เลขที่อนุสิทธิบัตร 22935

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ	2103003555
วันขอรับอนุสิทธิบัตร	1 ธันวาคม 2564
ผู้ประดิษฐ์	นายทิวธวัฒ นาพิรุณ และคณะ
ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์	กรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 15 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2566

หมดอายุ ณ วันที่ 30 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2570

(นายกิตติวัฒน์ ปัจฉิมนันท์)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ
1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

Ref.256601092226940

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาชีววิทยา พฤกษเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) เป็นสาหร่ายสีเขียวหลายเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีถิ่นอาศัยอยู่ในน้ำเค็ม (marine multicellular green algae) ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Caulerpaceae หรือวงศ์สาหร่ายพวงองุ่นตามการจัดจำแนกทางและระบบการตั้งชื่อทางอนุกรมวิธานของ International code of Nomenclature for Algae Fungi and Plant (ICN) ปัจจุบันสาหร่ายสกุลนี้พบมากกว่า 100 ชนิดทั่วโลกมีการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในบริเวณชายฝั่งของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์และหมู่เกาะแปซิฟิก บริเวณที่มีความหลากหลายของสาหร่ายสกุลนี้สูงสุดตามรายงาน ได้แก่ ทะเลแคริเบียน หมู่เกาะและชายฝั่งของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และทะเลน้ำอุ่นทางตอนใต้ของออสเตรเลีย (Reine *et al*. 1996) โดยในหมู่เกาะและชายฝั่งของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีชนิดที่เป็นชนิดเฉพาะถิ่นหรือถิ่นเดียว (endemic species) ประมาณ 1 ใน 3 ของจำนวนชนิดในสกุลนี้ (Belton *et al*. 2019) สำหรับนิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิของน้ำ ความเข้มของแสง กระแสน้ำในมหาสมุทร ความลึก ตะกอนและพื้นผิวหน้าดินใต้ท้องทะเล (Ohba *et al*. 1992; Gacia *et al*. 1996; de Senerpont Domis *et al*. 2003; Glasby and Gibson 2007; Crockett and Keough 2014) สำหรับในประเทศไทยสาหร่ายพวงองุ่นเป็นสาหร่ายเศรษฐกิจที่ถูกนำมาเพาะเลี้ยงและส่งเสริมในประเทศไทยเป็นครั้งแรกโดยกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 และมีการพัฒนาทั้งคุณภาพและปริมาณผลผลิตอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามด้วยการอาศัยน้ำเค็มเป็นหลักในการเพาะเลี้ยงและมีฤดูกาลเก็บเกี่ยวที่ต้องวางแผนการเก็บเกี่ยวในช่วงก่อนฤดูฝน หรือการวางแผนการเปลี่ยนถ่ายน้ำเค็มและปริมาณความเค็มให้คงที่นั้น อาจส่งผลต่อผลผลิตและการเจริญเติบโตได้

สาหร่ายพวงองุ่นมีลักษณะลำต้นทอดเลื้อยสีเขียวหรือที่เรียกว่าไหล (stolon) เชื่อมติดอยู่กับส่วนคล้ายเหง้า (rhizoids) ซึ่งช่วยในการยึดเกาะกับพื้นผิวใต้ท้องน้ำ ลักษณะส่วนที่คล้ายใบหลัก เรียกว่าแอสสิมิเลเตอร์ (assimilator) แบ่งได้ 4 รูปแบบ คือ แบบรูปลิ้น (ligulate), แบบกิ่งก้าน (distichous), แบบไม่สมมาตร (irregular) และแบบฉัตรเรียงชั้น (verticillate) โดยสาหร่ายพวงองุ่นมีลักษณะของใบหลักเป็นแบบไม่สมมาตร (irregular) นอกจากนั้นยังมีลักษณะของใบย่อยที่แตกออกเรียกว่ารามูไล (ramuli) สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 แบบคือ แบบรูปทรงกระบอก (terete), แบบรูปทรงกระบอง (clavate), แบบรูปทรงใบบัว (peltate), แบบรูปทรงกลมเว้า (concave), แบบรูปทรงใบพัด (turbinate), แบบรูปทรงถุงกลม (vesiculate)

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

[22935 - 1/10]

และแบบรูปทรงโค้ง (falcate) ซึ่งสาหร่ายพวงองุ่นมีใบย่อยแบบรูปทรงถุงกลม (vesiculate) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวงวานวิวัฒนาการจากข้อมูลชีวโมเลกุลของสาหร่ายพวงองุ่น พบว่ายีนบริเวณ *tufa*, *rbcL* และ ITS สามารถช่วยสนับสนุนการระบุชนิดของสาหร่ายพวงองุ่นซึ่งสอดคล้องกันกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย (*Zubia et al.* 2020)

ในด้านการใช้ประโยชน์สาหร่ายชนิดนี้มีความนิยมมากเกี่ยวข้องกับการใช้ในการดูแลสุขภาพมาอย่างยาวนาน และมีชื่อทางการค้าว่า กรีนคาเวียร์ (Green Caviar) สำหรับในประเทศไทยพบได้ทั้งตามธรรมชาติบริเวณแนวชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและชายฝั่งทะเลอันดามัน และในระบบบ่อเลี้ยง สาหร่ายชนิดนี้อุดมไปด้วยสารสำคัญทางพฤกษเคมีที่มีประโยชน์และมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารคูเลอร์ปิน (caulerpin) สารสำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มสารแอลคาลอยด์ ซึ่งมีคุณสมบัติโดดเด่นเกี่ยวข้องกับการลดการอักเสบ และการติดเชื้อของแผลที่ผิวหนัง เป็นต้น นอกจากนี้คูเลอร์ปินยังสารที่เป็นเอกลักษณ์ทางเคมี (chemical marker) ในทางเคมีอนุกรมวิธานของสาหร่ายในสกุลนี้ด้วย โครงสร้างของสารดังกล่าวสังเกตได้จากวงแหวน (heterocyclic ring) ที่มีไนโตรเจน (N) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นแอลคาลอยด์ชนิดอินโดลแอลคาลอยด์ (Indole alkaloid) เนื่องจากมีสารตั้งต้น (precursor) เป็นกรดอะมิโน ชนิดทริปโตเฟน (Tryptophan) วางกลับทิศด้านซ้ายขวาประกบวงแหวนที่มีคาร์บอน 8 อะตอม หรือเรียกว่า บิส-อินโดล แอลคาลอยด์ (Bis-indole alkaloid) สารคูเลอร์ปินที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นรวมถึงสารสกัดหยาบที่มีสารดังกล่าวผสมอยู่มีแน้วโน้มเป็นสารมูลค่าสูงในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเฉพาะในเวชสำอางค์ประเภทเซรั่ม และผลิตภัณฑ์น้ำตบ ที่ช่วยในการลดริ้วรอยหรือการอักเสบจากหลุมสิวหรือการรักษาสิว รวมถึงผู้ที่มีรูขุมขนกว้าง ทั้งยังช่วยยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด ตลอดจนให้ความชุ่มชื้นกับผิวหนัง (Souza *et al*., 2009) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นและสารดังกล่าวมีการจำหน่ายและได้รับการรับรองว่าเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่เป็นที่นิยมในประเทศแถบเอเชียตะวันออก เช่น เกาหลี ญี่ปุ่น และจีน

จากการสืบค้นสิทธิบัตรและอนุสิทธิบัตรที่ผ่านมาในการนำสาหร่ายพวงองุ่นมาใช้ประโยชน์ พบว่าภาวินี ดีแท้ และอุมาพร ฉัตรศรีสุวรรณ (2562) ได้ยื่นจดอนุสิทธิบัตรกรรมวิธีการเตรียมสาหร่ายพวงองุ่นผงและผลิตภัณฑ์ โดยล้างสาหร่ายพวงองุ่นให้สะอาดแล้วนำมาทำให้แห้ง และบดให้เป็นผงละเอียดจะได้สาหร่ายพวงองุ่นผงสำหรับใช้ในอตุสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และอาหารเสริม (สิทธิบัตรเลขที่ 17620) นอกจากนี้ยังมีสิทธิบัตรกระบวนการเตรียมสารสกัดน้ำจากสาหร่ายน้ำจืดสกุลสไปโรไจรา (*Spirogyra* spp.) คลาโดโฟรา (*Cladophora* และ *Microspora* spp.) หรือนอสโทชอพซิส (*Nostochopsis* sp.) โดยนำสาหร่ายไปต้มในน้ำร้อนแล้วกรองแยกสาหร่าย จากนั้นนำส่วนใสไประเหยให้แห้งและสกัดด้วยตัวทำละลาย และทำให้แห้งโดยการแช่เยือกแข็ง จะได้สารสกัดน้ำจากสาหร่ายน้ำจืดเพื่อใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอางต่อไป (ดวงพร อมรเลิศพิศาล, 2556 เลขที่คำขอ 1301001252) ซึ่งจากการสืบค้นยังไม่มีอนุสิทธิบัตรการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปินในประเทศไทย ในส่วนของข้อแตกต่างของกรรมวิธีการสกัดกับการประดิษฐ์ก่อนหน้านี้ พบว่าวิธีการที่ได้รายงานในครั้งนี้เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน (Simplified method) กล่าวคือสามารถแยกส่วนสารสกัดหรือเฟรคชั่น (fraction) ที่มีส่วนผสมของสารคู

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

เลอร์ปินได้จากระบบตัวทำละลายที่คณะผู้วิจัยได้ทำการทดลองแล้ว ตามระบบตัวทำละลายในตารางที่ 3 ซึ่งยังไม่มีการใช้ระบบตัวทำละลายและสัดส่วนตัวทำละลายนี้ในสาหร่ายพวงองุ่นมาก่อน ก่อนหน้านี้มีการสกัดสารคูเลอร์ปินและสารสกัดที่มีสารคูเลอร์ปินเป็นส่วนผสมจากสาหร่ายพวงองุ่น แต่มีการใช้ระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกันออกไปเพื่อให้เกิดการแยกสารคูเลอร์ปินหรือส่วนของสารสกัดที่มีคูเลอร์ปินของสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่น เช่น ใช้ระบบตัวทำละลายที่มีส่วนผสมระหว่าง ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) : อะซิโตน (Acetone) ในสัดส่วน 50:50 ตามรายงานของ (Laurent *et al*., 1984) ใช้ตัวทำละลาย ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) เพียงชนิดเดียวตามรายงานของ (Kase *et al*., 2019) และเมื่อเทียบกับกระบวนการที่ได้ทดสอบและพัฒนาขึ้นครั้งนี้พบว่า เมื่อพิจารณาจากลักษณะการแยกของสารทางกายภาพด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เหมือนกัน ระบบตัวทำละลายที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารกัดได้ดียิ่งขึ้นโดยมีส่วนผสมของตัวทำละลายระหว่าง เฮกเซน (Hexane) : ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) : เมทานอล (Methanol) ที่สัดส่วนแตกต่างกัน ระบบตัวทำละลายที่ได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อการแยกส่วนสารสกัดที่มีสารคูเลอร์ปิน พบว่าสารคูเลอร์ปินจะถูกละลายออกมากับสัดส่วนตัวทำละลาย เฮกเซน (Hexane) : ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) : เมทานอล (Methanol) ในอัตราส่วนของตัวทำละลาย 0-95:0-100:0-100 มิลลิลิตร และสารสกัดส่วนที่แยกได้สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์หรือนำไปพัฒนาต่อไปได้ง่ายจากการมีส่วนของสารอื่นที่เจือปนอยู่น้อยลงจากลักษณะที่ปรากฏทางกายภาพหรือสีของสาร

<u>ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์</u>

กรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ นำสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) ทุกส่วนที่ผ่านการอบแห้งด้วยลมร้อน 60-65 องศาเซลเซียส มาบดให้ละเอียด แช่หมักในเมทานอล ปิดฝาให้สนิท นำไปเก็บไว้ในที่มืด 7-10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (37 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้น นำสารละลายที่ได้กรองและกลั่นระเหยแบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบเป็นของเหลวหนืดนำมาละลายแยกส่วนของสารสกัด แล้วนำสารสกัดที่ได้มาเติมเมทานอลนำไปเก็บในขวดสีชาในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 0-8 องศาเซลเซียส สารสกัดนี้จะถูกนำไปศึกษาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC) เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) และทำการแยกส่วนด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบการใช้ระบบตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน (gradient elution) นำไปทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบางอีกครั้ง และตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคป (Nuclear Magnetic Resonance; NMR)

โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนากรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน ที่สามารถแยกส่วนสารสกัดที่มีสารคูเลอร์ปินเป็นส่วนผสมอยู่ได้ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นแบบไม่ซับซ้อนและสารสกัดสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์หรือพัฒนาได้ง่ายขึ้นจากการที่มีสารอื่นผสมอยู่น้อยลง ซึ่งสามารถถ่ายทอดให้กับภาคอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการผลิตสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปินเพื่อการจำหน่ายทางเชิงพานิชย์ต่อไป

NSC 63

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

กรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ก. ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น มีวิธีดังนี้

- นำสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) ทุกส่วนมาอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7-10 วัน และนำมาปั่นให้ละเอียด

- นำสาหร่ายพวงองุ่นที่ปั่นละเอียดแล้ว มาแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (MeOH) จนท่วมในภาชนะที่ปิดสนิท เก็บในที่มืดเป็นระยะเวลา 7-10 วัน ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองแยกสารละลายด้วยกระดาษกรอง

- นำสารละลายที่ผ่านการกรอง มากลั่นระเหย ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่ระดับความดัน - 0.5 ถึง - 0.8 บาร์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-47 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยแห้งจนได้สารสกัดหยาบเป็นของเหลวหนืด

ข. ขั้นตอนการแยกส่วนของสารสกัด มีวิธีดังนี้

- นำสารสกัดหยาบที่ได้จากขั้อนตอนข้อ ก. มาละลายแยกส่วนของสารสกัด ด้วยคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกัน ระหว่างคลอโรฟอร์ม (chloroform; $CHCl_3$) และน้ำกลั่น ในกรวยแยกสำหรับการแยกชั้นของสารละลาย วางทิ้งไว้ 40-45 นาที จนได้การแยกชั้นของสารละลายสามชั้น ประกอบด้วยชั้นบนสุดเป็นชั้นน้ำกลั่น ชั้นกลางเป็นส่วนของไขมัน น้ำมัน และชั้นล่างเป็นชั้นคลอโรฟอร์ม

- เก็บส่วนสารสกัดที่ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform; $CHCl_3$) เรียกว่า สารสกัดส่วนลิโปฟิลิค (lipophilic extract) ซึ่งอยู่ชั้นล่างของสารละลายทั้งหมดนำมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดันที่ระดับความดัน - 0.5 ถึง - 0.8 บาร์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-47 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยแห้งอีกครั้ง จะได้สารสกัดที่ก้นภาชนะ

- เติมเมทานอลในสารสกัดที่ได้ และเก็บสารละลายในขวดสีชา แช่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 0-8 องศาเซลเซียส

ค. ขั้นตอนการแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบที่ใช้ระบบตัวทำละลายแบบผสมตามคุณสมบัติความมีขั้ว มีวิธีดังนี้

นำสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนข้อ ข. มาแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบที่ใช้ระบบตัวทำละลายแบบผสมตามคุณสมบัติความมีขั้ว ด้วยตัวทำละลายระหว่าง เฮกเซน (Hexane) : ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) : เมทานอล (Methanol)

ในขั้นตอนข้อ ค. อัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ เฮกเซน (Hexane) : ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) ในอัตราส่วนดังนี้ 0-95:0-100:0-100 มิลลิลิตร

20 NOV 2023

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

การวิเคราะห์สารคูเลอร์ปินที่สกัดได้

นำสารสกัดที่ได้มาตรวจสอบรูปแบบโปรไฟล์ของสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) จำนวน 30 หยด (รายละเอียดดังตารางที่ 1) โดยใช้หลอดคาปิลลารี่ และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร บรรจุในขวดไวแอลสีชาชนิดฝาเกลียว ขนาดควมจุ 1.5 มิลลิลิตร สำหรับงานโครมาโทกราฟี (รายละเอียดดังตารางที่ 2) จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC หลังพ่นด้วยน้ำยาพ่นแบบเจาะจง (specific reagent) ชนิด ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนท์ (เมิร์ก) (Dragendorff's reagent (Merck™)) พบแถบสีส้ม 1 แถบ ที่ค่า Rf (0.92) เมื่อใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) : เอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) (7:3 v/v) การทดสอบในหลอดทดลองโดยการหยด ดราเจนดอร์ฟ รีเอเจนท์ (เมิร์ก) (Dragendorff's reagent (Merck™)) 1 มิลลิลิตร จะปรากฏตะกอนสีส้มที่ก้นหลอดซึ่งเมื่อทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำยังคงพบตะกอน ทำให้ประเมินได้ว่ามีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นส่วนผสมอยู่ในสารสกัดนี้

หลังจากผ่านขั้นตอนการแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบที่ใช้ระบบตัวทำละลายแบบผสม ทำการตรวจสอบโปรไฟล์ของสารด้วยเทคนิค TLC อีกครั้งกับทุกขวดที่เก็บสาร ขวดละ 20 หยด พบว่าโปรไฟล์ของสารในขวดที่ 4 ถึงขวดที่ 6 มีลักษณะโปรไฟล์เหมือนกัน

เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปกลั่นระเหยแบบลดความดันที่อุณหภูมิ 45-47 องศาเซลเซียส พบว่าสารปรากฏเป็นลักษณะของแข็งหลายเหลี่ยมสีส้มผสมกับผลึกของแข็งรูปเข็ม ได้น้ำหนักหลังระเหยแห้งรวม 83.70 มิลลิกรัม และหลังตกผลึกใหม่ (recrystallized) ด้วยตัวทำละลายอีเทอร์ในความเย็น 0-8 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคป (NMR) พบว่าสารดังกล่าวมีสารคูเลอร์ปินเป็นส่วนผสมอยู่

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

รายการ	**รายละเอียด**
เทคนิค (Technique)	ทางเดียว, เคลื่อนที่ขึ้น (One way, ascending)
สิ่งดูดซับ (Absorbent)	แผ่นอลูมิเนียมเคลือบซิลิกา ความหนา 0.2 มิลลิเมตร (silica gel 60 F_{254}; 0.2 mm thickness, Merck™)
ขนาดแผ่นอลูมิเนียมเคลือบซิลิกา (Plate size)	20 x 20 เซนติเมตร
ระบบตัวทำละลาย (Solvent system)	เฮกเซน : เอทิล อะซิเตต ในอัตราส่วน 7:3 (Hexane : Ethyl acetate; 7:3)
ระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร (Distance)	15 เซนติเมตร

Signed by DIP-CA

นายสุวัจชัย บุญอารี

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

รายการ	รายละเอียด
เครื่อง HPLC (HPLC technology)	Agilent 1100 series
เครื่องตรวจสอบด้วยยูวี (UV Detector)	เครื่องตรวจสอบด้วยยูวี ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร (UV photodiode array detector 230 nm wave length)
คอลัมน์ (Column)	คอลัมน์ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (reverse phase ChromSepher 5 C18 column, 250 x 4.6 mm; part number 2 8 1 0 5 -2 5 4 6 3 0 , Thermo Scientific™)
ตัวอย่าง (Samples)	ใช้สารสกัดความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร กรองด้วยตัวกรองไนลอน และใช้ปริมาณฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร (10 mg/ml of lipophilic extract filtered with 13 mm x 0.45 µm Nylon filter Injection : 20 µl)
อัตราการไหลของสาร (Flow rate)	1 มิลลิลิตรต่อนาที (1.0 ml/min)
เวลาในการตรวจสอบ	35 นาที (35 mins)
ระบบตัวทำละลาย (Solvent system)	เมทานอล (เกรด HPLC; Merck™) และสารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer) ซึ่งผสมกันระหว่างน้ำบริสุทธิ์สูงอัลตร้าเพียวร์ 500 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.015 โมลาร์ เตตระบิวทิล แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เออาร์เกรด ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ 0.015 ออร์โธ-ฟอส ฟอริก แอซิด เออาร์เกรด พีเอช 3 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (methanol gradient 60%-100% (HPLC grade Merck, in aqueous Buffer 0.015 M tetrabutyl ammonium hydroxide; $C_{16}H_{37}NO$, AR grade Fluka™ and 0.015 M ortho-phosphoric acid, AR grade Merck™, pH 3)

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)	**เวลา (นาที)**	**เมทานอล**	**บัฟเฟอร์**
	0.10	60	40
	17.00	90	10
	22.00	100	0
	28.00	100	0
	29.00	60	40

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดของเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้ระบบตัวทำละลายผสมด้วยคุณสมบัติความมีขั้วของตัวทำละลาย (Column chromatography with gradient elution, CC)

รายการ	**รายละเอียด**
ระบบตัวทำละลาย (Solvent system)	ใช้ตัวทำละลายผสมกันระหว่าง เฮกเซน : ไดเอทิล อีเทอร์ : เมทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนดังนี้ 0-95:0-100:0-100 มิลลิลิตร
ขนาดคอลัมน์ (Column size)	คอลัมน์แก้วขนาด 1.7 x 80 เซนติเมตร
สิ่งดูดซับ (Absorbent)	ซิลิกาเจลขนาด 25-40 ไมโครเมตร (Merck™ LiChroprep Silica gel 60, 25-40 µm)
ปริมาตร (Volume)	50 มิลลิลิตรต่อขวดเก็บสาร (fraction)

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

เหมือนกับที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

NOTICE

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

ข้อถือสิทธิ

1. กรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ก. ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น มีวิธีดังนี้

- นำสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*) ทุกส่วนมาอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 - 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 - 10 วัน และนำมาปั่นให้ละเอียด

- นำสาหร่ายพวงองุ่นที่ปั่นละเอียดแล้ว มาแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (MeOH) จนท่วมในภาชนะที่ปิดสนิท เก็บในที่มืดเป็นระยะเวลา 7 - 10 วัน ที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองแยกสารละลายด้วยกระดาษกรอง

- นำสารละลายที่ผ่านการกรอง มากลั่นระเหย ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) ที่ระดับความดัน - 0.5 ถึง - 0.8 บาร์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 - 47 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยแห้งจนได้สารสกัดหยาบเป็นของเหลวหนืด

ข. ขั้นตอนการแยกส่วนของสารสกัด มีวิธีดังนี้

- นำสารสกัดหยาบที่ได้จากขั้นตอนข้อ ก. มาละลายแยกส่วนของสารสกัด ด้วยคุณสมบัติการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกัน ระหว่างคลอโรฟอร์ม (chloroform; $CHCl_3$) และน้ำกลั่น ในกรวยแยกสำหรับการแยกชั้นของสารละลาย วางทิ้งไว้ 40 - 45 นาที จนได้การแยกชั้นของสารละลายสามชั้น ประกอบด้วยชั้นบนสุดเป็นชั้นน้ำกลั่น ชั้นกลางเป็นส่วนของไขมัน น้ำมัน และชั้นล่างเป็นชั้นคลอโรฟอร์ม

- เก็บส่วนสารสกัดที่ละลายในคลอโรฟอร์ม (chloroform; $CHCl_3$) เรียกว่า สารสกัดส่วนลิโปฟิลิค (lipophilic extract) ซึ่งอยู่ชั้นล่างของสารละลายทั้งหมด นำมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดัน ที่ระดับความดัน - 0.5 ถึง - 0.8 บาร์ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 - 47 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยแห้งอีกครั้ง จะได้สารสกัดที่ก้นภาชนะ

- เติมเมทานอลในสารสกัดที่ได้ และเก็บสารละลายในขวดสีชา แช่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 0 - 8 องศาเซลเซียส

ค. ขั้นตอนการแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบที่ใช้ระบบตัวทำละลายแบบผสมตามคุณสมบัติความมีขั้ว มีวิธีดังนี้

นำสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนข้อ ข. มาแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบที่ใช้ระบบตัวทำละลายแบบผสมตามคุณสมบัติความมีขั้ว ด้วยตัวทำละลายระหว่าง เฮกเซน (Hexane) : ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) : เมทานอล (Methanol)

2. กรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ที่ซึ่ง ในขั้นตอนข้อ ค. อัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ เฮกเซน (Hexane) : ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether)

NOT OFFICIAL

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

3. กรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน ตามข้อถือสิทธิที่ 1 ถึง 2 ข้อใดข้อหนึ่ง ที่ซึ่ง อัตราส่วนตัวทำละลาย เฮกเซน (Hexane) : ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether):เมทานอล ที่เหมาะสมในอัตราส่วน 0-95:0-100:0-100 มิลลิลิตร

20 ต.ค. 2566

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA

บทสรุปการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปิน โดยการนำสาหร่ายพวงองุ่นมาอบด้วยลมร้อน และปั่นให้ละเอียด แช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอลจนท่วมในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เก็บในที่มืด กรองแยกสารละลาย และกลั่นระเหยสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบลดความดัน จนได้สารสกัดหยาบเป็นของเหลวหนืด จากนั้นแยกส่วนของสารสกัดด้วยคุณสมบัติการละลายที่ต่างกัน โดยใช้คลอโรฟอร์ม และน้ำกลั่นในการแยกชั้นของสารละลาย ไขเก็บชั้นสารละลายส่วนลิโปฟิลิค นำมาระเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบลดความดันจนแห้ง เติมเมทานอลและเก็บในขวดสีชาจากนั้นนำไปแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้ระบบตัวทำละลายผสมตามคุณสมบัติความมีขั้วระหว่าง เฮกเซน (Hexane) : ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether) : เมทานอล (Methanol) กรรมวิธีนี้สามารถถ่ายทอดให้เป็นประโยชน์ในการผลิตสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นที่มีส่วนประกอบของสารคูเลอร์ปินเชิงพานิชย์ต่อไป

N N 3 0 3 5

นายสุวัจชัย บุญอารี

Signed by DIP-CA