที่ช่วงตั้งแต่ 8.01-9.50 ppm

BURI 1-11-4 พบสัญญาณ ¹H-NMR ที่มีหมู่ aliphatics ตั้งแต่ช่วง 1.28-2.36 ppm หมู่ methoxy (OCH₃) ที่ 3.27-3.70 ppm หมู่ amine และอนุพันธ์ของ phenol ที่ช่วงตั้งแต่ 5.03-6.34 ppm และ หมู่ aromatic ที่ช่วงตั้งแต่ 7.99-9.56 ppm

BURI 1-11-5 พบสัญญาณ ¹H-NMR ที่มีหมู่ aliphatics ตั้งแต่ช่วง 1.71-2.73 ppm หมู่ methoxy (OCH₃) ที่ 3.15-3.72 ppm หมู่ Amine และอนุพันธ์ของ phenol ที่ช่วงตั้งแต่ 5.11-6.33 ppm methoxy และหมู่ aromatic ที่ช่วงตั้งแต่ 7.99-9.54 ppm

สรุป เมื่อวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ BURI 1-11-1 , 1-11-2 , 1-11-6 , 1-11-7 , 1-11-8 พบว่าสารยังไม่บริสุทธิ์ แต่สามารถนำไปแยกให้บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี High Performance liquid Chromatography และ วิธี preparative TLC ต่อไปได้

เมื่อวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ BURI 1-11-3, 1-11-4 และ 1-11-5 เป็นสาร 3 ชนิดที่แตกต่างกัน พิจารณาได้จาก ค่า integration ของสัญญาณแรก ในแต่ละ fractions จะเห็นว่าได้ค่าเท่ากับ 19.82 , 11.71, 8.81 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาสัญญาณ $^1\text{H-NMR}$ พบว่าทั้ง 3 fractions ปรากฏสัญญาณที่ 1-2.7, 3-6 และ 7-9 ppm ซึ่งบ่งชี้ถึง กลุ่ม aliphatic , methoxy, amine และ aromatic ทั้งนี้สารทั้ง 3 ชนิด อยู่ในระหว่างการแปลผลโครงสร้างทางเคมี

พิสูจน์โครงสร้างด้วย IR spectroscopy พบว่าทั้ง 3 fractions ได้แก่ fractions ที่ BURI1-10-3, BURI1-10-4 และ BURI1-10-5 มีดังต่อไปนี้

BURI1-10-3

พบ C–H aliphatic (alkane), sharp, strong, triplet ที่ความยาวคลื่น 2869.75, 2921.13 และ 2956.54 cm^{-1}

พบ CO_2 , sharp, strong, doublet ที่ความยาวคลื่น 1690 และ 1620.42 cm^{-1}

พบ C=C และ C–C aromatic, sharp, weak, multiplet ในช่วงความยาวคลื่น 1549.97, 1499.20 และ 1458.40 cm^{-1}

BURI1-10-4

พบ C–H aliphatic (alkane), sharp, medium, triplet ที่ช่วงความยาวคลื่น 2871.34 - 2956.26 cm^{-1}

พบ CO_2 , sharp, weak, singlet ที่ความยาวคลื่น 1693.12 cm^{-1}

พบ C–C aromatic, sharp, weak, multiplet ในช่วงความยาวคลื่น 1459.10 – 1541.09 cm^{-1}

BURI1-10-5

พบ C–H aliphatic (alkane), sharp, medium, triplet ที่ความยาวคลื่น 1955.85, 2918.47 และ 2870.49 cm^{-1}

พบ CO_2 , sharp, weak, singlet ที่ความยาวคลื่น 1693.06 cm^{-1}

พบ C–C aromatic, sharp, weak, multiplet ในช่วงความยาวคลื่น 1458.50 – 1542.21 cm^{-1}

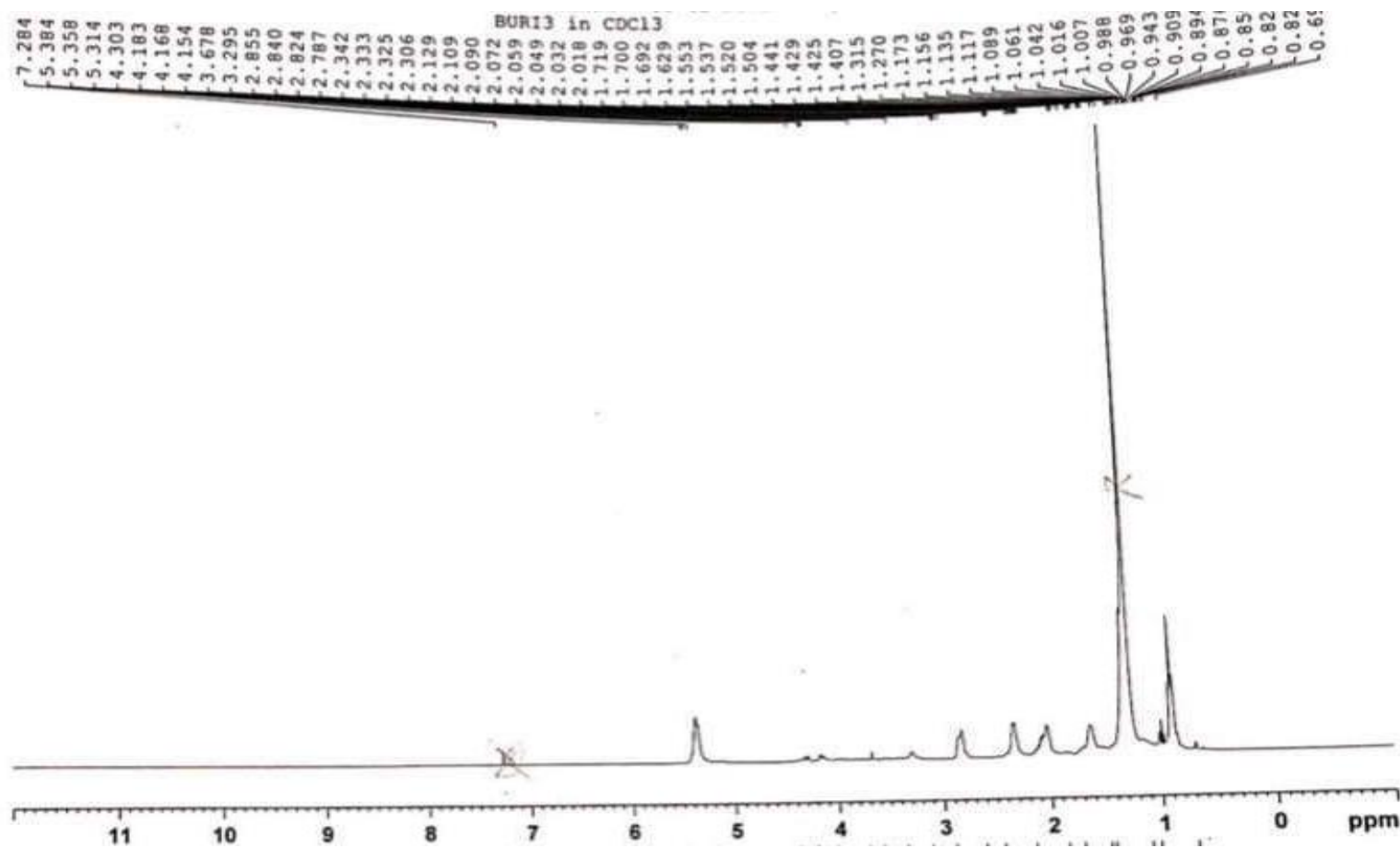
ทั้งนี้สารทั้ง 3 ชนิดอยู่ในระหว่างการแปลผลโครงสร้างทางเคมี

เอกสารอ้างอิง

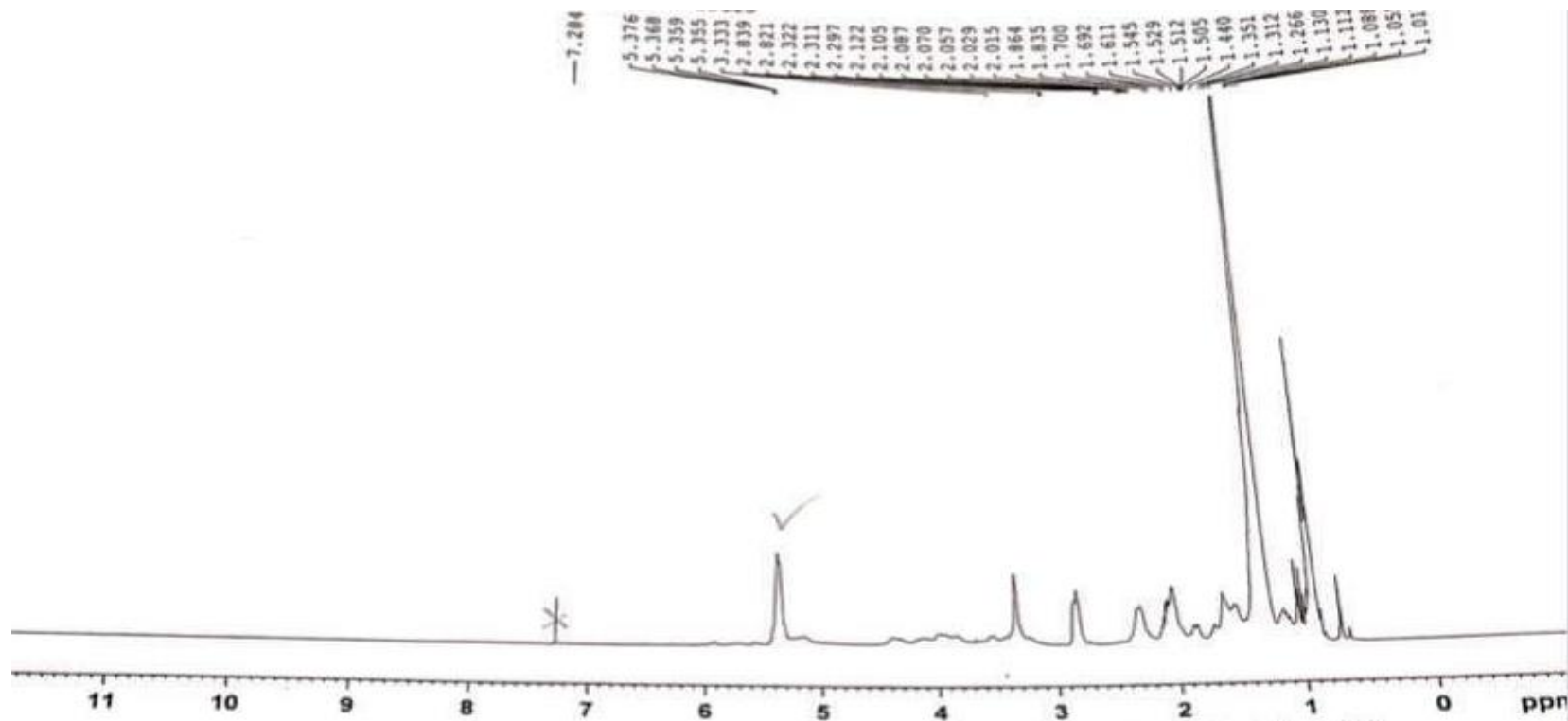
1. Arkronrat W, Oniam V, Najuatul Wahidah Binti Khalid N, Binti Mohamed N. Some biological aspects and rearing of ragged sea hare (*Bursatella leachii* de Blainville, 1817) in the hatchery. Vol. 40, Kasetsart University Fisheries Research Bulletin. 2016. p. 79–87.
2. Stonik VA. Marine natural products: a way to new drugs. Acta Naturae [Internet]. 2009; 1(2): 15–25.
3. Benkendorff K. Molluscan biological and chemical diversity: Secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. Biol Rev. 2010; 85(4): 757–75.
4. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ลักษณะทางทะเลและวิวัฒนาการการประมงในทะเลของไทย 2541 ; Vol 2 : 11-12
5. Suntornchashwej S, Suwanborirux K, Koga K, Isobe M. Malyngamide X: The first (7R)-lyngbic acid that connects to a new tripeptide backbone from the Thai sea hare *Bursatella leachii*. Chem - An Asian J. 2007;2(1):114–22.
6. Braga T, Rodrigues MJ, Pereira H, Varela J, Barreira L, González-Wangüemert M, et al. *Bursatella leachii* from Mar Menor as a Source of Bioactive Molecules: Preliminary Evaluation of the Nutritional Profile, In Vitro Biological Activities, and Fatty Acids Contents. J Aquat Food Prod Technol [Internet]. 2017; 26(10): 1337–50.
7. Appleton DR, Sewell MA, Berridge M V., Copp BR. A new biologically active malyngamide from a New Zealand collection of the sea hare *Bursatella leachii*. J Nat Prod. 2002; 65(4): 630–1.
8. Rajaganapathi J, Kathiresan K, Singh TP. Purification of anti-HIV protein from purple fluid of the sea hare *Bursatella leachii* de Blainville. Mar Biotechnol. 2002; 4(5): 447–53.
9. Suntornchashwej S, Chaichit N, Isobe M, Suwanborirux K. Hectochlorin and morpholine derivatives from the Thai sea hare, *Bursatella leachii*. J Nat Prod. 2005; 68(6): 951–5.
10. Auparakkitanon S. Discovery and development of antiparasmodial compounds in Thailand during the 21st century. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2014; 45(4): 761–82.

11. Morris Kupchan S. Recent advances in the chemistry of terpenoid tumor inhibitors. Pure Appl Chem. 2008; 21(2): 227–46.
12. 12. T.E. Thompson . Biology of the Opithobbranch Mollusc ;1976 Vol 1 : 120-121
13. Studies in natural product chemistry , Marine Cyanobacteria : A treasure Trove of Bioactive Secondary Metabolites for Drug Discovery ,Lik Tong Tan ,National Institute of Education ,Nanyang Technological University ,Singapore ,p.76

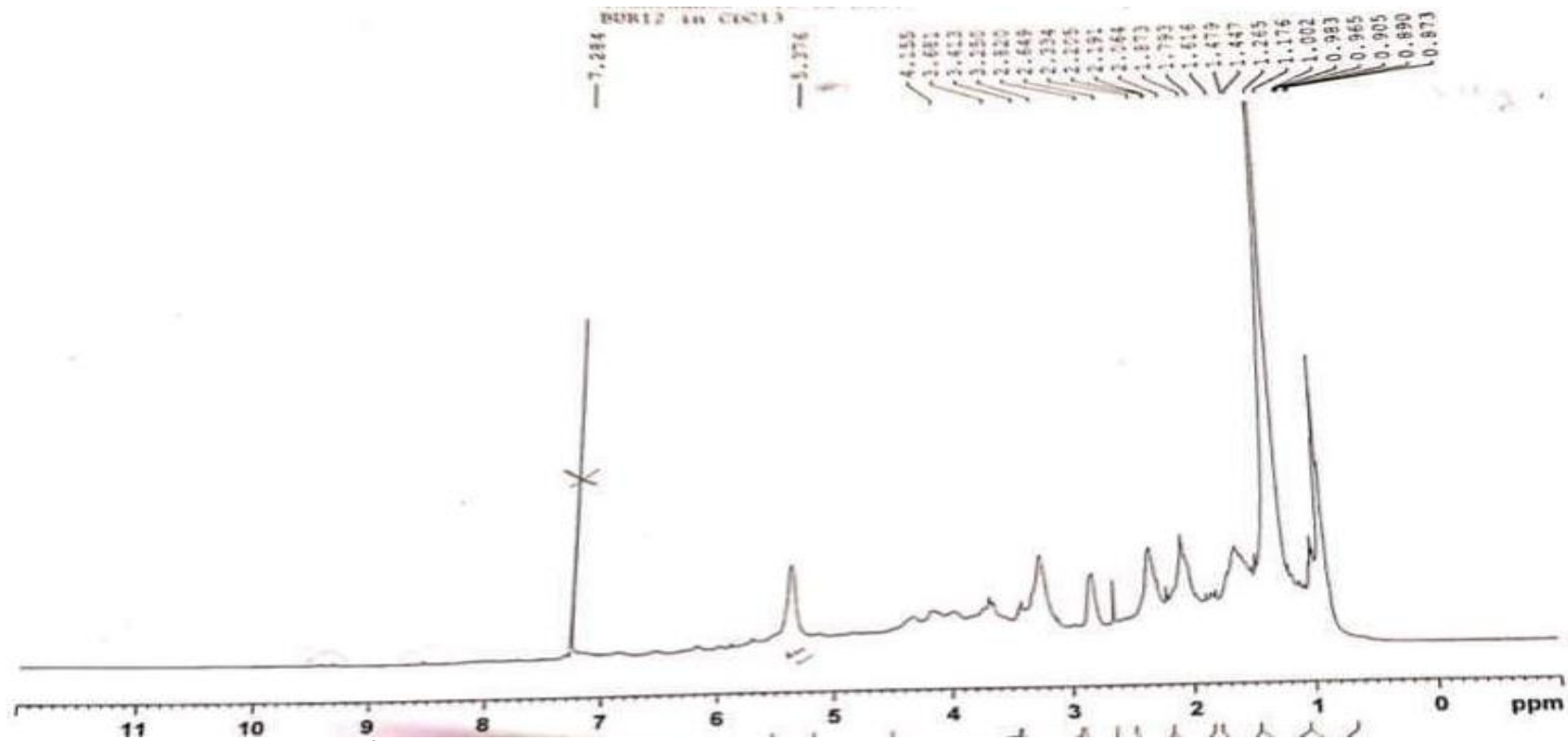
ภาคผนวก



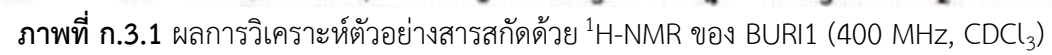
ภาพที่ ก.1.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ¹H-NMR ของ BURI3 (400 MHz, CDCl₃)



ภาพที่ ก.1.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^1H -NMR ของ BURI3 (400 MHz, CDCl_3)



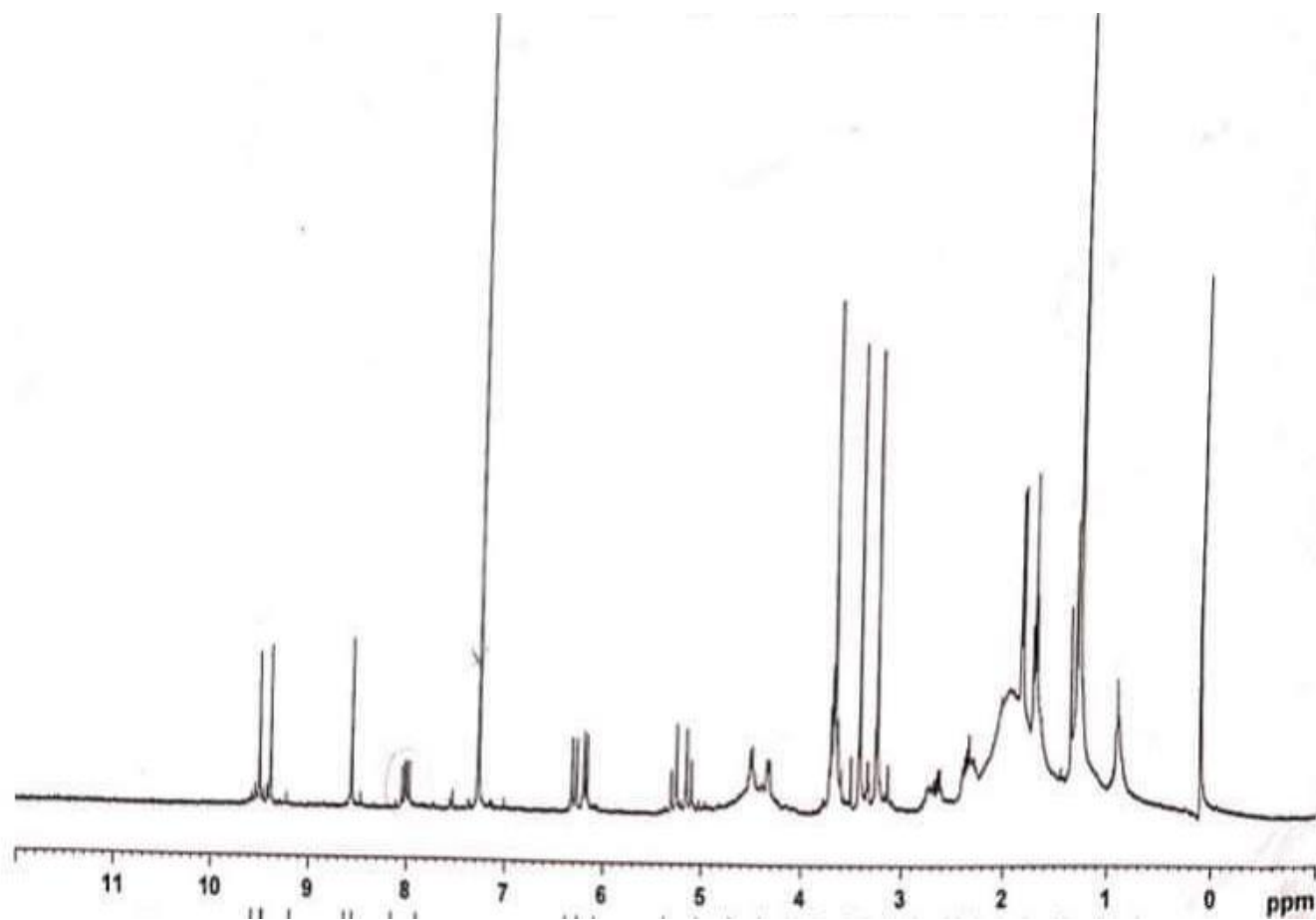
ภาพที่ ก.2.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^1H -NMR ของ BURM (400 MHz, CDCl_3)



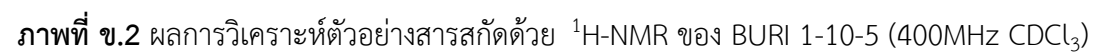
ภาพที่ ก.3.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของ BURI1 (400 MHz, CDCl_3)



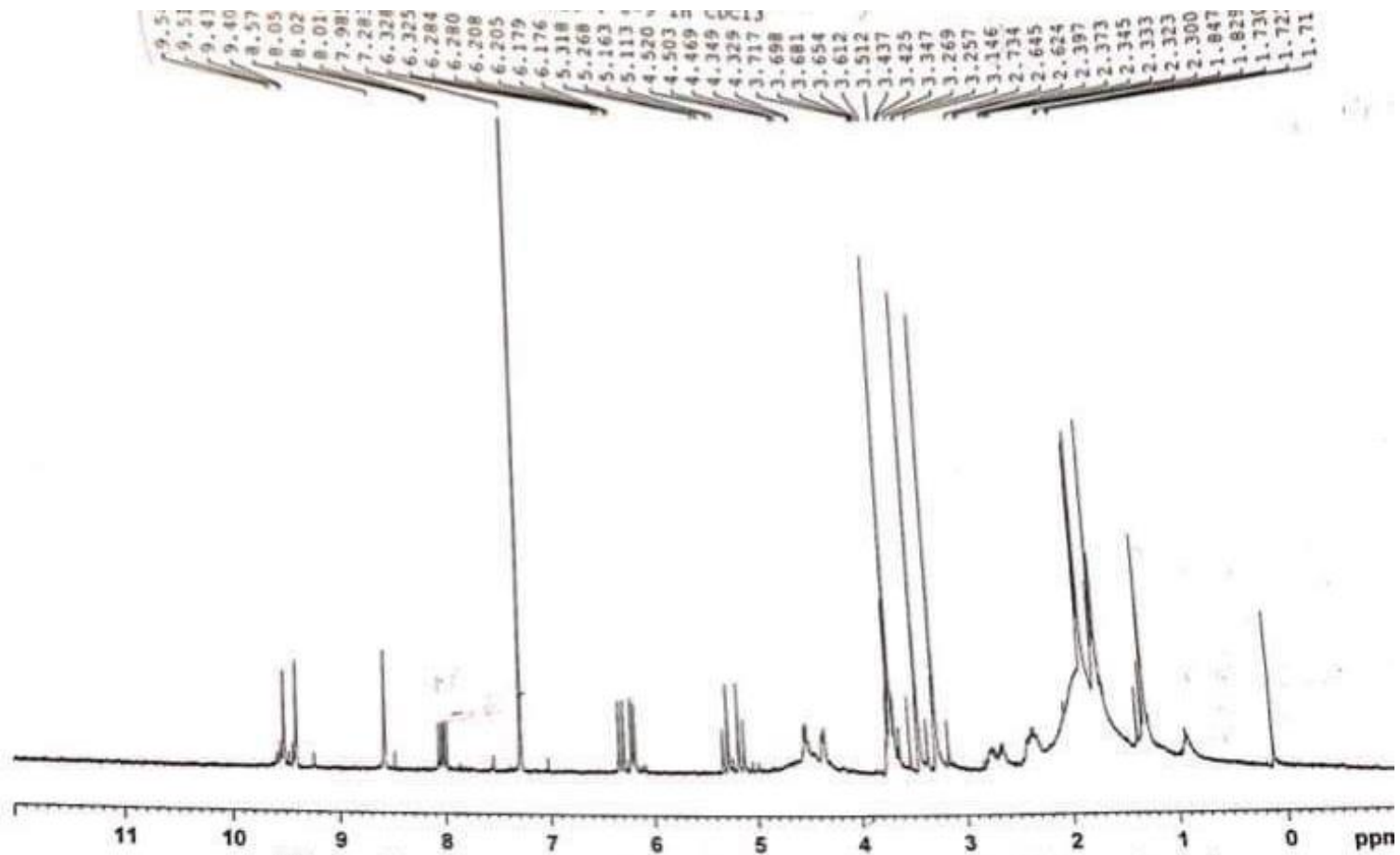
ภาพที่ ก.3.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของ BURM (400 MHz, DMSO d_6)



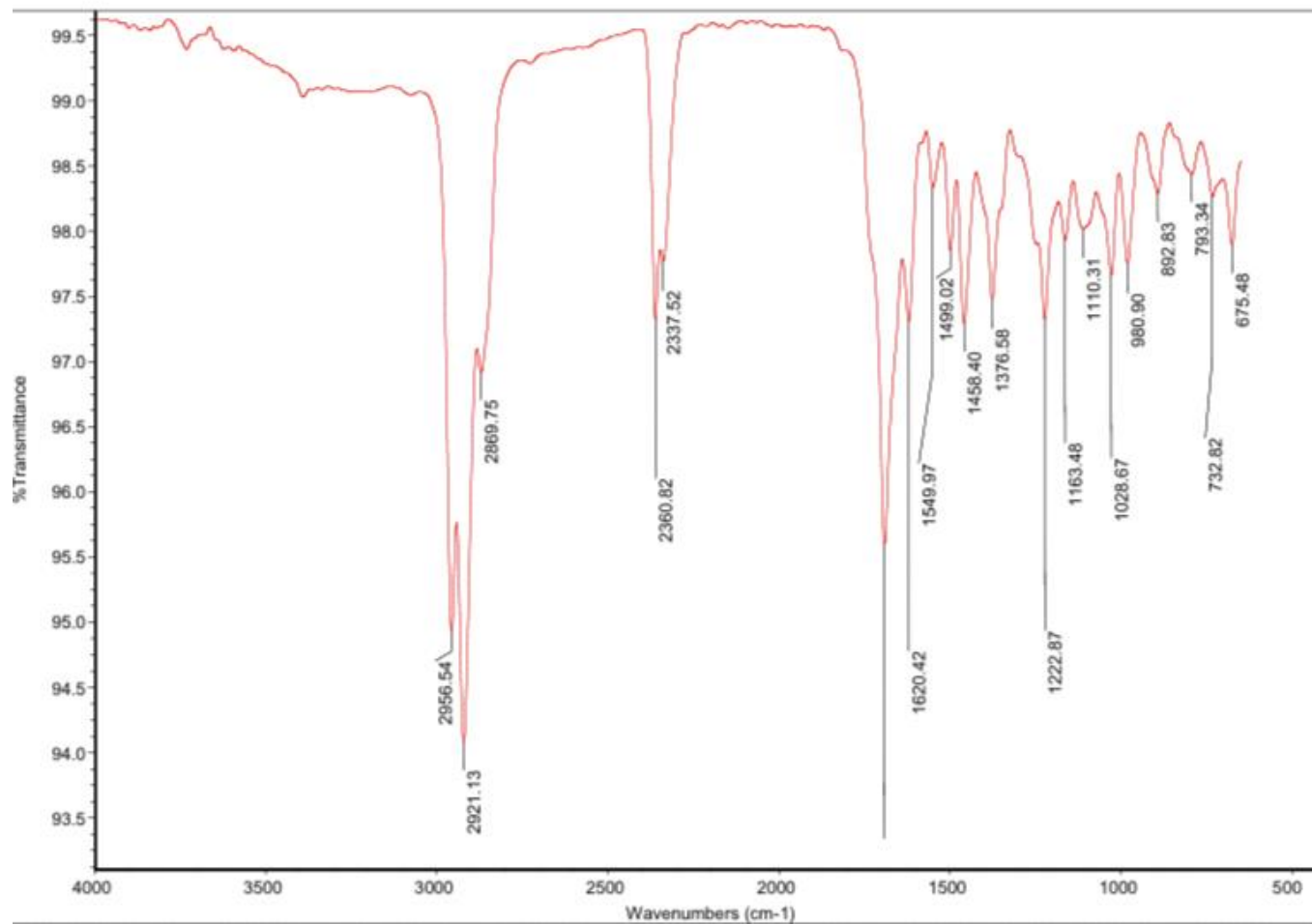
ภาพที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^1H -NMR ของ BURI 1-10-4 (400 MHz, CDCl_3)



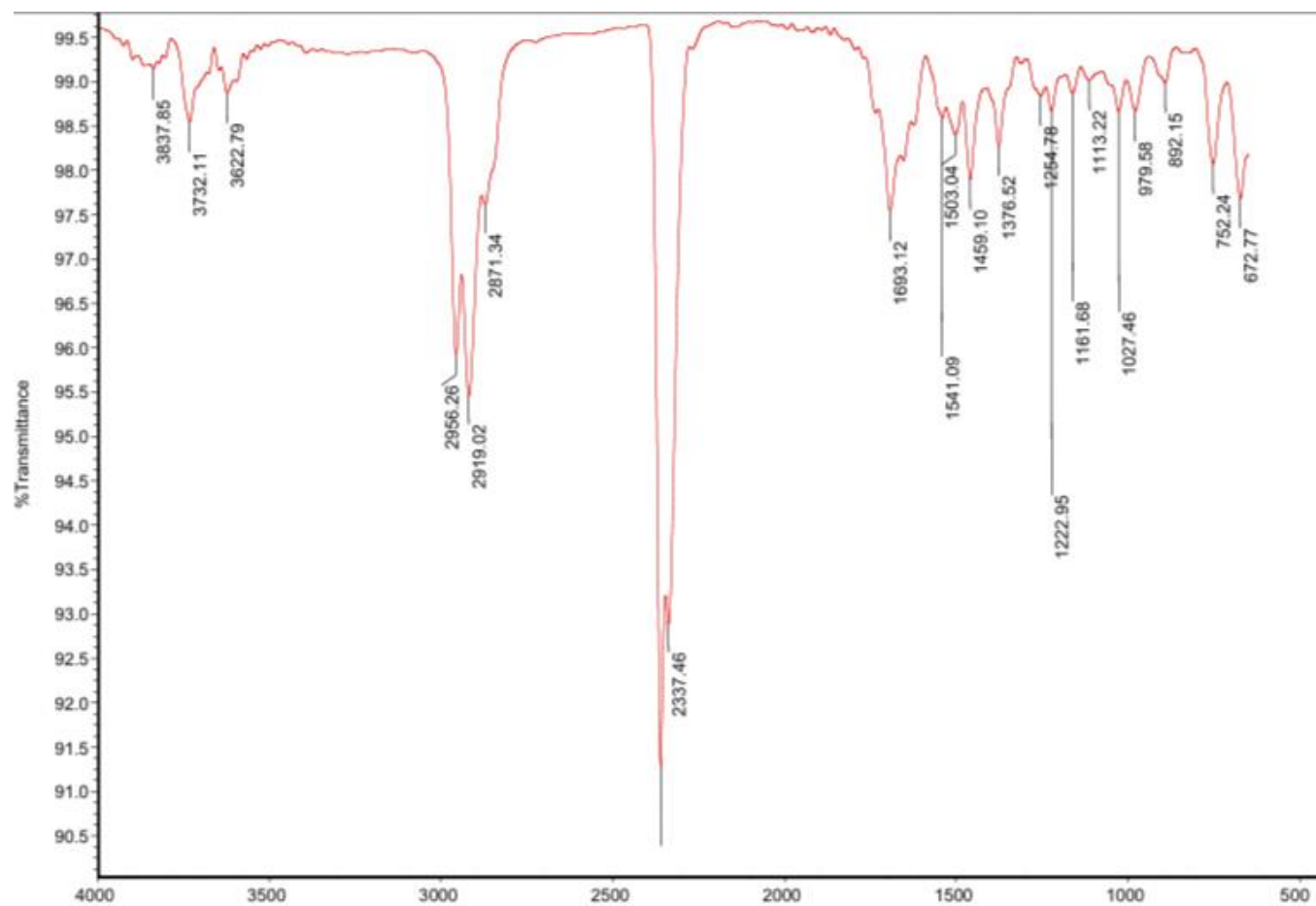
ภาพที่ ข.2 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของ BURI 1-10-5 (400MHz CDCl_3)



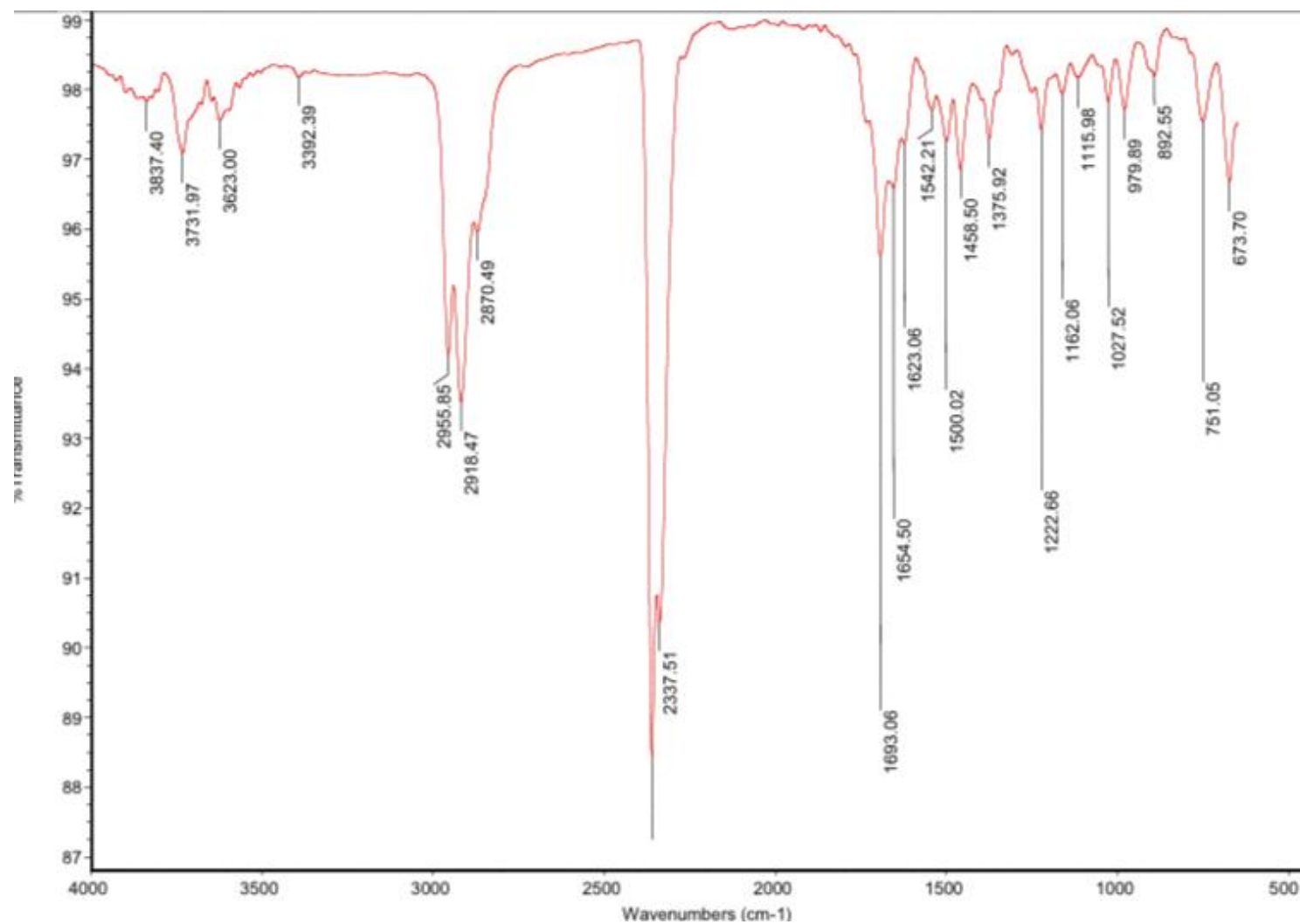
ภาพที่ ข.3 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^1H -NMR ของ BURI 1-10-6 (400MHz, CDCl_3)



ภาพที่ ค.1 พิสูจน์โครงสร้างด้วย infra-red nuclear magnetic ของ BURI 1-10-4 (400MHz, CDCl₃)



ภาพที่ ค.2 พิสูจน์โครงสร้างด้วย infra-red nuclear magnetic ของ BURI 1-10-5 (400MHz, CDCl₃)



ภาพที่ ค.3 พิสูจน์โครงสร้างด้วย infra-red nuclear magnetic ของ BURI 1-10-6 (400 MHz, CDCl_3)