

ความหลากหลายและการสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพของฟองน้ำบริเวณ

แหลมมะขาม อ.สิเกา จ.ตรัง

Diversity and bioactive compounds production of sponges in Makham

Estuary area, Sikao Distric, Trang Province

ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำวิจัย

เนื่องจากฟองน้ำทะเลสร้างสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายจึงได้รับความสนใจประยุกต์ใช้สารเคมีชีวภาพเหล่านี้ในทางการแพทย์ เกษตร และอุตสาหกรรม กันอย่างกว้างขวาง เช่น การพบสารกลุ่มนิวคลีโอไซด์จากฟองน้ำทะเล *Cryptotetya crypta* ซึ่งปัจจุบันถูกพัฒนาให้เป็นยาต้านมะเร็งชื่อ Ara-a, และ Ara-b นอกจากนี้ยังพบสารทุติยภูมิจากฟองน้ำหลายชนิดถูกพัฒนาให้เป็นยาและจำนวนหนึ่งกำลังอยู่ในขั้นทดลองทางคลินิก (ตารางที่ 1) เพื่อพัฒนาเป็นยาบำบัดโรคเช่น มะเร็ง และโรคติดเชื้อต่างๆเช่น วัณโรค, ท้องร่วง, ไข้หวัดและเอ็ดส์ เป็นต้น จากการสำรวจพบฟองน้ำแพร่กระจายในทะเลหลายบริเวณทั่วโลก เช่น ทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยมีข้อมูลความหลากหลายค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับทรัพยากรทางทะเลอื่นๆ

จากโครงการสำรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตในทะเลอันดามัน (ทุน BRN รหัส002G-48) ทีมวิจัยพบการแพร่กระจายของฟองน้ำจำนวนมากบริเวณแหลมมะขาม อ.สิเกา จ.ตรัง ซึ่งเป็นชวากทะเลมีพื้นที่เล็กๆไม่เกิน 4,000 ตารางเมตร มีอาณาเขตติดต่อกับท่าเรือปากเมง แหลมมะขามมีความอุดมสมบูรณ์ของฟองน้ำสูง ทีมวิจัยพบฟองน้ำที่หายากไม่ต่ำกว่า 15 ชนิด เมื่อทำสิ่งสกัดหยาบและทดสอบคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* พบว่าทุกสิ่งสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพอย่างน้อย 1 เชื้อ บางสิ่งสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทดลองอย่างมีประสิทธิภาพ แหลมมะขามเป็นบริเวณที่น้ำจืดจากคลองสิเกาไหลลงมาบรรจบกับทะเลอ่าวสิเกา จึงเป็นบริเวณที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ชุกชุมด้วยทรัพยากรชีวภาพโดยเฉพาะฟองน้ำทะเล ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 – ปัจจุบัน ท่าเรือปากเมงต้องรองรับนักท่องเที่ยวจำนวนมากขึ้นเนื่องจากการเติบโตของอุตสาหกรรมการท่องเที่ยว กิจกรรมขนส่งทางเรือจึงขยายตัวมากเป็นพิเศษ แหลมมะขามจึงได้รับผลกระทบโดยตรงจากกิจกรรมการท่องเที่ยว เช่น การปล่อยของเสียลงสู่แหล่งน้ำ ทำให้คุณภาพสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อการดำรงชีพของฟองน้ำ ประกอบกับปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลความหลากหลายของฟองน้ำที่อยู่อาศัยบริเวณนี้และข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพก็ยังมีน้อยเช่นกัน ทั้งๆที่ฟองน้ำหลายชนิดในพื้นที่นี้ มีศักยภาพในการพัฒนาให้เกิดคุณค่าทางเศรษฐกิจได้โดยการเลี้ยงฟองน้ำเพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น

การเพาะเลี้ยงฟองน้ำ *Haliclona* sp. เพื่อผลิตสารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งชื่อ Salicylhalamide A บริเวณอ่าว Bremer, Hamelin และ เกาะ Rottneest ประเทศออสเตรเลีย (Abdo *et al.*, 2007) และการเลี้ยงฟองน้ำ *Negombata magnifica* เพื่อเพิ่มการผลิตสาร latrunculin เชิงพาณิชย์ในทะเลแดงประเทศอิสราเอล (Hadas *et al.*, 2004) เป็นต้น

ดังนั้นทีมวิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของการจัดเตรียมข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดของฟองน้ำในบริเวณอ่าวมะขาม เพื่อพัฒนาต่อยอดการวิจัยด้านการผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติเพื่อประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ และการอนุรักษ์ทรัพยากรในท้องถิ่น ก่อนได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม

บททวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

ฟองน้ำเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ในไฟลัม Porifera มี 3 ชั้น (Classes) ได้แก่ Demospongia, Calcarea, Hexactinellida ประกอบด้วย 25 ลำดับ (orders) 127 ครอบครัว (Family) และ 682 สกุล ที่ทราบชนิดแล้วประมาณ 8,300 ชนิด แต่ความหลากหลายด้านชนิดคาดว่า มีมากกว่าสองเท่าของปัจจุบัน (Hooper and Van Soest, 2002) ขณะเดียวกันในปัจจุบันมีข้อมูลการแพร่กระจายของฟองน้ำตามสภาพภูมิศาสตร์ต่างๆ น้อยมาก เพราะทะเลบางบริเวณของโลกไม่สามารถสำรวจได้เนื่องจากความทุรกันดารของพื้นที่และสภาพการเมืองของท้องถิ่นนั้นๆ การจัดจำแนกชนิดฟองน้ำใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลักโดยพิจารณาจากรูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัวของโครงสร้างค้ำจุน (Spicules) ในบางกรณีอาจพิจารณาโครงสร้าง หน้าที่และการฟอร์มตัวของเซลล์ (Cytological method) และการสร้างสารเคมี (Chemotaxonomy) ปัจจุบันได้มีการรวบรวมหลักและวิธีการจำแนกชนิดฟองน้ำโดยวิธีการด้านสัณฐานวิทยาและ Cytology ชื่อ Systema Porifera โดย Hooper and Van Soest ในปี 2002 และจัดว่าเป็นคู่มือมาตรฐานการจัดจำแนกฟองน้ำในปัจจุบัน จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยานักวิทยาศาสตร์พบความหลากหลายของฟองน้ำในทะเลเมดิเตอร์เรเนียนมากกว่า 100 ชนิด (Bell and Barns, 2000) บริเวณชายฝั่งของประเทศเคนยา มาดากัสการ์ โมแซมบิกพบ 70 อันดับ 130 ชนิด (Barns and Bell, 2002) และ 150 ชนิด ในบริเวณหมู่เกาะ Dampier ประเทศออสเตรเลีย (Fromont *et al.*, 2006) ทั้งสามรายงานให้ข้อสรุปตรงกันคือฟองน้ำแพร่กระจายได้ดีบริเวณน้ำไหลช้า อย่างไรก็ตามรายงานดังกล่าวไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์เชิงสายวิวัฒนาการได้ (Phylogenetic relationship) จึงมีการใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์โมเลกุลมาแก้ปัญหาทำให้เข้าใจความสัมพันธ์ตามสายวิวัฒนาการมากขึ้น เช่น การวิเคราะห์ mtDNA, rDNA ที่ตำแหน่ง 18S ทำให้สามารถทราบความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการของฟองน้ำในสกุล Crambe, Scopalina และ Halichondria และนำไปสู่การสร้าง genetic marker

ของฟองน้ำสกุล *Crambe* ได้ (Xavier, 2009) และเก็บข้อมูลยีนของฟองน้ำในฐานะข้อมูลซึ่งสามารถดาวโหลดออนไลน์ได้ ที่สำคัญมีสองฐานข้อมูลได้แก่ Sponge Genetree Server และ ฐานข้อมูล PorTOL (Meixner *et al.*, 2007)

เนื่องจากฟองน้ำสร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพก่อโรค ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทดลอง กดภูมิคุ้มกัน จึงมีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตร อย่างกว้างขวางบางชนิดได้รับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (ตารางที่ 1) มีหลายชนิดกำลังอยู่ในขั้นตอนการทดลองทางคลินิก (Mayer and Gustafson, 2006; Jha and Zi Rong, 2004; Mayer and Hamman, 2002; Faulkner, 1997) ยิ่งไปกว่านั้นสารทุติยภูมิจากฟองน้ำยังมีหน้าที่สำคัญต่อระบบนิเวศ (Ecological role) ที่มันอยู่อาศัย เช่น มีความจำเพาะต่อผู้ล่า ป้องกันการเกาะเคลือบ (Antifouling) โดยสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น จนนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารผสมในอุตสาหกรรมสีทาเรือเพื่อป้องกันการยึดเกาะของตัวอ่อนสัตว์ทะเล ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงมุ่งเน้นหาข้อมูลสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าความหลากหลายของฟองน้ำ จนประสบปัญหาไม่สามารถต่อยอดการวิจัยสู่การเพาะเลี้ยง การคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์ ฟองน้ำเพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ปริมาณมากได้ (สารบางชนิดสังเคราะห์ได้ปริมาณน้อยแต่ต้นทุนสูง) ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายควบคู่กับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ เพราะสามารถใช้ในการวางแผนอนุรักษ์ เป็นข้อมูลเพื่อคัดเลือกฟองน้ำและพัฒนาให้เป็นสัตว์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจประจำท้องถิ่นในอนาคตได้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารทุติยภูมิจากฟองน้ำทะเลที่ผลิตเป็นเชิงพาณิชย์

ชื่อสาร	กลุ่มสาร	การประยุกต์ใช้	ราคา	อ้างอิง
Isoaaptamine	Benzonaphthylridine alkaloid	สารต้านมะเร็ง	28 USD/mg	Fedoreev <i>et al.</i> , 1989
Xestospongins C	Macrocyclic bis-oxaquinilizidine	ยากลายกล้ามเนื้อ	*	De Smet <i>et al.</i> , 1999
Dictyostatin	Macrocyclic lactone	มะเร็งปอด และทางเดินปัสสาวะ	*	Isbrucker <i>et al.</i> , 2003
Manoalide	Cyclohexane sesterterpenoids	สารลดการอักเสบ	102.5 USD/10 mg	Merck, 1995

Scalaradial	Scalarane Sesterterpene	ยาต้านการอักเสบ	190 USD/mg	De Carvalho and Jacobs, 1991
Suberic acid	Diterpene bezenoid	ยาต้านการอักเสบ	34.01 USD/5mg	Carroll <i>et al.</i> , 2001

ทฤษฎีสมมติฐาน

8.1 แหลมมะขามเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงเนื่องจากเป็นพื้นที่รองรับการชะล้างแร่ธาตุสารอาหารที่ขนส่งจากภาคพื้นดินมาโดยแม่น้ำ ฟองน้ำทะเลใช้แร่ธาตุสารอาหารเหล่านี้เพื่อการเจริญเติบโต โดยเฉพาะสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำ (Dissolve Organic Carbon, DOC) และสารอินทรีย์แขวนลอย (Particulate Organic Carbon, POC) จึงทำให้ให้ฟองน้ำมีการเจริญเติบโตดีและมีความหลากหลายสูง

8.2 เนื่องจากสภาพแวดล้อมบริเวณแหลมมะขามมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอตามสภาพน้ำขึ้นน้ำลงและการชะล้างจากภาคพื้นทวีปและบริเวณนี้มีผู้ล่ามาก ฟองน้ำจึงมีการปรับตัวทางชีวภาพ โดยการสร้างสารทุติยภูมิที่หลากหลายและสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพสูงในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

8.3 ข้อมูลความหลากหลายและฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกฟองน้ำสำหรับเลี้ยงเพื่อผลิตสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบข้อมูลความหลากหลายของฟองน้ำในแหลมมะขาม อ. สิเกา จ. ตรัง
- ทราบความสัมพันธ์เชิงสายวิวัฒนาการของฟองน้ำแต่ละชนิดในแหลมมะขาม อ. สิเกา จ. ตรัง
- ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดจากฟองน้ำในแหลมมะขาม อ. สิเกา จ. ตรัง

หน่วยงานที่นำการวิจัยไปใช้ประโยชน์

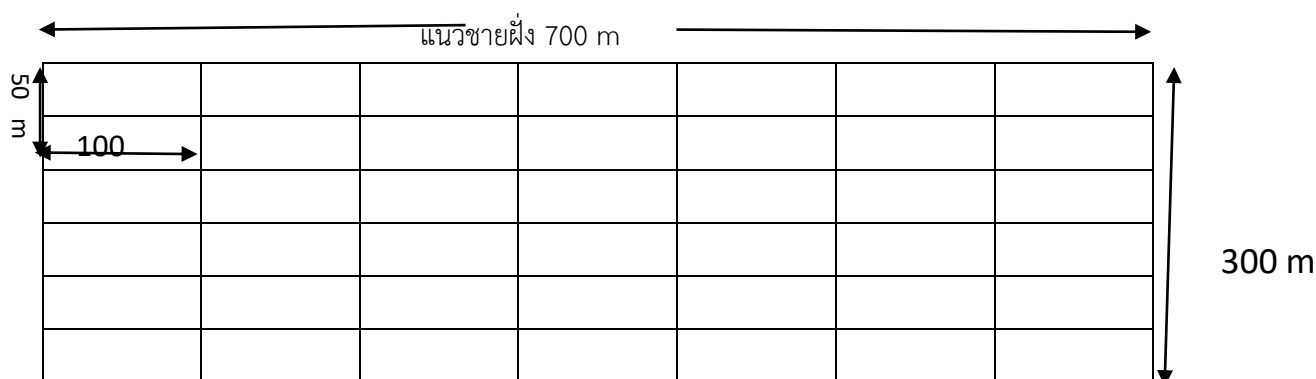
- หน่วยงานการศึกษา ค้นคว้าวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การประมงและเกษตรศาสตร์

- หน่วยงานการศึกษาระดับมหาวิทยาลัยและหน่วยงานวิจัยอื่นๆ

วิธีการดำเนินการวิจัย

13.1 การเก็บและศึกษาตัวอย่างฟองน้ำทะเล

เก็บตัวอย่างฟองน้ำบริเวณแหลมมะขามในวันที่น้ำลงต่ำสุด สุ่มเก็บโดยใช้เฟลมตารางสี่เหลี่ยม (quadrat) ขนาด 0.25 ตารางเมตร กำหนดจุดเก็บตัวอย่างโดยวิธี long line method (ดัดแปลงตามวิธีของ English *et al.*, 1997) โดยกำหนดแนววางเส้นขนานกับชายฝั่ง 8 จุด แต่ละจุดห่างกัน 100 เมตร ระยะทางจากชายหาด 300 เมตร (ถึงร่องน้ำ) สุ่มเก็บตัวอย่างทุกๆ 50 เมตรตามแนวทางเดิน (รูปที่ 1) โดยเลือกวิเคราะห์ทุกโคลนที่มองเห็น เนื่องจากฟองน้ำชนิดนี้เติบโตบนหินแนวปะการังที่มีโคลนจึงใช้วิธีปักหลักไม่เป็นเครื่องหมายสำหรับเก็บครั้งต่อไป มีการถ่ายภาพภาคสนามประกอบการศึกษา



รูปที่ 1 การวางแนวเก็บตัวอย่าง (บริเวณจุดตัดคือพื้นที่เก็บตัวอย่าง)

ตัวอย่าง (เก็บขนาด 5 cm²/ตัวอย่าง) ถูกเก็บในถุงพลาสติกปิดสนิทแช่ในถังน้ำแข็งและแบ่งเป็นสามส่วน ส่วนแรกสำหรับอ้างอิงแช่ในเมทานอลร้อยละ 75 เพื่อเป็น voucher specimens เก็บไว้ที่ สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล มทร. ศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ส่วนที่สองนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -10 °C เพื่อวิเคราะห์ทางเคมีและศึกษาลำดับทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามคู่มือ Systema Porifera และวิเคราะห์ความหลากหลายตามวิธีของ Bell and Barnes (2000)

13.3 การสกัดแยกและการศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิ

ตัวอย่างฟองน้ำ 500 มิลลิกรัมถูกแช่สกัดในเมทานอลปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร (ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนกรองและระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันได้สิ่งสกัดในชั้น aqueous methanol ซึ่งเป็นชั้นที่มีน้ำผสม จากนั้นถูกนำมา partition ด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต (EtOAc) และ บิวทานอล (BuOH) ได้สิ่งสกัด 3 ส่วนคือ สิ่งสกัดในชั้น เฮกเซน (ขั้วต่ำ) เอทิลอะซิเตต (ขั้วกลาง) และ บิวทานอล

(ชั่วสูง) ตามลำดับ ทำการจดบันทึกน้ำหนักของสิ่งสกัดหยาบทั้งสามส่วน สิ่งสกัดในชั่วต่ำจะวิเคราะห์หาองค์ประกอบด้วยเครื่อง GCMS ส่วนชั่วกลางและชั่วสูงจะวิเคราะห์ด้วย LC/MS ข้อมูลที่ได้ถูกเปรียบเทียบกับความเหมือนกับสารที่ทราบชนิดแล้วในฐานข้อมูล willey และ DNP (Dictionary of Natural Products) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณสารจากพื้นที่ใต้เส้นกราฟของ HPLC chromatograms ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Chlomeleon Version 6.80 SR7 มีการวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีบนแผ่น TLC ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ

13.4 วิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบดังต่อไปนี้

- ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของของจุลชีพ (Anti-microbial) : สิ่งสกัดหยาบจะถูกทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, และ *Escherichia coli* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy medium (Sigma, FRG) โดยวิธี agar diffusion ของ Auer kirby-test ซึ่งพัฒนาโดย Traub และคณะ (1998) การทดสอบเบื้องต้น โดยการถ่ายเชื้อ 3-10 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ปริมาณ 4 มิลลิลิตร และบ่มเขื่อนาน 2-5 ชม. โดยเทียบความขุ่นของเชื้อกับ $BaSO_4$ มาตรฐาน ก่อนถ่ายเชื้อลงจานเพาะ เตรียมสิ่งสกัดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 $\mu\text{g}/\text{disc}$ โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมขนาดของบริเวณยับยั้งวัดในหน่วยมิลลิเมตร (mm) โดยกระดาษทดสอบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 mm

- การทดสอบความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม (Brine shrimp lethality assay)

ใช้วิธีการของ Ogunusi and DO sumu (2008) โดยใช้หลอดแก้วขนาดความจุไม่เกิน 3 มิลลิเมตร เตรียมสิ่งสกัด ให้มีความเข้มข้น 10 100 500 และ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ โดยใช้ DMSO และน้ำทะเลอัตราส่วน 1:9 เป็นตัวทำละลายและเป็นกลุ่มควบคุม เติมน้ำเค็ม brine shrimp จำนวน 5 – 10 ตัว/หลอด ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ตรวจนับอัตราการตายที่ 6 และ 24 ชม เพื่อคำนวณค่า IC_{50} โดยโปรแกรม BiodataFit หรือ nonlinear regression program

- ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (โดยห้องปฏิบัติการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ สวทช. ต. คลองหลวง จ. ปทุมธานี) ใช้เซลล์ KB (Human Epidermoid Carcinoma , ATCC CCL-17) โดยวิธี colorimetric cytotoxic assay ตามวิธีของ Skehan และ คณะ (1990)

13.5 การวิเคราะห์ปัจจัยสภาวะสิ่งแวดล้อม

- ได้แก่ ความขุ่น (Turbidity) ใช้เครื่องวิเคราะห์ความขุ่น (Turbidity meter) รุ่น PC Checkit, Lovibond (Canada) รายงานผลในหน่วย NTU (Nephelometric Turbidity Unit), อุณหภูมิ และความเป็นกรดต่าง (Temperature and pH), วิเคราะห์ด้วย multi probe YSI 60/10 FT (USA)

- การวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ ความเค็ม (Salinity) ใช้ Refractometer ATAGO S/Mill-E (Japan), ปริมาณซิลิเกต, ปริมาณสารอินทรีย์ละลายน้ำ (DOC) และปริมาณสารอินทรีย์แขวนลอย (POC) วิเคราะห์ตามคู่มือ Strickland and Parson (1972)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1 การเก็บและศึกษาตัวอย่างฟองน้ำทะเล

จากผลการวิจัยพบฟองน้ำ 16 ชนิด (รูปที่ 2) แพร่กระจายบริเวณแหลมมะขาม สามารถจัดจำแนกได้ 5 ชนิด (ตารางที่ 4) โดยเลือกจัดจำแนกเฉพาะฟองน้ำที่สร้างสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพเพราะการจัดการจำแนกใช้เวลานานและเสียค่าใช้จ่ายสูงส่วนความหลากหลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน พบฟองน้ำแพร่กระจายตั้งแต่แนวชายหาดจนถึงบริเวณที่มีความลึก 2-4 เมตร พบทั้งที่เจริญอยู่ใต้พื้นดินและโผล่บางส่วนขึ้นมาเหนืออากาศได้แก่ ฟองน้ำหมายเลข 1, 2, 7 และ 9 ส่วนชนิดอื่นๆเจริญอยู่บริเวณน้ำใส โดยเกาะติดกับแนวปะการังซากหิน

ปัจจัยสภาวะแวดล้อมบริเวณอ่าวมะขาม (ตารางที่ 3) ซึ่งมีที่ตั้งอยู่บริเวณหาดปากเมง จ. ตรัง พบว่าอยู่ในเกณฑ์เดียวในมหาสมุทรอินเดียและในทะเลอันดามัน (Beslin, 2014; Kathiravanl *et al.*, 2014; Padmalal *et al.*, 2012; Kumary *et al.*, 2007) ค่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

สิ่งแวดล้อมซึ่งอยู่ในเกณฑ์เดียวกับน้ำบริเวณชายฝั่ง จ. ตรัง ได้แก่ หาดปากเมง หาดเจ้าสำราญ หาดเจ้าไหม





รูปที่ 2 ฟองน้ำที่พบบริเวณแหลมมะขาม อ. สีเกา จ. ตรัง

ตารางที่ 2 การแพร่กระจายของฟองฟองน้ำตามแนวเก็บตัวอย่าง

	7	7	7	7		
10	7,9	7,16	2	2	4,6	4,6
14	1,15	1,12	2	2	4,6	
10	12,14	12,14	7,14	14	14	
10	4,5,10	4,5,3	4,8	8,3	3	8,3
10	10	10	6	6	11	

เมื่อทำสิ่งสกัดหยาบและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วจะเลือกเฉพาะฟองน้ำที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเท่านั้นไปจัดจำแนกลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Porifera

Class Calcarea

Order Halichondrida

Family Halichondriidae

Genus *Axinyssa* sp.



Massive, lobate or tubular sponges with conulose surface. Ectosomal region lacking a distinct surface skeleton, largely organic, tough, with sparsely scattered spicules and protruding spicule bundles. Choanosomal skeleton disorganized with spicules strwn in confusion and/or composed of vaguely ascending, widely spaced vertical tracts of large oxeas or strongyloxeas, forming loose bundles. Choanosome with poor or moderate sponging development, but heavy interspicular collagen; spicule density relatively low. Spicules oxeas, strongyloxeas or stylote modifications, usually of only one size class. About 15 species, distributed over the warmer waters of the world oceans.

Phylum Porifera

Class Calcarea

Order Halichondrida

Family Halichondriidae

Genus *Halichondria* sp.



Cushion-shaped, frequently with oscular mounds or chimneys, branching, tube-shaped, repent ramose, rarely thinly encrusting sponges. Colour purple, violet, pink, brown, yellowish, green, two-colour combination of a whitish ectosome and darker, purple or brownish choanosome. Consistency varying from soft, fragile, to firm, elastic, brittle or corky. Surface rather smooth and even, slightly to rather strongly punctate, sometimes slightly hispid. Oscula usually circular, flush with the surface or at top of oscular mounds or chimneys. Ectosomal skeleton, if present, either a very regular, tangential, unispicular, isotropic reticulation, with three-to six-sided meshes, or less regular, subisotropic and rather dense or consisting of a discontinuous, rather open reticulation due to many rounded meshes. Choanosomal skeleton a regular, frequently ladder-like reticulation of uni-, pauci- or multispicular primary lines, regularly connected by unispicular secondary lines; it may also be a rather dense, subisotropic reticulation with many subdermal and choanosomal spaces. Spongia is nearly always present, confined to the nodes of spicules or more abundant, sometimes forming the dominant part of the skeleton. Megascleres smooth diactines, oxeas or strongyles, length usually between 80-250 μm , with a thickness of ca. 5-10 μm , rarely larger, up to 370 \times 15 μm . Microscleres, if present, sigmas, toxas, raphides or microxeas.

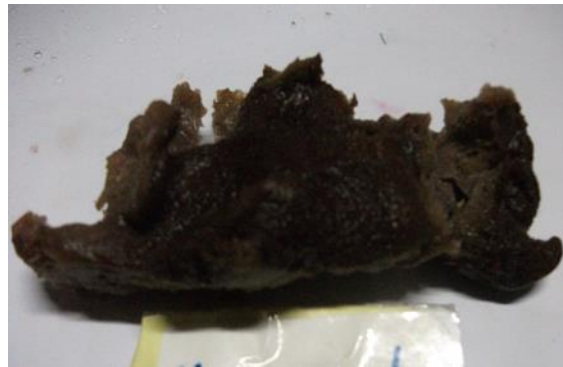
Phylum Porifera

Class Calcarea

Order Haplosclerida

Family Chalinidae

Genus *Haliclona* sp.



Encrusting, massive, occasionally irregularly branching, or digitate sponges with smooth or papillate surface. Oscules often on conical elevations. Surface skeleton well-developed with tangential bundles of spicules and single spicules intercrossing to form a lighter or heavier built surface crust. Subectosomal spaces usually well-developed causing the surface crust to be often rather independent of the main skeleton and easily peeled off. Choanosomal skeleton of rather ill-defined bundles of spicules, which at the surface become oriented perpendicular to the surface crust. They often fan out and carry the surface crust. Many single spicules distributed randomly. Spongin not visibly present. Spicules oxeas with gradually tapering sharp points, in a wide size range, often seemingly divisible into a smaller and a larger category but overlap is extensive. Occasionally style-like modifications occur at a low frequency. About 110 species distributed over all region.

ตารางที่3 ปัจจัยสภาวะแวดล้อมบริเวณแหลมมะขาม อ. สีเกา จ. ตรัง

ปัจจัยสภาวะแวดล้อม	2557								
	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.
อุณหภูมิ (°C)	31.20	30.72	31.50	31.40	31.30	29.40*	31.30	30.00	30.00
ความเป็นกรด-ด่าง	8.75	9.37	7.65	7.65	7.56	7.75	7.54	8.65	8.65
ความเค็ม (ppt)	30.00	31.00	31.00	30.00	31.00	29.00	31.00	30.00	30.00
ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (mg/l)	7.86	6.58	8.52	8.42	8.95	8.76*	8.76	7.84	7.84
ความโปร่งแสง (m)	2.50	1.30	1.50	0.80	0.90	0.90	1.30	1.40	2.50
ซิลิเกต (mg/l)	0.56	0.56	0.53	0.34	0.43	0.65*	0.43	0.65	0.65

2 ฤทธิ์ทางชีวภาพและวิเคราะห์สารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิของสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำ

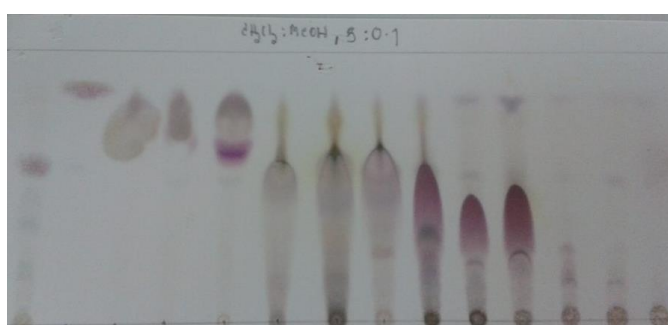
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบจากสิ่งสกัดหยาบฟองน้ำแต่ละชนิดโดย HPLC (รูปผนวกที่ 13) พบว่าสารโดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่มีสภาพขี้ตัวดำหรืออนโพลาร์ เพราะมีค่ารีเทนชันไทม์มาก ยกเว้นฟองน้ำหมายเลข 3, 4, 5, 6 และ *Xestospongia* sp. มีองค์ประกอบที่มีสภาพความเป็นขี้ตัวขาวปานกลางและขี้ตัวค่อนข้างสูง เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) ฉีกแผ่นด้วยสารเคมีทดสอบชนิดต่างๆพบตอบสนองต่อสารเคมีทดสอบ anisaldehyde ปรากฏเป็นสีชมพูและเหลือง ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์และกรดไขมันเป็นส่วนใหญ่ซึ่งพบในสิ่งสกัดชั้นเอกเซนเป็นส่วนมาก ลักษณะดังกล่าวพบในฟองน้ำเกือบทุกกลุ่มเพราะฟองน้ำเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ที่สร้างสารหลายกลุ่มโดยเฉพาะสารกลุ่มกรดไขมันและสเตียรอยด์ สารกลุ่มนี้เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของกระบวนการทางชีวเคมี โดยกรดไขมันและสเตียรอยด์บางชนิดเป็นสารตั้งต้นในวิถีชีวสังเคราะห์เพื่อผลิตสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ เช่นสารกลุ่มโพลีคีไทด์เป็นต้น (Dewick, 2003)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต

Sponge	Antimicrobial	Cytotoxicity (KB cell)	Brine shrimp lethality
1 <i>Axinyssa</i> sp.	✓ (8.0 mm)	-	-
2 un	✓ (9.0 mm)	-	-
3 Un	-	-	-
4 <i>Haliclona</i> sp.	-	✓	✓*1
5 <i>Axinyssa</i> sp.	-	✓	✓*2
6 un	-	-	-
7 un	-	-	-
8 un	-	-	-
9 un	-	-	-
10 <i>Halichondria</i> sp.	✓ (6.5mm)	✓	✓*3
11 un	-	-	-
12 un	-	-	-
13 un	-	-	-
14 un	-	-	-
15 un	-	-	-

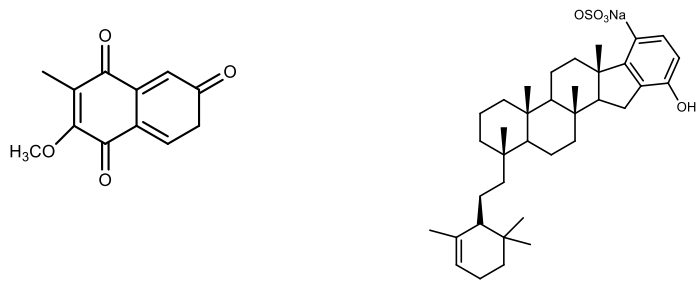
16 un	-	-	-
-------	---	---	---

หมายเหตุ un = unidentified sponge *¹ (LC50=0.50 mg/ml) *²(LC50=0.47 mg/ml) *³ (LC50=10 mg/ml)

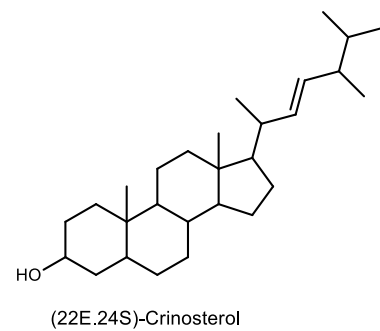
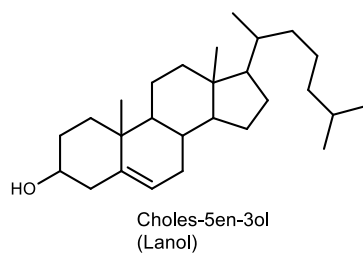
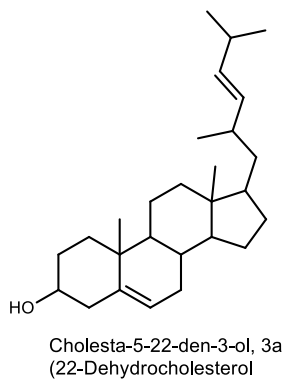
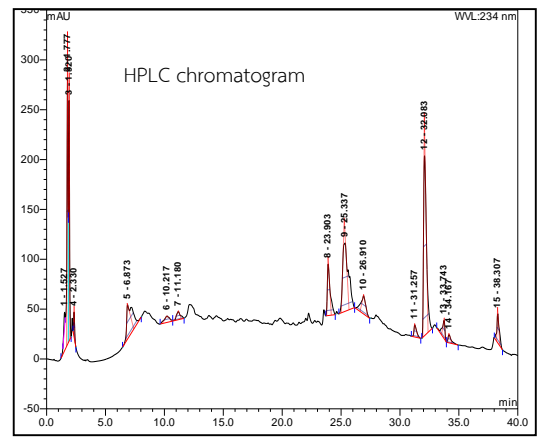
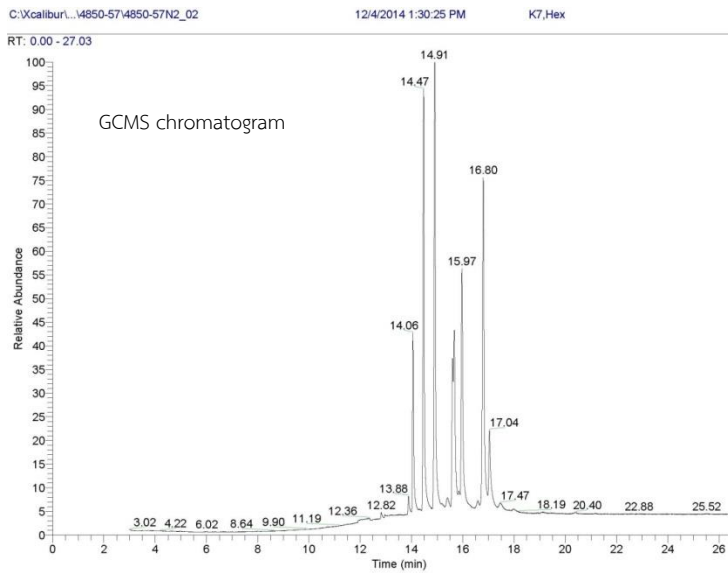


รูปที่ 3 ลักษณะ TLC ของสกัดหยาบจากฟองน้ำ

สารสเตียรอยด์บางกลุ่ม เช่น polyoxygenated steroids บางชนิดมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทดลอง (Aiello, Fattorusso and Menna, 1999) การทดสอบครั้งนี้พบสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำ *Haliclona* sp. มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ทดลอง (KB cell) และเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC, รูปที่ 5) พบสารนอนโพลาร์ 3 ชนิด เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อวิเคราะห์สิ่งสกัดหยาบนี้ด้วยโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GCMS, รูปที่ 5) พบสารสเตอรอลที่เป็นอนุพันธ์ของโคเลสเตอรอลหลายชนิด สารเหล่านี้มีความแตกต่างกันเพียงหมู่แทนที่ (substitute) ณ ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 17 (C-17) ของโครงสร้างหลักและมีพันธะคู่ตำแหน่ง C-5 กับ C-6 (รูปที่ 5) โดยทั่วไปฟองน้ำสกุลนี้สร้างสเตอรอลโครงสร้างชนิด C₂₇ - C₂₉ mono และ diunsaturated sterols ได้แก่ สาร Cholesta-5-22-dien-3-ol, 3a (22-Dehydrocholesterol), Choles-5en-3ol (Lanol) ฟองน้ำสกุลนี้มีรูปแบบทางเคมี (Chemical profiles) ที่หลากหลายไม่มีกลุ่มใดโดดเด่นจนเป็นลักษณะเฉพาะกลุ่ม สารที่พบส่วนมากเป็นกลุ่ม เปปไทด์ isoquinolene, haliclonic acid, adociasulfate (Blackburn *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2009; William *et al.*, Hwang *et al.*, 2012) สาร haliclonic acid, adociasulfate มีลักษณะโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน cyclopentanoperhydro phenantrene (นิวเคลียสของสารกลุ่มสเตียรอยด์) เชื่อมต่อกับวงแหวนเบนซีนซึ่งถูกแทนที่ด้วยหมู่ซัลเฟต (รูปที่ 4) นอกจากสารกลุ่มดังกล่าวแล้วยังมีพบสารเทอร์ปีนอยด์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบในฟองน้ำชนิดนี้ (Sudhakar *et al.*, 2012)



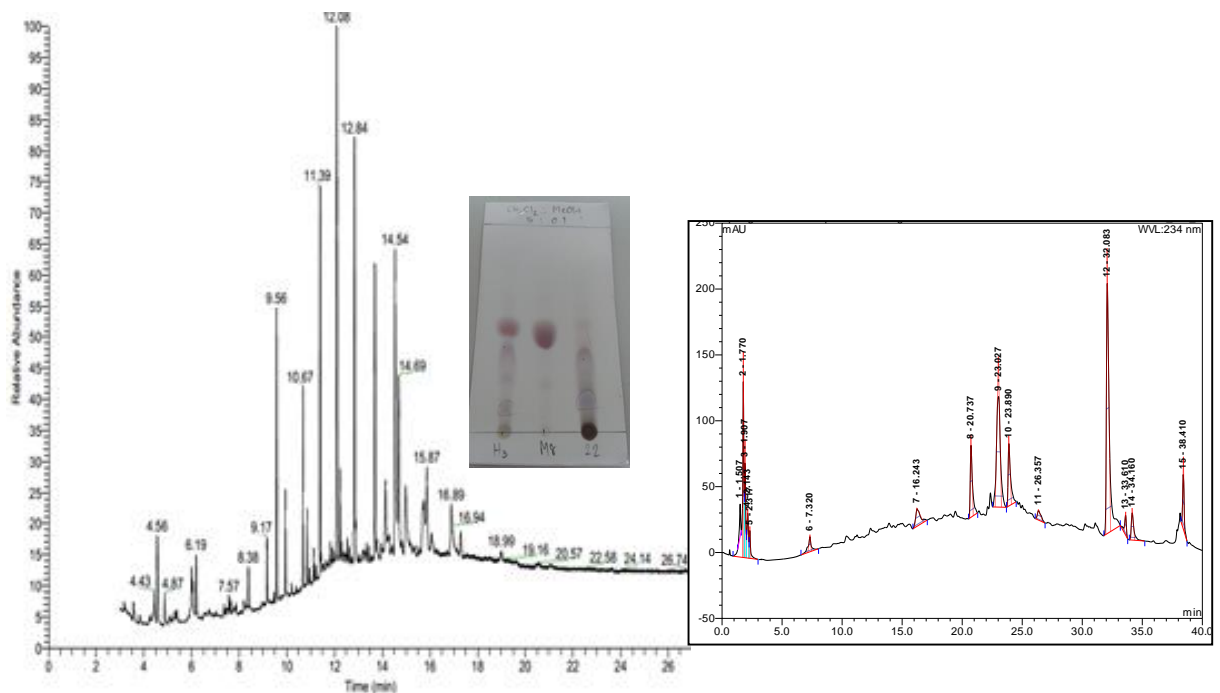
รูปที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างสารที่เคยมีรายงานพบในฟองน้ำ *Haliclona* sp.

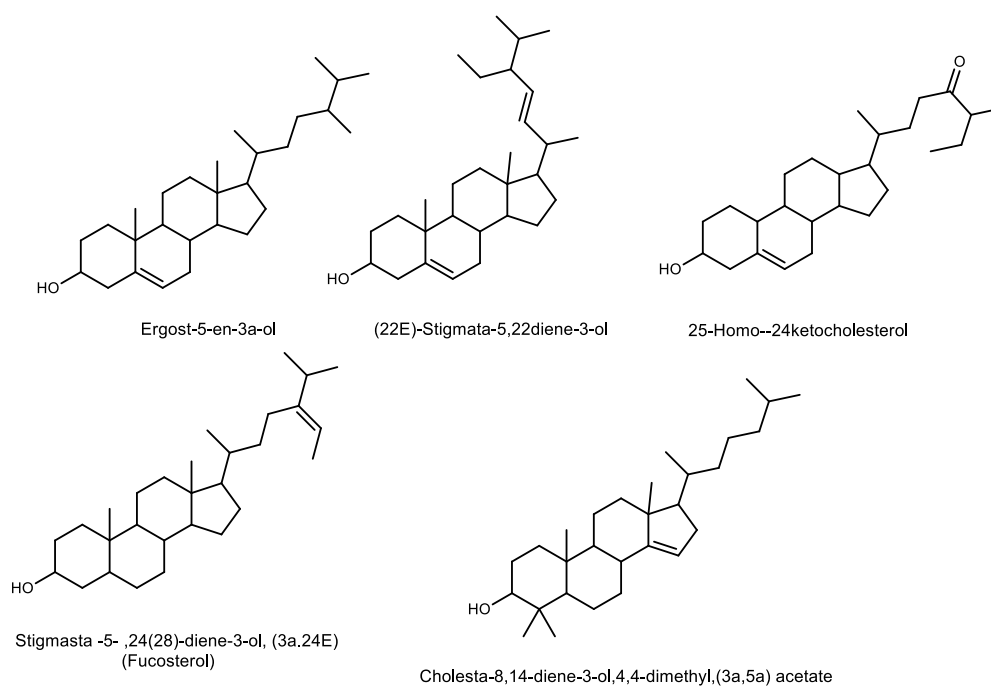


รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำ *Haliclona* sp. โดย

เทคนิค GCMS และ HPLC

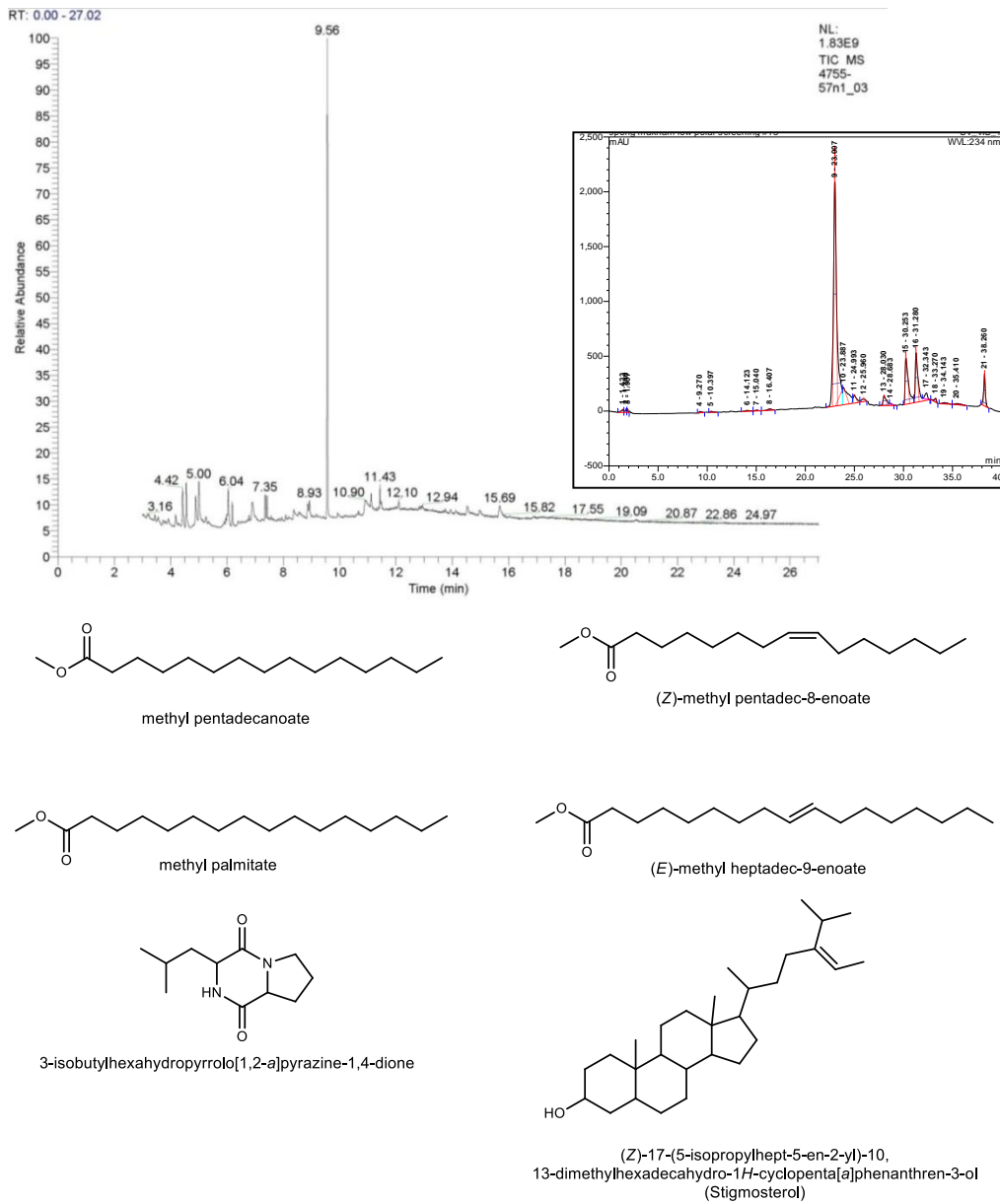
การทำสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำ *Halichondria* sp. โดยใช้เอทิลอะซีเตตเป็นตัวสกัดซึ่งจะถูกวิเคราะห์ด้วย HPLC และ GSMS (รูปที่ 6) ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบพีคจำนวน 3 พีค มีสองพีคเป็นลักษณะสารผสมคือพีคที่มีคาร์เทนชั้นใหม่ (Rt) เท่ากับ 23.9 และ 25.3 นาที (รูปที่ 5) เป็นกลุ่มสารที่มีสภาพขี้ดดำ ผลการวิเคราะห์ด้วย TLC และฉีดยานด้วยสารเคมีทดสอบ anisaldehyde (รูปที่ 6) ให้ผลเป็นสีม่วงแสดงว่าเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ ผลการวิเคราะห์ด้วย GCMS พบสาร ergosterol, stigmasterol และ อนุพันธ์ของโคเลสเตอรอล (รูปที่ 6) โดยทั่วไปตัวอย่างฟองน้ำสกุลนี้จากแหล่งอื่นเช่น ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น มีสารกลุ่มเปปไทด์ อัลคาลอยด์ และ เซสควิเทอร์ปีนส์ (Kozawa *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2012) แต่จากแหล่งนี้มีสารสเตียรอยด์ซึ่งแตกต่างไปจากบริเวณอื่น ๆ คาดว่าน่าจะเกิดจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน สารบางชนิดในฟองน้ำชนิดนี้ เคยมีรายงานพบในสาหร่ายกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลตมาก่อน เช่น กรดโอคาเดอิก (Okadaic acid) พบในไดโนแฟลกเจลเลตชนิด *Prorocentrum lima* (Sugiyama *et al.*, 2007) เป็นสาเหตุของพิษท้องร่วง (diarrhetic shellfish poison) ในกรณีฟองน้ำน่าจะเกิดจากมีสาหร่ายกลุ่มนี้อยู่ในเนื้อเยื่อฟองน้ำ ซึ่งปนเปื้อนมากับน้ำจากภายนอกเซลล์ผ่านระบบหมุนเวียนน้ำภายในตัวฟองน้ำ (aquiferous system).





รูปที่ 6 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำ *Halichondria* sp. โดยเทคนิค GCMS, HPLC และ TLC

HPLC โครมาโทแกรมของสิ่งสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตตจากฟองน้ำ *Axinyssa* sp. (รูปที่ 7) พบสารที่มีสภาพขี้ด้าและปานกลาง เมื่อวิเคราะห์ด้วย GSMS พบกรดไขมัน 4 ชนิด สเตียรอล 1 ชนิดคือ sigmasterol และสาร 3-isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (รูปที่) ซึ่งเป็นสารขี้ด้า แต่ขี้ด้าปานกลางไม่มีรายงานในฐานข้อมูล จึงแยกสารเหล่านี้ออกจากของผสมโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารขี้ด้ากลางจำนวนหนึ่ง ซึ่งถูกแยกให้บริสุทธิ์โดย preparative hplc ได้สารใหม่ จำนวน 12 ชนิดสาร (รูปที่ 8)

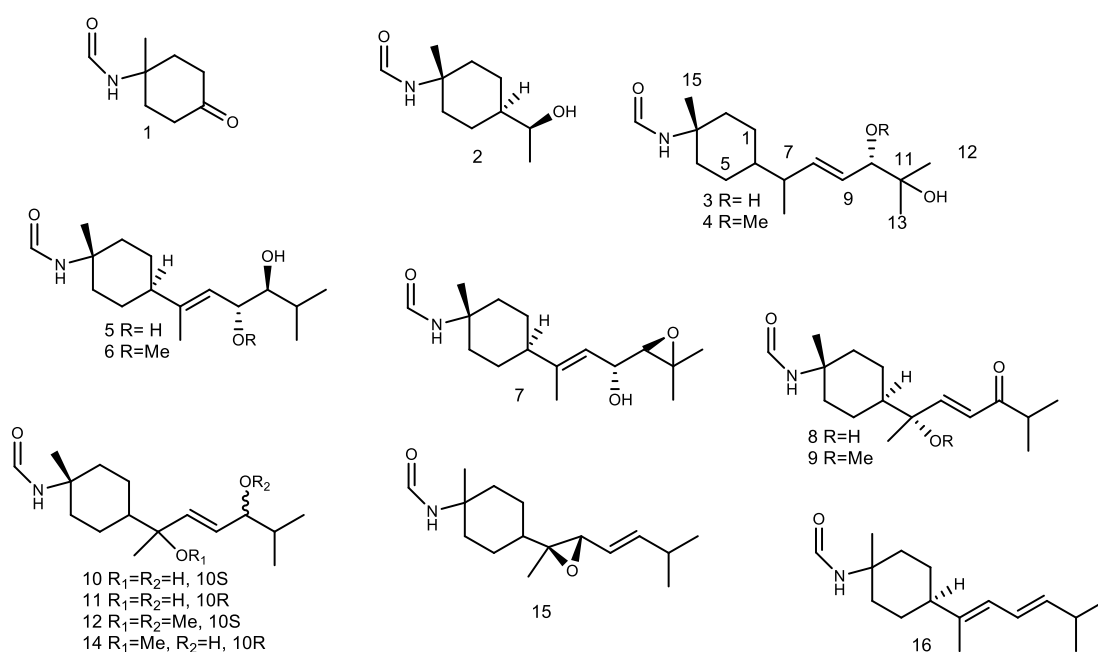


รูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดหายาจากฟองน้ำ *Axinyssa* sp. โดยเทคนิค GCM

การพิสูจน์ทราบลักษณะทางเคมีของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากฟองน้ำ *Axinyssa* sp.

ข้อมูล NMR และ MS ของสารใหม่ (1-12, รูปผนวกที่ 1-12, ตารางที่ 4-7) ใช้พิสูจน์ทราบโครงสร้างโมเลกุลของทุกสาร ซึ่งแสดงถึงความซับซ้อนของโครงสร้างเซสควิเทอร์ปีนส์กลุ่ม

formamodobiabolene ซึ่งสารกลุ่มนี้เกิดจากการฟอร์มเมทิลกับหมู่ฟังก์ชันฟอร์มามาไมด์ ณ ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 ส่งผลให้มี 2 ไอโซเมอร์ ในโครงสร้างเดียว คือ *endo* และ *exo-conformation* ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้โดยใช้ค่า coupling constant ของอัลดีไฮด์โปรตอนโดย *exo* มีค่า $J_{\text{CHO}/\text{NH}}$ ประมาณ 12 Hz $^1\text{H-NMR}$ มีลักษณะแตกเป็นแฉกคู่ (doubling) ในทางตรงกันข้าม *exo-conformation* มีลักษณะโปรตอนเป็นแบบเดี่ยวไม่ชัดเจน (broad single) สาร axinyssine 1 (1) มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 154.0868 (วิเคราะห์ด้วย HREIMS) สาร axinyssine B (2) $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 184.331 ลักษณะโครงสร้างมีความคล้ายคลึงกับสาร 6-acetyl-3-methyl-3-formamidocyclohexane (13) แตกต่างจากสารที่ 2 เพราะมีหมู่ไฮดร็อกซี (OH) เป็นหมู่ฟังก์ชัน ณ ตำแหน่งที่ C-7 และหมู่ methine หรือพันธะคู่ตำแหน่งที่ H-6



รูปที่ 8 สารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิได้จากฟองน้ำ *Axinyssa* sp.

สาร axinyssine C (3) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 282.2064 สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ สารชนิดนี้มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับสารที่ 3 คือชิ้นส่วนของ 3-methyl-3-formamidocyclohexane หมู่ไฮดร็อกซีของสาร 2 ถูกแทนที่โดยสายโซ่ตรงและบริเวณสายโซ่ตรงมีการแทนที่ของหมู่ไฮดร็อกซี สาร axinyssin D (4) มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{NO}_3$ ลักษณะโครงสร้างคล้ายกับสาร 3 โดยโครงสร้างหลักเหมือนกันทุกประการ ยกเว้นตำแหน่ง C-10 ถูกแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันเมทอกซี (methoxy, OCH_3)

สาร axinyssine E (5) และสาร axinyssine F (6) แตกต่างจากสาร 3 และ 4 ณ บริเวณสายโซ่ตรงซึ่งไม่มีการแทนที่ของหมู่ไฮดร็อกซีที่ตำแหน่งที่ตำแหน่ง C-11 ส่วนตำแหน่งอื่นๆเหมือนกันทุกประการ การพิสูจน์ทราบโครงสร้างทำโดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูล HREIMS และ $^1\text{H-NMR}$ (รูปผนวกที่) HREIMS ของ 5 เท่ากับ 282.2064 สอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ ส่วนสาร 6 คือ $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{NO}_3$

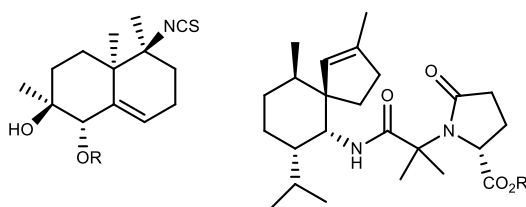
สาร axinyssine G (7) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 280.1910 ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}$ จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (รูปที่ผนวกที่ 7) จะพบว่า สาร 7 มีความคล้ายคลึงกับสาร 5 ข้อแตกต่างเกิดจากการพอร์มหมู่เอพอกไซด์ (epoxide) ณ ตำแหน่ง C-10 และ C-11 ของสารที่ 7 ซึ่งสังเกตได้จากค่าเคมีคัลชิฟของ C-10 เท่ากับ 67.4 และ 59.9 ของ C-11 ppm ตามลำดับ

สาร axinyssine H และ I (8, 9) ยังคงมีชิ้นส่วนของ formamidobisabolene-based สาร 8 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 280.1913 ($\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_3$) ส่วน 9 มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{NO}_3$ ข้อแตกต่างคือมี OCH_3 เป็นหมู่แทนที่ ส่วนสาร 8 เป็นหมู่ OH

สาร axinyssine J (10) เกิดจากการแทนที่ของหมู่ OH ตำแหน่ง C-10 ส่วนสาร axinyssine K (11) เป็น diastereomer ของ 10 มีค่า $\Delta\delta^{\text{RS}}$ C-8 และ C-9 เท่ากับ +0.39 และ +0.16 ส่วนสาร 11 มีค่าเท่ากับ -0.40 และ -0.15 ตามลำดับ

สาร axinyssine L (12) เกิดจากการแทนที่ของหมู่เมทิล (CH_3) ณ ตำแหน่ง C-10 ของสารที่ 10 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 296.2221 ตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{NO}_3$

จากการสืบค้นในฐานข้อมูลพบว่าฟองน้ำสกุล *Axinyssa* สร้างสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีนส์หลายชนิดความแตกต่างของโครงสร้างเกิดจากการแทนที่ของหมู่ ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate) พอร์มาไมด์ (formamide) (รูปที่ 9) ลักษณะโมเลกุลแบบนี้พบในฟองน้ำเก็บจากทะเล แคริบเบียน และเมดิเตอร์เรเนียน เป็นสารที่พบในฟองน้ำสกุลนี้ ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ เป็นพิษอย่างรุนแรงต่อเซลล์มะเร็งชนิดหลายชนิด (Zub'a *et al.*, 2008; Petrichtcheva *et al.*, 2008)



รูปที่ 9 ตัวอย่างโครงสร้างโมเลกุลสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีนพบในฟองน้ำสกุล *Axinyssa*

ตารางที่ 4 $^1\text{H-NMR}$ ของสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิแยกจากฟองน้ำ *Axinyssa* sp. (CDCl_3)

	1		2		3		4		5		6	
	exo	endo	exo	endo	exo	endo	exo	endo	exo	endo	exo	Endo
1/5	2.52, m	2.52, m	1.70, m	1.70, m	1.60-1.73 m	1.12-1.25 m	1.59-1.75 m	1.12-1.26 m	1.61-1.74 m	1.38-1.49 m	1.61-1.77 m	1.41-1.52 m
2/4	2.16, m	2.16, m	1.39, m	1.39, m	1.74-2.01 m	1.47-1.72 m	1.75-2.01 m	1.47-1.73 m	1.80-2.08 m	1.54-1.77 m	1.81-2.08 m	1.55-1.79 m
6			1.31, m	1.31, m	1.21 m	1.21 m	1.21 m	1.21 m	1.92 m	1.92 m	1.96 m	1.96 m
7			3.63, m	3.63, m	2.05 m	2.05 m	2.08 m	2.08 m				
8					5.64 dd(16.0, 8.0)	5.63 dd(16.0, 8.0)	5.57 dd(16.0, 8.0)	5.56 dd(16.0, 8.0)	5.23 d(8.0)	5.21 d(8.0)	5.01 d(8.0)	4.99 d(8.0)
9					5.46 dd(16.0, 8.0)	5.45 dd(16.0, 8.0)	5.26 dd(16.0, 8.0)	5.24 dd(16.0, 8.0)	4.31 t(8.0)	4.31 t(8.0)	3.83 t(8.0)	3.83 t(8.0)
10					3.87 d(8.0)	3.87 d(8.0)	3.28 d(8.0)	3.27 d(8.0)	3.25 t(8.0)	3.25 t(8.0)	3.27 t(8.0)	3.27 t(8.0)
11									1.71 s	1.73 s	1.66 m	1.66 m
12					1.21 s	1.21 s	1.12 s	1.12 s	0.98 d(8.0)	0.98 d(8.0)	0.99 d(8.0)	0.99 d(8.0)
13					1.15 s	1.15 s	1.14 s	1.14 s	0.89 d(8.0)	0.89 d(8.0)	0.87 d(8.0)	0.87 d(8.0)
14			1.20, d(8.0)	1.19 d(8.0)	1.00 d(8.0)	0.98 d(8.0)	1.02 d(8.0)	1.00 d(8.0)	1.72 s	1.73 s	1.74 s	1.73 s
15	1.50, s	1.53, s	1.37, s	1.42, s	1.32 s	1.38 s	1.30 s	1.37 s	1.36 s	1.42 s	1.37 s	1.43 s
CHO	8.40, d(12.0)	8.22, br s	8.24, d(12.0)	8.07, br s	8.29 d(12.0)	8.04 br s	8.30 d(12.0)	8.03 br s	8.31 d(12.0)	8.04 br s	8.32 d(12.0)	8.05 br s
NH	6.18, br d(12.0)	5.36, br s	6.99, br d(12.0)	5.36, br s	6.02	5.21	5.77, d(12.0)	5.21 br	6.02 d	5.26 br s	6.09 d	5.21 br s
MeO							3.28 s	3.28 s			3.25 s	3.25 s

ตารางที่ 5 $^1\text{H-NMR}$ ของสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิแยกจากฟองน้ำ *Axinyssa* sp. (CDCl_3)

	7		8		9		10		11		12	
	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>
1/5	1.62-1.80 m	1.37-1.54 m	1.60-1.87 m	1.21-1.44 m	1.62-1.78 m	1.14-1.27 m	1.87, m	1.32, m	1.85, m	1.30, m	1.87, m	1.32, m
2/4	1.81-2.08 m	1.54-1.79 m	1.78-2.09 m	1.47-1.74 m	1.77-2.06 m	1.45-1.67 m	2.08, m	1.71, m	2.09, m	1.70, m	2.09, m	1.70, m
6	1.94 m	1.94 m	1.45 m	1.45 m	1.50 m		1.39, m	1.39, m	1.37, m	1.37, m	1.38, m	1.38, m
7												
8	5.32 d(8.0)	5.31 d(8.0)	6.86 d(16.0)	6.86 d(16.0)	6.70 d(16.0)	6.69 d(16.0)	5.73, d(16.0)	5.73, d(16.0)	5.74, d(16.0)	5.74, d(16.0)	5.68, d(16.0)	5.68, d(16.0)
9	4.23 t(8.0)	4.23 t(8.0)	6.43 d(16.0)	6.41 d(16.0)	6.24 d(16.0)	6.23 d(16.0)	5.68, dd(16.0, 8.0)	5.67, dd(16.0, 8.0)	5.67, dd(16.0, 8.0)	5.66, dd(16.0, 8.0)	5.48, dd(16.0, 8.0)	5.47, dd(16.0, 8.0)
10	2.81 d(8.0)	2.81 d(8.0)					3.90, t(8.0)	3.89, t(8.0)	3.91, t(8.0)	3.90, t(8.0)	3.25, t(8.0)	3.24, t(8.0)
11			2.79 m	2.79 m	2.83 m	2.83 m	1.76, m	1.76, m	1.74, m	1.74, m	1.76, m	1.76, m
12	1.33 s	1.33 s	1.13 d(8.0)	1.13 d(8.0)	1.13 d(8.0)	1.13 d(8.0)	0.93, d(8.0)	0.91, d(8.0)	0.93, d(8.0)	0.93, d(8.0)	0.92, d(8.0)	0.92, d(8.0)
13	1.32 s	1.32 s	1.12 d(8.0)	1.12 d(8.0)	1.13 d(8.0)	1.13 d(8.0)	0.93, d(8.0)	0.91, d(8.0)	0.90, d(8.0)	0.90, d(8.0)	0.85, d(8.0)	0.85, d(8.0)
14	1.71 s	1.70 s	1.34 s	1.32 s	1.26 s	1.27 s	1.29, s	1.28, s	1.28, s	1.27, s	1.30, s	1.28, s
15	1.43 s	1.42 s	1.37 s	1.32 s	1.36 s	1.30 s	1.38, s	1.31, s	1.38, s	1.31, s	1.37, s	1.31, s

CHO	8.31 d(12.0)	8.05 br s	8.30 d(12.0)	8.03 br s	8.29 d(12.0)	8.02 br s	8.30, d(12.0)	8.03, br s	8.30, d(12.0)	8.03, br s	8.31, d(12.0)	8.03, br s
NH	5.96 d	5.22 br s	5.85 d	5.23 br s	5.72 d	5.18 d	5.85 d	5.21 br s	5.86 d	5.21 br s	5.77 d	5.22 d
MeO					3.17 s	3.16 s					3.25 s	3.25 s

ตารางที่ 6 ^{13}C -NMR ของสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิแยกจากฟองน้ำ *Axinyssa* sp. (CDCl_3)

No.	1		2		3		4		5		6		7	
	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>
1/5	36.3	36.7	24.7	23.7	25.9	26.1	26	26.2	27.2	27.3	27.4	27.5	27.3	27.3
2/4	37	37.9	36.4	38.5	36.7	39.1	36.6	39.1	36.8	39.3	36.8	39.3	36.8	39.3
3	51.2	52.7	54.4	53.8	54.1	52.9	54	52.7	52.6	53.8	52.6	53.8	52.7	53.9
6	209.5	210.1	44.1	43.9	41.8	41.9	41.9	42	46.1	46.3	46.4	46.6	46	46.2
7			71.4	71.2	41.4	41.4	41.7	41.7	144.1	144.8	145.9	146.2	144.3	145.2
8					138.5	138.9	140.9	141.3	123.2	122.8	120.9	120.5	121.6	121.2
9					128	127.7	126.1	125.8	69.5	69.4	79.1	79	67.7	67.6
10					79.7	79.8	89.6	89.7	79.6	79.6	78.1	78.1	67.4	67.3
11					72.8	72.8	72.1	72.2	29.7	29.7	29.4	29.4	59.9	59.9
12					26.5	26.5	26.1	26.1	20.2	20.2	20.4	20.4	24.9	24.9
13					23.7	23.4	24.2	24.2	16.2	16.2	15.9	15.9	19.6	19.6
14			21	20.9	17.7	17.7	18.1	18.3	15.4	15.4	15.6	15.6	15.4	15.4
15	25.8	29.3	22.2	24.4	22.5	24.8	22.5	24.9	22.4	24.7	22.4	24.7	22.4	24.7
CHO	161.1	163.3	161.1	163.7	160.5	162.8	160.3	162.5	160.4	163	160.2	162.8	160.4	162.7

OMe

56.4

56.6

55.6

55.5

ตารางที่ 7 ^{13}C -NMR ของสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิแยกจากฟองน้ำ *Axinyssa* sp. (CDCl_3)

7		8		9		10		11		12	
<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>	<i>endo</i>	<i>exo</i>
27.3	27.3	234	22.6	23	23.1	22.8	23.4	22.9	23.3	22.8	23.5
36.8	39.3	36.7	39.2	36.9	39.4	36.9	39.3	36.9	39.3	36.9	39.3
52.7	53.9	52.5	53.7	52.6	53.9	52.6	53.9	52.6	53.9	52.4	53.8
46	46.2	46.6	46.9	46.4	46.5	47.1	47.4	47.1	47.4	47.1	47.4
144.3	145.2	74.8	74.7	79	78.9	74.4	74.2	74.4	74.3	74.6	74.4
121.6	121.2	150.6	150.9	148.6	148.9	137.7	137.5	137.4	137.2	139.7	139.5
67.7	67.6	125.3	125.2	128.1	128	129.5	129.3	129.6	129.4	127.1	126.9
67.4	67.3	203.7	203.7	203.9	203.9	77.7	77.6	77.5	77.4	87.6	87.5
59.9	59.9	39.7	39.6	39.1	39.2	34	34	34	34	32.7	32.7
24.9	24.9	18.3	18.3	18.4	18.4	18.3	18.3	18.3	18.3	18.7	18.7

19.6	19.6	182	182	18.3	18.3	18	18	18	18	18.2	18.2
15.4	15.4	25.9	26.1	18.4	18.5	26.3	26.4	25.9	26.1	26.4	26.6
22.4	24.7	22.1	24.4	22.1	24.5	22.1	24.4	22.1	24.4	22	24.4
160.4	162.7	160.3	162.5	160.3	162.4	160.3	162.5	160.3	162.6	160.3	162.6
				50.5	50.4					56.4	56.5

เอกสารอ้างอิง

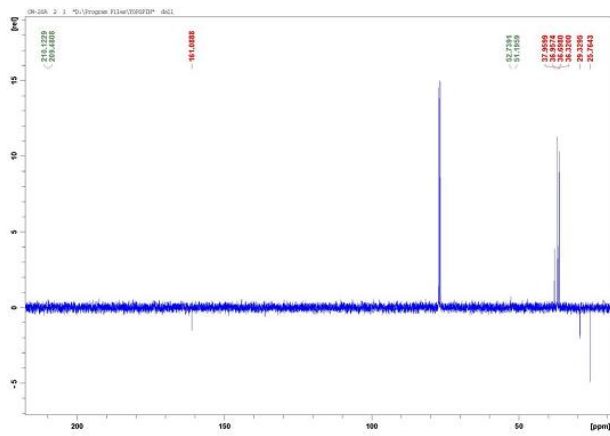
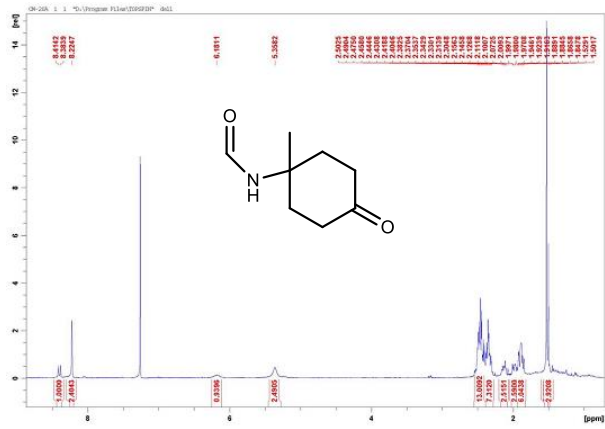
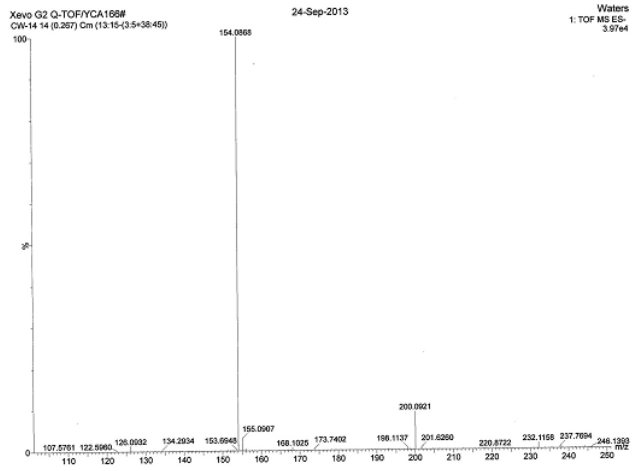
- Abdo D.A., Motti, C.A., Battershill C.N., and Harvey E.S., 2007, Temperature and spatiotemporal variability of salicylhalamide A in the sponges *Haliclona* sp., **J. Chem Eco. 33: 1635-1645.**
- Aiell A., Fattorusso E. and Menna M. 1999. Steroids from sponges: Recent reports. **Steroids, 64: 687-714.**
- Akiyama T., Ueoka R., Soest R.W.M., Matsunaga S. 2009. Ceratodictyols, 1-Glyceryl Ethers from the Red Alga-Sponge Association *Ceratodictyon spongiosum/Haliclona cymaeformis*. **J. Nat. Prod. 72: 1552–1554.**
- Blackburn C.L., Hopmann C., Ro Sakowicz R., Berdelis M.S., Goldstein L.S.B Faulkner D.J. 1999. Adociasulfates 1-6, Inhibitors of Kinesin Motor Proteins from the *Sponge Haliclona* (aka Adocia) sp., **J. Org. Chem. 64: 5565-5570**
- Bell J.J, Barnes D.K.S. 2000. A sponge diversity centre within a marine island, **Hydrobiologia 440,35 2000**
- Barnes D.K.S., Bell J.J. 2002. coastal sponges communities of the West Indian Ocean: taxonomix affinities, richness and diversity, **Arj.J.Eco. 40:337-349.**
- Beslin, L.G., 2014, Water and Sediment Quality Assesment of Poonthura Backwater in the Southwest Coast of India. **Am. J. Mar. Sci. 2:43-46.**
- Carrol J., Johnson E.N., Ebel, R., Haetman M.S., Holman T.R., and Crew P., 2001, Probing sponge-derive terpenoids for human 15L-lipoxygenase inhibitors, **J. Org. Chem. 66: 6847-6851.**
- De Carvalho M.S., Jacob, R.S. 1991, Two-stepinactivation of bee venom phospholipase A₂ by scalaradial, **Biochem Pharmacol, 42:1621-1626.**
- De Smet P.,Parys J.B., Callewaert G.,Weidema A.F., Hill E., De Smet H, Erneux C., Sorrentino V., and Missiaen L., 1999, Xestospongine C is an equally potent inhibitor of inositol 1,4,5-triphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump, **Cell Calcium. 26: 9-13**
- Dewick P.M. 2003. **Medicinal natural products: A biosynthesis approach.** Antony Rowe Ltd. Wiltshire. 507 p.
- English S., Wilkinson C., Baker V., 1997 **Manual for tropical marine resources (2nd),** Australian Institute of Marine Sciences, Townsville, Australia pp.102.
- Fedoreef S.A., Prokofeva N.G., Denisenko V.A. and Rebachuk N.M., 1989, Cytotoxic activity of aaptaminees from suberitid marine sponge, **Pharm Chem J, 22: 615-618.**
- Fromount J., Vanderkluft M.A., Kendrick G.A. 2006. Marine sponges of the Dampier Archipelago, Western Australia: patterns of species distributions, abundance and diversity **Biodiversity and Conservation 15:3731–3750**

- Faulkner D.J., 1997, Marine natural products, **Nat. Prod. Rep.**14: 259 p.
- Hadas E., Shpigel M. and Ilan M. 2004. Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, Latrunculiidae) as a first step for latrunculin B mass production. **Aquaculture** **244**: 159-169.
- Hooper J.N.A. and Van Soest R.W.M. 2002, **Systema Porifera**, Kluwer Academic/Prenum Publishers, New York. 1708 p.
- Hwang S.U., OH J.D., Jeong E.U., Sim C.J., Rho J.E. 2012. Densanins A and B, New Macrocytic Pyrrole Alkaloids Isolated from the Marine Sponge *Haliclona densaspicula*. **Org. Lett.** **14**: 6154–6157.
- Isbrucker R.A., Cummin J., Pomponi S.A., Longley R.E., and Wright R.E., 2003, Tubulin polymerizing activity of dictyostatin1, a polyketide of marine sponge origin, **Biochem. Pharmacol.** **66**: 75-82
- Jha R.K. and Zi Rong X. 2004: Biomedical compounds from marine organisms, **Marine Drug**, **2**: 123-146
- Kozawa S., Ishiyama H., Fromont J., Kobayashi J. 2008. Halichonadin E, a Dimeric Sesquiterpenoid from the Sponge *Halichondria* sp. **J. Nat. Prod.** **71**: 445–447
- Kathiravan, K., Usha, N., and Vishnunath, R., 2014, Water Quality of Rameswaram Island, Southeast Coast of India – A Statistical Assessment. **Int. Res. J. Env. Sci.** **3**:12-23.
- Mayer A.M.S and Hamman M. T., 2002, Marine pharmacology in 1999: compounds with antimicrobial, anticoagulant, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, **132**: 315-339.
- Mayer A.M.S., and Gustafson K.R., 2006, Marine pharmacology in 2003-2004: Anti tumour and cytotoxic compounds, **Eur.J.Can.** **42**: 2241-2270.
- Meixner M.J.M, Lüter C., Eckert C., Itskovich V., Janussen D., Von Rintelen T., Bohne A.V., Meixner J.M. Hess W. R., 2007. Phylogenetic analysis of fresh water sponges provide evidence for endemism and radiation in ancient lake, **Molec. Phylogen. Evol.** **45**. 875-886.
- Merck, 1995, biochemical agent price list available at www.merckaldrich.com
- Ogunusi, T.A. and Dosumu O.O. 2008. Bioactivity of crude extract of *Euphorbia kamerunica* Pax using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay, **J. Med. Plants. Res.** **2**, **370-373**.
- Kumary, K.S.A., Azis P.K.A., Natarajan, P., 2007, Water quality of the Adimalathura Estuary, southwest coast of India. **J. Mar. Biol. Ass. India.** **49**:01–06.
- Padmalal, D., Remya, S.I., Jyothi, S.J., Baijulal B., Babu, K.N., and Baiju, R.S., 2012, Water quality and dissolved inorganic fluxes of N, P, SO₄, and K of a small catchment river in the Southwestern Coast of India. **Environ. Monit.**

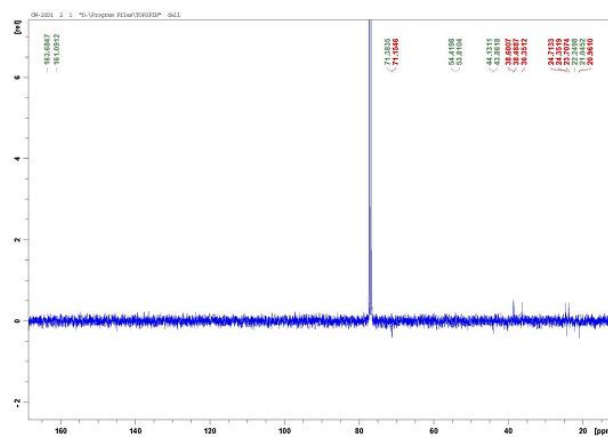
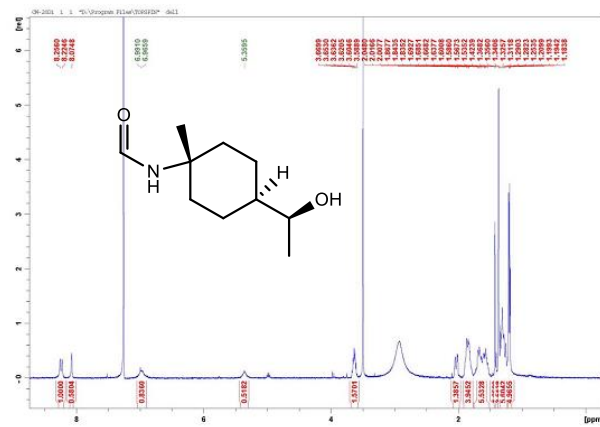
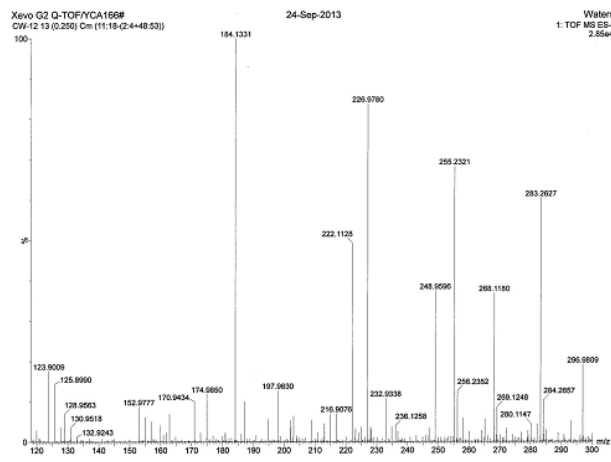
Assess. 184:1541–1557

- Petrichtcheva N.V., Duque C., Duen A., Zea S., Hara P., Fujimoto Y. 2002. New Nitrogenous Eudesmane-Type Compounds Isolated from the Caribbean Sponge *Axinyssa ambrosia*. **J. Nat. Prod.** 65: 851-855
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Wareen J.T., Bokesch H., Kenney S., Boy M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the Cancer Institute** 44, 1107-1112.
- Strickland J.D.H., and Parsons I.R. 1972, **A practical handbook of seawater analysis**. Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167 p.
- Sudhakar V.S.G., Choi B.K., Yoshioka Y., Kanamoto A., Fujiwara T., Okamoto T. and Ojika M. 2012. Novel Cytotoxic Polyoxygnated Steroids from an Okinawan Sponge *Dysidea* sp. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 76: 999-1002.
- Sugiyama N., Konoki K., Tachibana K. 2007. Isolation and Characterization of Okadaic Acid Binding Proteins from the Marine Sponge *Halichondria okadai*. **Biochemistry** 46: 11410-11420.
- Tanaka N., Suto N., Ishiyama H., TKubota T., Yamano A., Shiro M., Fromont J. Kobayashi J. 2012. Halichonadins K and L, New Dimeric Sesquiterpenoids from a Sponge *Halichondria* sp. **Org.Lett.** 14: 3498–3501
- Traub W.H., Leonhard B., Bauer D. 1998, Antibiotic susceptibility of *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*: Comparative (NCCLS Criteria) evaluation of antimicrobial drugs with the agar dilution and the agar disk diffusion (Bauer-Kirby) Tests. **Chemotherapy** 44, 164-173.
- Williams D.E., Steinø A., Voogd N.J.D., Mauk A.G., and Andersen R.J. 2012. Halicloic Acids A and B Isolated from the Marine Sponge *Haliclona* sp. Collected in the Philippines Inhibit Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **J.Nat.Prod.** 75: 1451-1458.
- Xavier J., 2009. **Biodiversity and Phylogeny of Northwest Atlantic and Mediterranean sponges**, Ph.D. Thesis, Amsterdam University, 186 p.
- Xu, J., Yoshimura H., Maru N., Ohno O., Arimoto H., Uemura D. 2011. Pinnarine, Another Member of the Halichlorine Family. Isolation and Preparation from Pinnaic Acid. **J. Nat. Prod.** 74: 1323–1326
- Zubía E, Ortega M.J., Hernández-Guerrero C.J., Carballo J.L. 2008. Isothiocyanate Sesquiterpenes from a Sponge of the Genus *Axinyssa*. **J. Nat. Prod.** 71, 608–614.

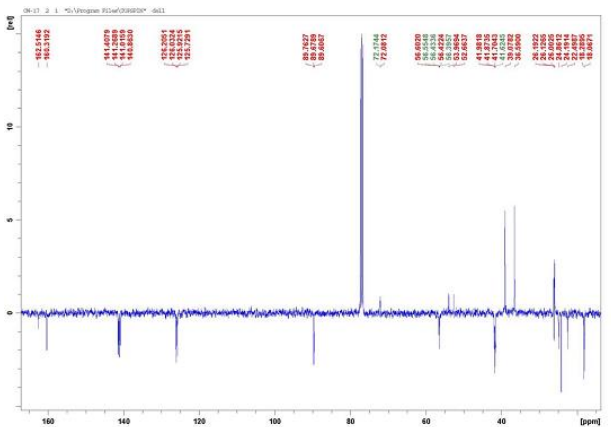
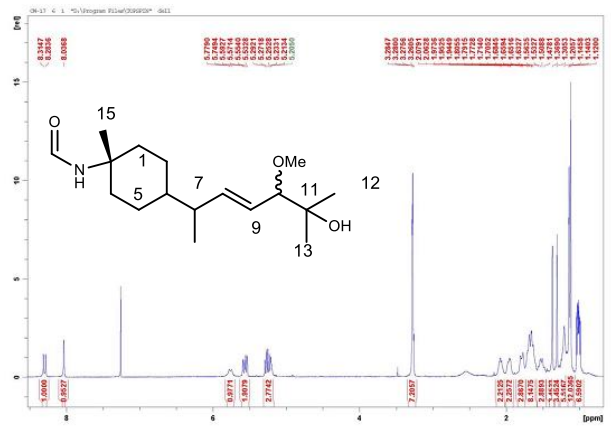
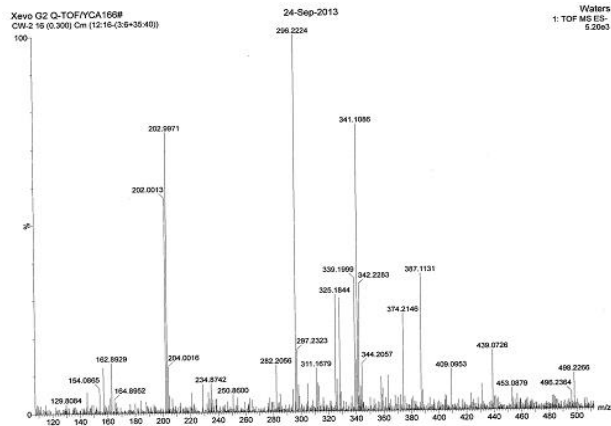
ภาคผนวก



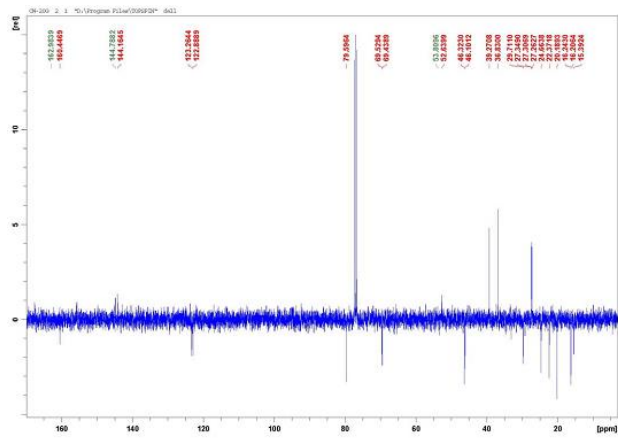
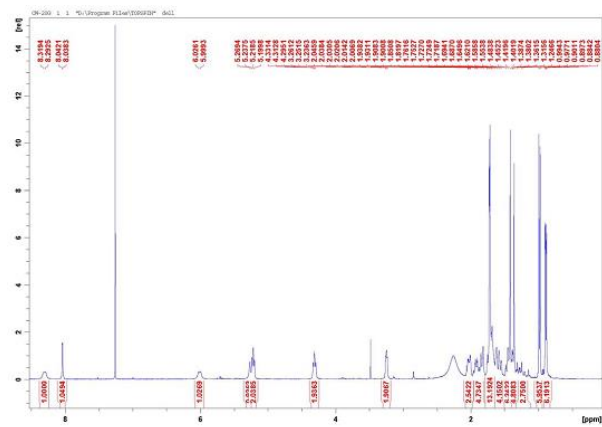
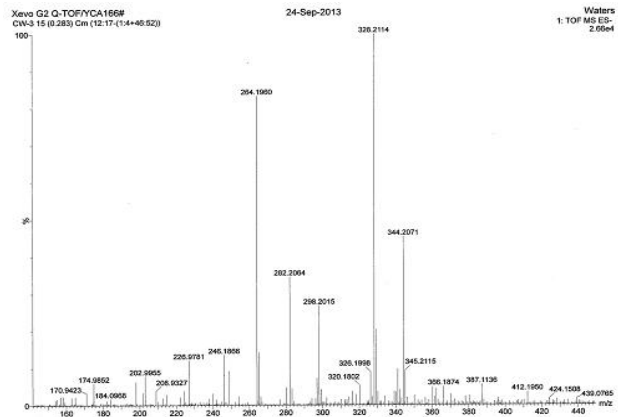
รูปผนวกที่ 1 สเปกตรัม ESIMS, ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารที่ 1



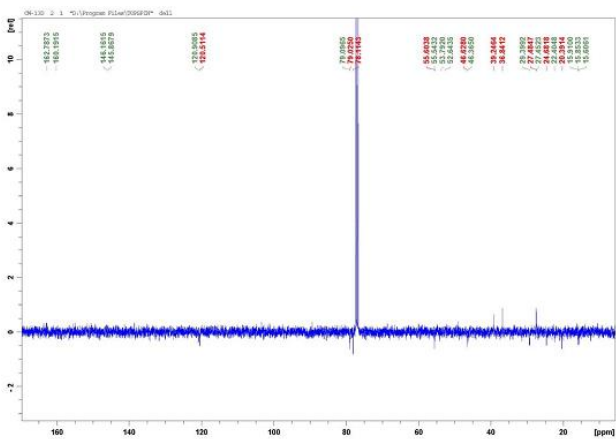
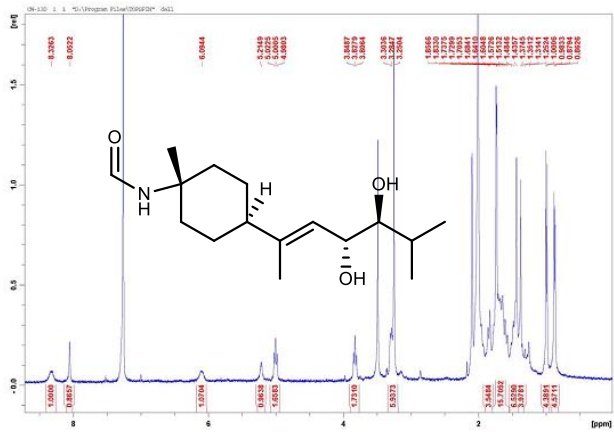
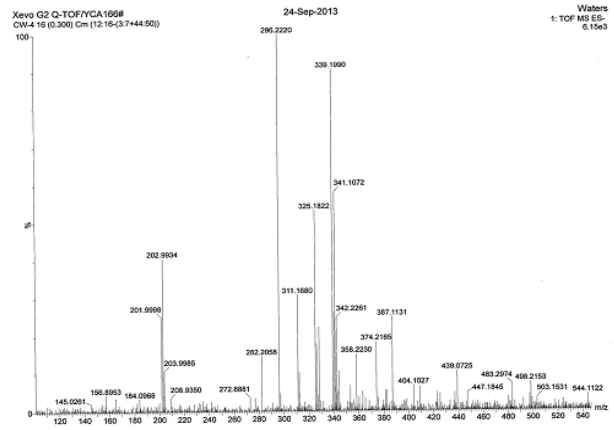
รูปผนวกที่ 2 สเปกตรัม ESIMS, ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารที่ 2



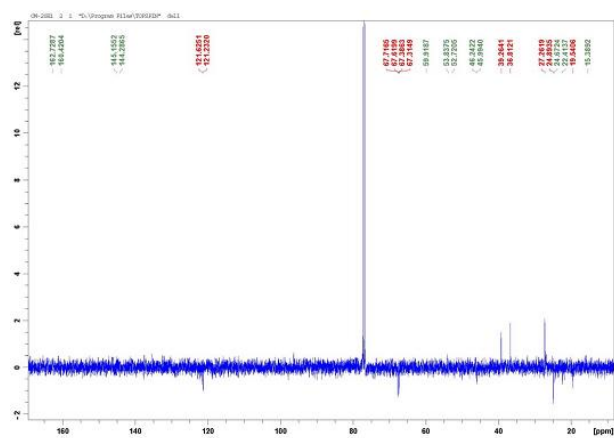
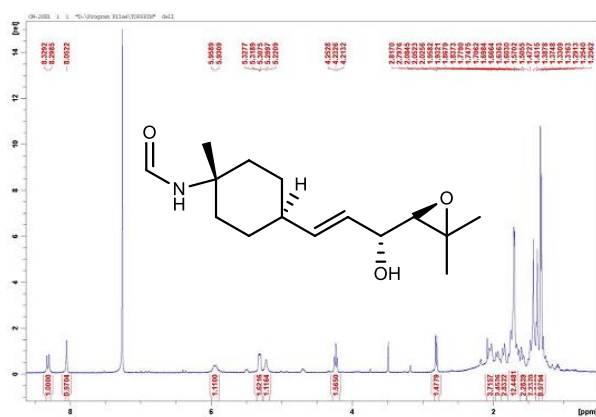
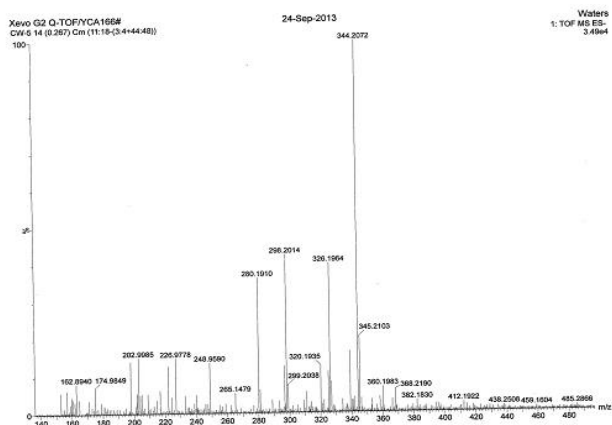
รูปผนวกที่ 4 สเปกตรัม ESIMS, ¹H NMR และ ¹³C NMR ของสารที่ 4



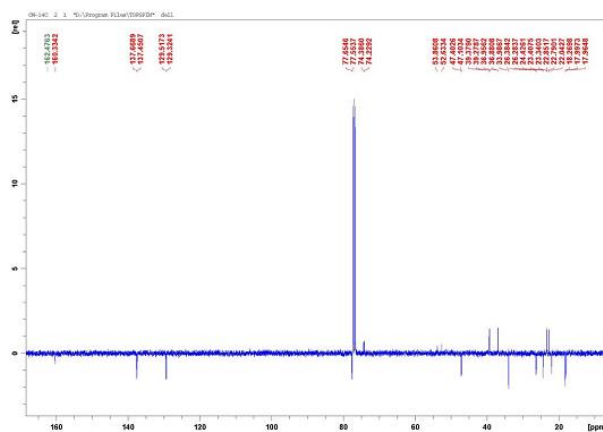
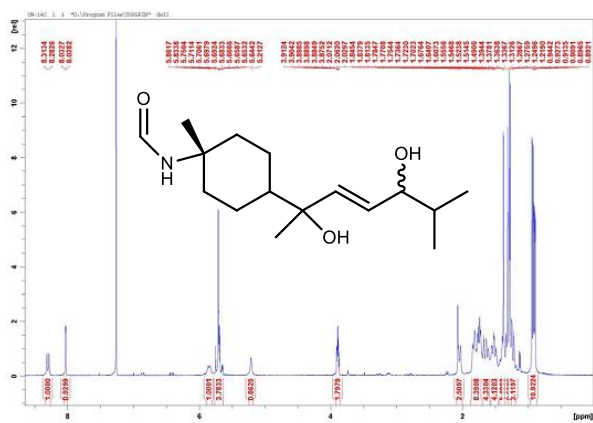
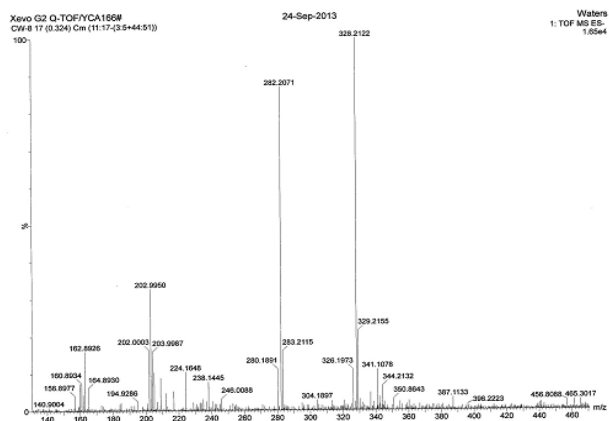
รูปผนวกที่ 5 สเปกตรัม ESIMS, ¹H NMR และ ¹³C NMR ของสารที่ 5



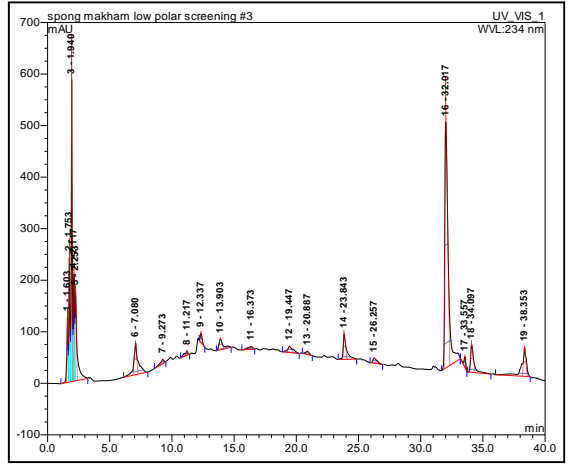
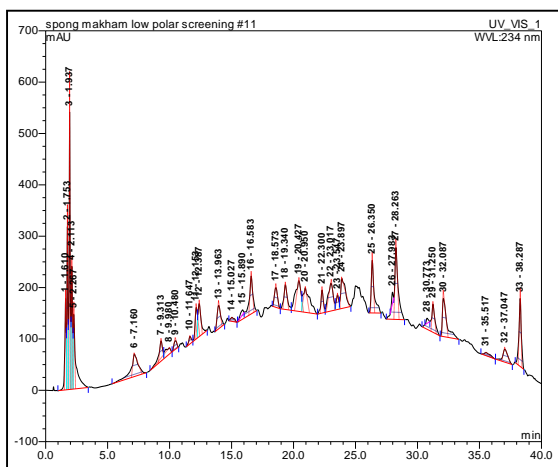
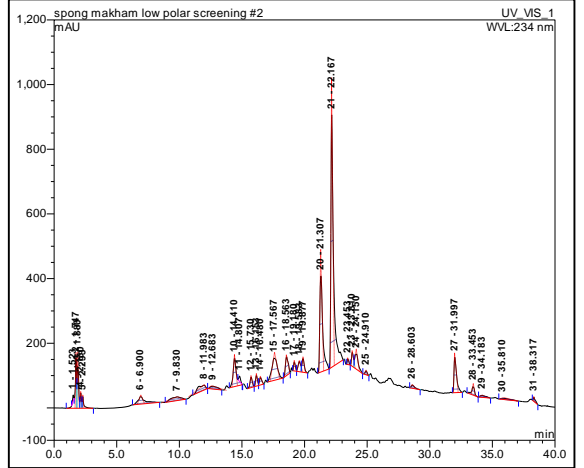
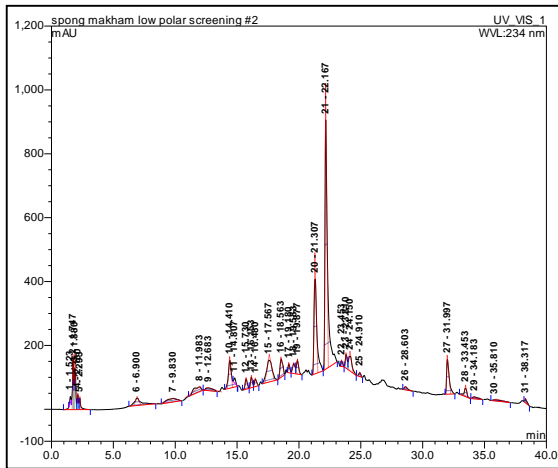
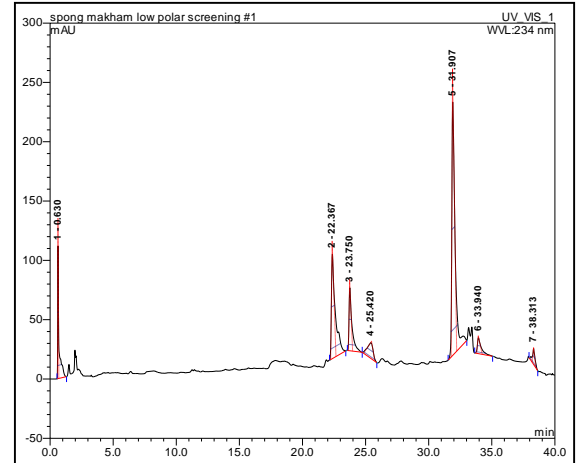
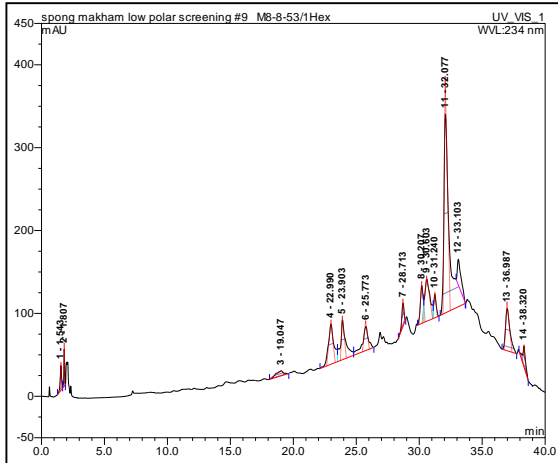
รูปผนวกที่ 6 สเปกตรัม ESIMS, ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารที่ 6



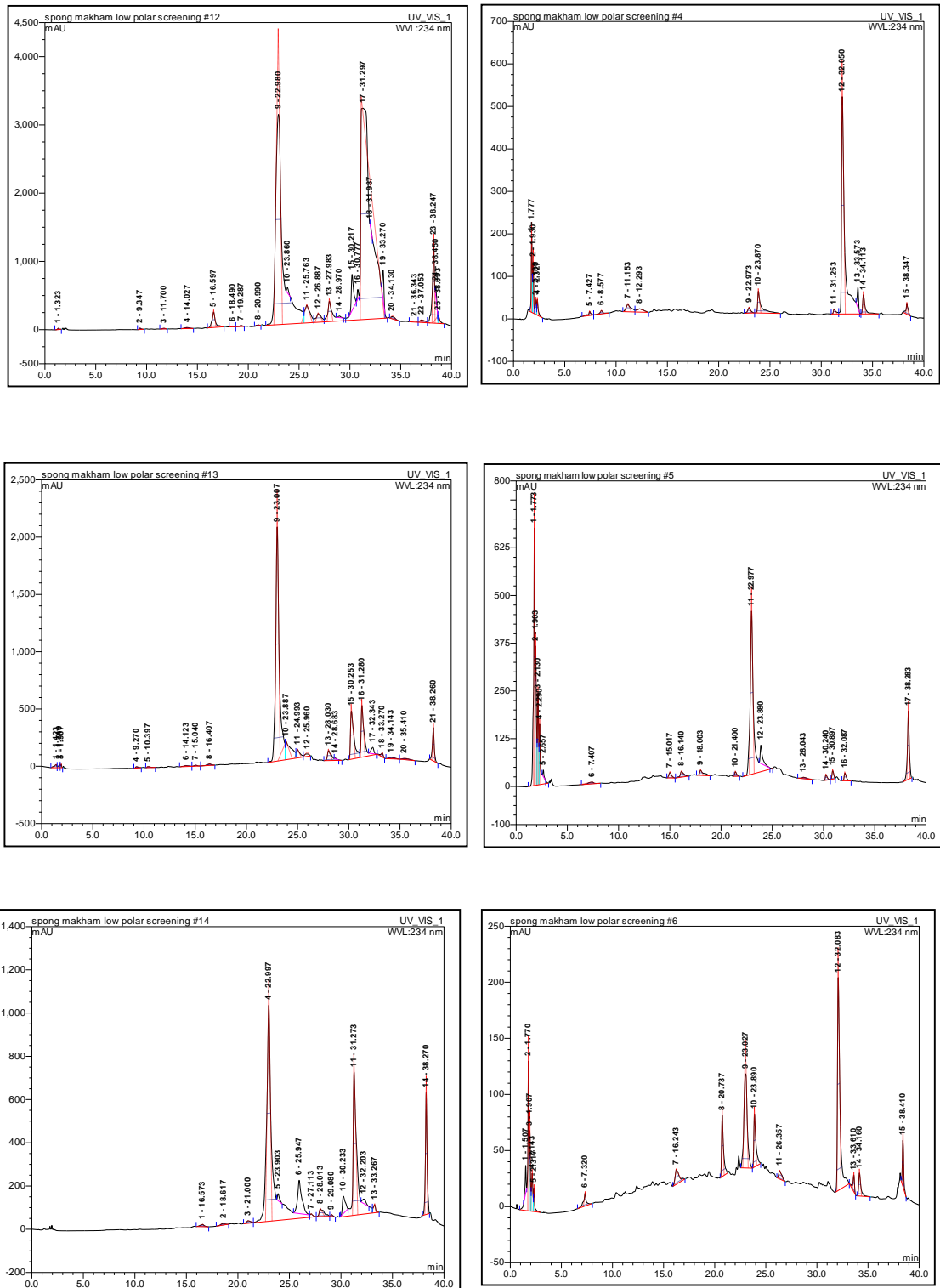
รูปผนวกที่ 7 สเปกตรัม ESIMS, ¹H NMR และ ¹³C NMR ของสารที่ 7



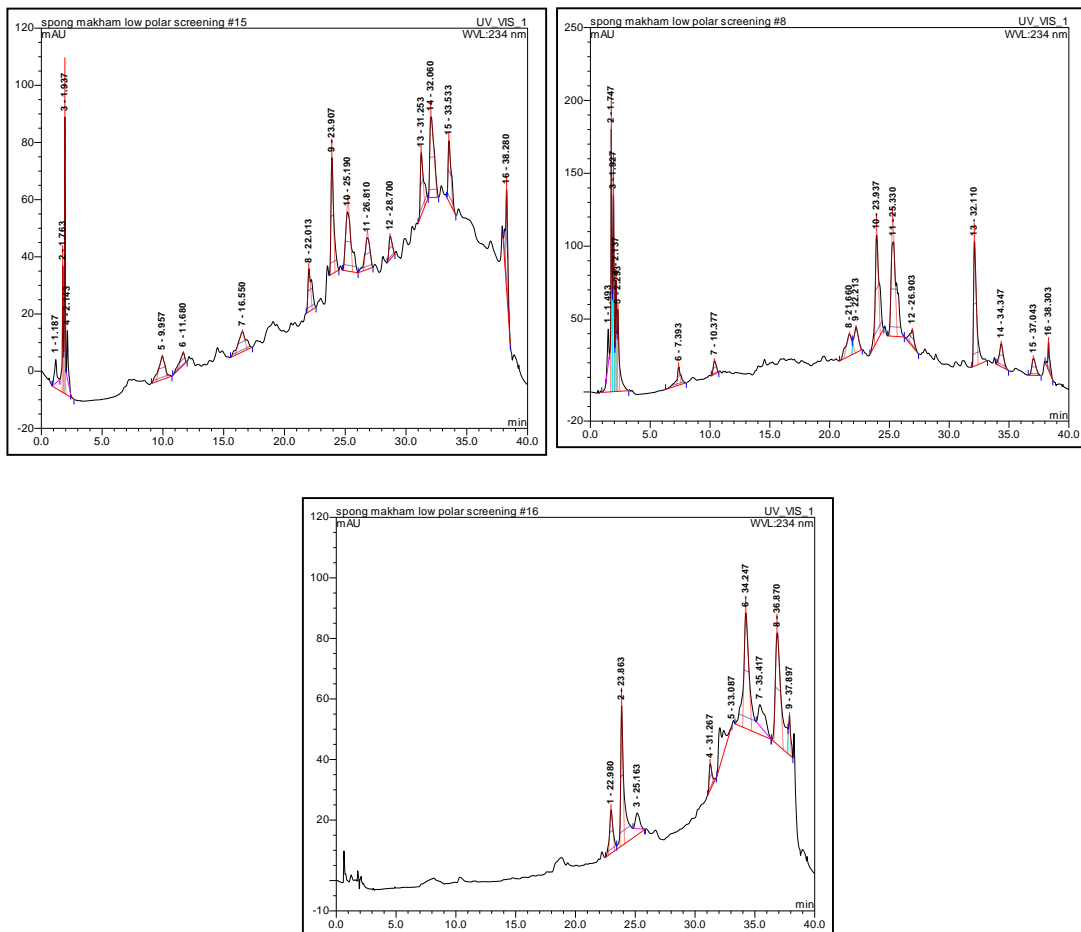
รูปผนวกที่ 10 สเปกตรัม ESIMS, ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารที่ 10



รูปที่ผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบในสิ่งสกัดหายาจากฟองน้ำโดยวิธี HPLC



รูปที่ผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำโดยวิธี HPLC (ต่อ)



รูปที่ผนวกที่ 13 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในสิ่งสกัดหยาบจากฟองน้ำโดยวิธี HPLC (ต่อ)

โปรแกรม HPLC

TempCtrl =	Off
Pressure.LowerLimit =	15 [psi]
Pressure.UpperLimit =	4351 [psi]
	6.000
MaximumFlowRampDown =	[mL/min ²]
	6.000
MaximumFlowRampUp =	[mL/min ²]
%A.Equate =	%A
%B.Equate =	%B
%C.Equate =	%C
%D.Equate =	%D
	5.000
DrawSpeed =	[μ L/s]
	3000
DrawDelay =	[ms]
	20.000
DispSpeed =	[μ L/s]
DispenseDelay =	0 [ms]

	32.000
WasteSpeed =	[$\mu\text{l/s}$]
	2.000
SampleHeight =	[mm]
InjectWash =	Both
	100.000
WashVolume =	[μl]
	20.000
WashSpeed =	[$\mu\text{l/s}$]
LoopWashFactor =	2
PunctureOffset =	0.0 [mm]
PumpDevice =	Pump
InjectMode =	Normal
SyncWithPump =	On
ColumnOven_Temp.Step =	Auto
ColumnOven_Temp.Average	
=	On
Pump_Pressure.Step =	Auto
Pump_Pressure.Average =	On
Data_Collection_Rate =	5.0 [Hz]
ResponseTime =	2.000 [s]
	234.0
UV_VIS_1.Wavelength =	[nm]
UV_VIS_1.Bandwidth =	1 [nm]
UV_VIS_1.RefWavelength =	Off
UV_VIS_1.RefBandwidth =	1 [nm]
	254.0
UV_VIS_2.Wavelength =	[nm]
UV_VIS_2.Bandwidth =	1 [nm]
UV_VIS_2.RefWavelength =	Off
UV_VIS_2.RefBandwidth =	1 [nm]
	285.0
UV_VIS_3.Wavelength =	[nm]
UV_VIS_3.Bandwidth =	1 [nm]
UV_VIS_3.RefWavelength =	Off
UV_VIS_3.RefBandwidth =	1 [nm]

		366.0
	UV_VIS_4.Wavelength =	[nm]
	UV_VIS_4.Bandwidth =	1 [nm]
	UV_VIS_4.RefWavelength =	Off
	UV_VIS_4.RefBandwidth =	1 [nm]
		600.0
	UV_VIS_5.Wavelength =	[nm]
	UV_VIS_5.Bandwidth =	1 [nm]
	UV_VIS_5.RefWavelength =	Off
	UV_VIS_5.RefBandwidth =	1 [nm]
		400.0
	3DFIELD.RefWavelength =	[nm]
	3DFIELD.RefBandwidth =	1 [nm]
		190.0
	3DFIELD.MinWavelength =	[nm]
		600.0
	3DFIELD.MaxWavelength =	[nm]
	3DFIELD.BunchWidth =	1 [nm]
0	Autozero	
		1.000
	Flow =	[mL/min]
	%B =	0.0 [%]
	%C =	0.0 [%]
	%D =	0.0 [%]
		UV.Ready and
		ColumnOven.Ready
	Wait	and Sampler.Ready
	Inject	
	ColumnOven_Temp.AcqOn	
	Pump_Pressure.AcqOn	
	UV_VIS_1.AcqOn	
	UV_VIS_2.AcqOn	
	UV_VIS_3.AcqOn	
	UV_VIS_4.AcqOn	
	UV_VIS_5.AcqOn	

	Temp_Lamphouse.AcqOn	
	3DFIELD.AcqOn	1.000
	Flow =	[ml/min]
	%B =	0.0 [%]
	%C =	0.0 [%]
	%D =	0.0 [%]
30	Flow =	1.000 [ml/min]
	%B =	0.0 [%]
	%C =	100.0 [%]
	%D =	0.0 [%]
35	Flow =	1.000 [ml/min]
	%B =	0.0 [%]
	%C =	100.0 [%]
40	ColumnOven_Temp.AcqOff	
	Pump_Pressure.AcqOff	
	UV_VIS_1.AcqOff	
	UV_VIS_2.AcqOff	
	UV_VIS_3.AcqOff	
	UV_VIS_4.AcqOff	
	UV_VIS_5.AcqOff	
	Temp_Lamphouse.AcqOff	
	3DFIELD.AcqOff	1.000
	Flow =	[ml/min]
	%B =	0.0 [%]
	%C =	40.0 [%]
	%D =	0.0 [%]
	End	

