


การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเทอร์พินอยด์โดยกระบวนการทางชีวภาพด้วย
Aspergillus niger



นางสาวจรุสลักษณ์ เพชรวัง

สถาบันวิทยบริการ
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-1231-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOTRANSFORMATION OF TERPENOID COMPOUNDS BY *Aspergillus niger*



Miss Jaraslak Pechwang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-13-1231-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์
หัวข้อวิทยานิพนธ์

โดย
สาขาวิชา
อาจารย์ที่ปรึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเทอร์พินอยด์
โดยกระบวนการทางชีวภาพด้วย *Aspergillus
niger*
นางสาวจรัสลักษณ์ เพชรวัง
เทคโนโลยีทางชีวภาพ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.हररषा ปุณณะพยัคฆ์
รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)
.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. हररषा ปุณณะพยัคฆ์)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)
.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภคกุล)
..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จรัสลักษณ์ เพชรวัง :การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเทอร์ปีนอยด์โดยกระบวนการทางชีวภาพด้วย *Aspergillus niger* (BIOTRANSFORMATION OF TERPENOID COMPOUNDS BY *Aspergillus niger*) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.हररषषषष ปุณณะพยัคษั, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.อมร เพชรสม; 69 หน้า. ISBN 974-13-1231-8.

การเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid ซึ่งสกัดได้จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius* Roxb.) โดยอาศัย *Aspergillus niger* ภายหลังกการบ่มเป็นเวลา 7 วัน สกัดแยกผลิตภัณฑ์ด้วยไดคลอโรมีเทนและตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโต- กราฟี จากโครมาโตแกรมปรากฏจุดที่มีค่า R_f ต่างจากสารตั้งต้น 3 จุด คือ R_f 0.68, 0.61 และ 0.58 ตามลำดับ นำส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนมาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้สารประกอบ 3 ชนิด โครงสร้างของสารประกอบทั้งสามพิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาศัยเทคนิคทางสเปก- โทรสโคปี ข้อมูลของแมสสเปกโทรสโกปีของสารประกอบ 1 (R_f 0.68) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 316 ดังนั้นคาดว่าควรจะมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_3$ สารประกอบ 2 (R_f 0.61) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 332 คาดว่าสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_4$ ส่วน สารประกอบ 3 (R_f 0.58) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแมส- สเปกโตรเมตรีและวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโมเลกุลสามมิติพบว่าสารประกอบ 3 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 348 และมีโครงสร้างเป็น *ent*-(7 β ,11 α)-dihydroxy-1-oxo-kaur-16-en-19-oic acid

ภาควิชา
สาขาวิชา ...เทคโนโลยีทางชีวภาพ...
ปีการศึกษา ...2543.....

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4072224223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Aspergillus niger* / BIOTRANSFORMATION / TERPENOID COMPOUNDS

JARASLAK PECHWANG: BIOTRANSFORMATION OF TERPENOID COMPOUNDS BY

Aspergillus niger. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. THESIS

CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D. 69 pp. ISBN 974-13-1231-8.

Biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid, the kaurene diterpenoid isolated from the plant *Croton oblongifolius* Roxb., was performed using *Aspergillus niger*. After 7 days of incubation, the culture was extracted with dichloromethane and the products were assayed by Thin Layer Chromatography (TLC). The TLC chromatogram showed three spots with R_f values of 0.68, 0.61 and 0.58. The dichloromethane extract was separated by column chromatography into three compounds. The structures of these three compounds were elucidated using spectroscopy technique. Mass spectrum of compound 1 (R_f 0.68) showed that the expected molecular weight is 316. Consequently, the expected molecular formula of compound 1 is $C_{20}H_{28}O_3$. Compound 2 (R_f 0.61) showed the expected molecular weight at 332 due to mass spectrometric data and the expected molecular formula of compound 2 is $C_{20}H_{28}O_4$. The structure elucidation of compound 3 (R_f 0.58) using mass spectrometry and X-ray crystallography showed that the molecular weight of compound 3 is 348 and the structure is *ent*-(7 β ,11 α)-dihydroxy-1-oxo-kaur-16-en-19-oic acid

Department.....

Student's signature.....

Field of study..... Biotechnology.....

Advisor's signature.....

Academic year..... 2000.....

Co-advisor's signature.....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ และคำแนะนำ ต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาทำงานวิจัย และได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณา ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และเอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัยจนทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ ตลอดจน กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน ที่ได้กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภคกุล และอาจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวงนิช ที่ได้กรุณาเป็น กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุภาพร ศิริมงคล ที่เอื้อเฟื้อสารตั้งต้นที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์สารเคมีและ เครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอกราบขอบคุณอาจารย์รวมทั้งบุคลากรในภาควิชาฟิสิกส์ทุกท่าน และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ที่ได้เอื้อเฟื้อและให้ความช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.4 สารตั้งต้น.....	26
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 ลักษณะของเชื้อ <i>Aspergillus niger</i>	31
4.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างผลิตภัณฑ์.....	32
4.3 การตรวจหาสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคอินฟราเรด.....	32
4.4 การสกัดสารผลิตภัณฑ์.....	35
4.5 การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์.....	35
4.6 การตกผลึก.....	38
4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์โดยวิธีทางเคมี.....	39
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	43
รายการอ้างอิง.....	50

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้เขียน.....	69



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของปฏิกิริยาไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันโดยจุลินทรีย์.....	5
2	จำนวนหน่วยของ Isoprene และคาร์บอนอะตอมของเทอร์พีนอยด์แต่ละชนิด.....	9
3	ผลการเปลี่ยนโครงสร้างของ <i>ent</i> -Kaurane และ <i>ent</i> -Beyerene โดย <i>Aspergillus ochraceous</i> , <i>Calonectria decora</i> และ <i>Rhizopus nigricans</i>	14
4	ผลการแยกสารจากส่วนสกัดโคคลอโรไมเซนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	37



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การเปลี่ยน Deoxycholic acid เป็น Cortisone โดยวิธีทางเคมี.....	7
2 การเปลี่ยน Progesterone เป็น 11 α -hydroxy progesterone โดย <i>Rhizopus</i>	8
3 หน่วยของไอโซพรีน.....	9
4 การสังเคราะห์ทางชีวภาพของ kaurene และจิบเบอเรลลิน (GA_{12}).....	12
5 การเปลี่ยนโครงสร้างของ <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid โดย <i>Aspergillus</i> <i>ochraceous</i> , <i>Calonectria decora</i> และ <i>Rhizopus nigricans</i>	15
6 การเปลี่ยนโครงสร้างของ <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid (1) โดย <i>Rhizopus</i> <i>stolonifer</i> และผลิตภัณฑ์ที่ได้ <i>ent</i> -7 α -hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (2), <i>ent</i> -12 β -hydroxy-kaur-9 (11) , 16-dien-19-oic acid (3) และ <i>ent</i> -16 β , 17-dihydroxy-kaur-19-oic acid (4).....	17
7 การเปลี่ยน 17-Norkauran-16-one (1) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 β (1a) โดย <i>A. niger</i>	19
8 การเปลี่ยน <i>ent</i> -17-Norkauran-16-one (2) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 α (2a) โดย <i>A. niger</i>	19
9 การเปลี่ยน 17-Norphyllocladan-16-one (3) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล ที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 β (3a) และหมู่คีโตนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 (3b) โดย <i>A. niger</i>	20
10 การเปลี่ยน <i>ent</i> -18-acetoxykaur-16-en-3,7-dion (1) เป็นผลิตภัณฑ์ 5 ชนิด โดย <i>A. niger</i>	21
11 การเปลี่ยน isosteviol (1) เป็น <i>ent</i> -7 α -hydroxy-16-ketobeyeran-19-oic acid (2)และ <i>ent</i> -1 β , 7 α -dihydroxy-16-ketobeyeran-19-oic acid (3) โดย <i>A. niger</i>	22

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การเปลี่ยน isosteviol (1) เป็น <i>ent</i> -17-hydroxy-16- ketobeyeran-19-oic acid (4) โดย <i>A. niger</i>	22
13	การเปลี่ยน isosteviol (1) เป็น <i>ent</i> -7 α -hydroxy-16- ketobeyeran-19-oic acid (5) โดย <i>R. arrhizus</i>	23
14	โครงสร้างทางเคมีของ <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid.....	26
15	ลักษณะของสปอร์ (A) และส่วนสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (B) ของ <i>A. niger</i>	31
16	ลักษณะของโคโลนีของ <i>A. niger</i> เมื่อเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar เป็นเวลา 5 วัน.....	31
17	โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid โดย <i>Aspergillus niger</i> เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ทดสอบด้วยเทคนิค ธินเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน : เอธิลอะซิเตต : กรดแอสติก ในอัตราส่วน 70:30:2.....	33
18	โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid โดย <i>Aspergillus niger</i> เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ทดสอบด้วยเทคนิค ธินเลเยอร์โครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 85:15.....	34
19	โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid โดย <i>Aspergillus niger</i> เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน หลังสกัดสารจาก ส่วนของโคคลอโรมีเทนด้วยเฮกเซน ทดสอบด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโตกราฟี.....	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	โครมาโตแกรมของลำดับส่วนที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ทดสอบด้วยเทคนิคอินฟราเรดโครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 85 : 15.....	38
21	ภาพแสดงโครงสร้างแบบ ORTEP ของ Compound 3.....	39
22	โครงสร้างทางเคมีของ Compound 3.....	40
23	โครงสร้างที่คาดว่าจะเป็นของ Compound 1.....	41
24	โครงสร้างที่คาดว่าจะเป็นของ Compound 2.....	41
25	การเปลี่ยนโครงสร้างของ <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic acid โดย <i>Aspergillus niger</i> เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน.....	49



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเฉพาะสารสกัดจากพืช พบว่ามีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการค้นหาสารชนิดใหม่จากพืช และการทดสอบการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ของสารที่สกัดได้ ตลอดจนการนำสารที่ได้มาปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงเพื่อให้ได้สารชนิดใหม่หรือเพื่อเพิ่มการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้นๆ เพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้ประยุกต์ต่อไป ซึ่งในการนำสารเหล่านี้มาทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนั้นสามารถทำได้ทั้งการใช้กระบวนการทางเคมี (Chemical conversion) โดยการใช้สารเคมีในการทำปฏิกิริยา เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่เรียกว่าไบโอ-ทรานส์ฟอร์มเมชัน (Biotransformation)

ไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการดัดแปรโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น สารในกลุ่มสเตอรอยด์ (steroids) และ เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เนื่องจากพบว่าในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาบางชนิดโดยเฉพาะปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation reaction) โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ในโครงสร้างของสารเทอร์พีนอยด์โดยวิธีทางเคมีนั้นทำได้ยากต้องใช้ปฏิกิริยาหลายขั้นตอนและมีความจำเพาะต่ำ แต่ด้วยกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันโดยอาศัยจุลินทรีย์พบว่าสามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของสารเทอร์พีนอยด์บางชนิดได้ โดยมีข้อดีคือ มีความจำเพาะสูงกว่าวิธีทางเคมี เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ วิธีการง่ายกว่าวิธีทางเคมีและมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่าอีกด้วย สารที่นิยมใช้กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันในการเปลี่ยนโครงสร้างที่มีการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมคือการผลิตยาในกลุ่มของสารสเตอรอยด์บางชนิด (Blanch และคณะ, 1985) นอกจากไบโอ-ทรานส์ฟอร์มเมชันจะเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆในกลุ่มของสารสเตอรอยด์แล้วในทางอินทรีย์เคมีวิธีนี้ยังถูกนำมาใช้สังเคราะห์ในทางเคมีอินทรีย์อีกด้วย

สารเทอร์พีนอยด์เป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในพืช พบว่ามีการสร้างสารเทอร์พีนอยด์หลายชนิด Kaurene diterpenoid จัดเป็นสารเทอร์พีนอยด์ชนิดหนึ่งที่พบได้ในพืชและมีรายงานว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ (Oliverira และคณะ, 1999) จึงมีผู้สนใจศึกษาสารชนิดนี้ ทั้งในด้านการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวภาพและการนำมาดัดแปลงเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีรายงานว่าสารที่

มีหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของ kaurene diterpenoid บางชนิดสามารถเพิ่มการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารชนิดนี้ได้ (Vieria และคณะ, 2000) ไบโอฟทรานส์ฟอร์มชันจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการเปลี่ยนโครงสร้างของสารชนิดนี้

ent-kaur-16-en-19-oic acid เป็นสารที่มีโครงสร้างหลักแบบ kaurene diterpenoid ซึ่งพบในพืชหลายชนิด อีกทั้งมีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เป็นสารยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial activity) ยับยั้งการเจริญของรา (antifungal activity) และลดการอักเสบ (anti-inflammatory activity) เป็นต้น ได้มีรายงานในการเปลี่ยนโครงสร้างของสารชนิดนี้โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดยอาศัยเชื้อราบางชนิด แต่ยังไม่มียางานการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งพบว่าเป็นราที่สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของสารสเตอรอยด์ (Mahato และMajumdar, 1993) และเทอร์พีนอยด์อื่นๆ เช่น α -pinene (Prema และ Bhattacharyya, 1962) Citronellol, Geraniol และ Linalool (Madyastha และคณะ, 1988) (-) และ (+) Menthol, Terpenolene และ Cavotanacetone (Asakawa และคณะ, 1991) รวมถึงสารที่มีโครงสร้างแบบ kaurene diterpenoid บางชนิดด้วย (Anderson, 1974 ; Granados และคณะ , 1986 ; Oliverira และคณะ, 1999)

ในงานวิจัยนี้จะทำการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ซึ่งสกัดได้จากต้นเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius* Roxb.) เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของสารชนิดนี้โดยใช้เชื้อราคือ *A. niger* จากนั้นสกัดและทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์แล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณและโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ด้วยกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันโดย *A. niger* โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid*
2. วิเคราะห์ปริมาณ ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดย *A. niger*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้อนุพันธ์ของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้าง ซึ่งอาจเป็นสารชนิดใหม่ หรือเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ
2. เป็นแนวทางในการนำกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชัน โดย *A. niger* มาประยุกต์ใช้ในการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของสารเทอร์ปีนอยด์ชนิดอื่นๆต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไบโอทรานส์ฟอร์มเมชัน (Biotransformation)

ไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันเป็นกระบวนการทางชีวภาพในการเปลี่ยนแปลงหรือดัดแปรสารเคมีจำพวกสารอินทรีย์ (Rose, 1980) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการโดยอาศัยปฏิกิริยาจากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่ผลิตจากเซลล์ อาจเป็นเซลล์พืช สัตว์หรือจุลินทรีย์บางชนิด (Prave และคณะ, 1987) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันนั้นจะมีโครงสร้างที่แตกต่างไปจากสารตั้งต้นโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ อาจเป็นสารชนิดใหม่หรือได้สารตัวกลางเพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ต่อไป ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันที่รู้จักกันดีและเก่าแก่ที่สุดอย่างหนึ่งคือการทำน้ำส้มสายชู ซึ่งเป็นการเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดแอซีติก โดยอาศัยแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแอซีติกได้ เช่น *Gluconobacter* หรือ *Acetobacter* เป็นต้น (Moat และ Foster, 1988)

โดยทั่วไปกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันมักอาศัยจุลินทรีย์ในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารตั้งต้น ปฏิกิริยาที่สามารถกระตุ้นให้เกิดขึ้นได้มีด้วยกันหลายชนิดดังตัวอย่างในตารางที่ 1 (Wang และคณะ, 1979)

เนื่องจากกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันเป็นปฏิกิริยาที่ถูกกระตุ้นโดยตัวเร่งคือเอนไซม์ ดังนั้นจึงมีข้อแตกต่างจากปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยกระบวนการทางเคมีหลายประการด้วยกัน โดยคุณสมบัติของกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันมีดังนี้ (Prave และคณะ, 1987)

1. เอนไซม์มีความจำเพาะทางปฏิกิริยา (Reaction specificity) โดยเอนไซม์แต่ละตัวจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ชนิดเดียวและยังมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นด้วย (substrate specificity) โดยจะเร่งปฏิกิริยาสำหรับสารตั้งต้นเพียงชนิดเดียวหรือไม่ก็ชนิดเท่านั้น และจากการที่เอนไซม์มีความจำเพาะนี้เองทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงอีกด้วย

2. เอนไซม์มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่จะเกิดปฏิกิริยา (Rigiospecificity) การทำงานของเอนไซม์จะจำเพาะต่อตำแหน่งที่จะเกิดปฏิกิริยาในโมเลกุลของสารตั้งต้นโดยเกิดจากการที่ตำแหน่งที่จะเกิดปฏิกิริยาสามารถจับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้อย่างพอดี

ตารางที่ 1 ชนิดของปฏิกิริยาไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันโดยจูลินทรีย์ (Wang และคณะ1979)

Hydroxylation	Oxidation
Hydrolysis	Esterification
Methylation	Demethylation
Condensation	Hydration
Decarboxylation	Amination
Amidation	Phosphorylation
Racemization	Isomerization
Epoxidation	Reduction
Acylation	Halogenation
Transglycosidation	Epimerization
Dehydration	Deamination
Cleavage of C-C bounds	

3. เอนไซม์มีความจำเพาะต่อโครงสร้างของสารตั้งต้น (Steriospecificity) ในกรณีที่สารตั้งต้นมีโครงสร้างมากกว่าหนึ่งแบบ โดยอาจมีโครงสร้างที่เป็นอิแนนชิโอเมอร์ (enantiomer) กัน ซึ่งอาจรวมกันอยู่ในรูปของของผสมราซิมิก (racemic mixture) เอนไซม์จะสามารถเลือกทำปฏิกิริยาต่ออิแนนชิโอเมอร์ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ได้เพียงอิแนนชิโอเมอร์เดียวเท่านั้น และสามารถเลือกทำปฏิกิริยาต่อสารตั้งต้นชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างเหมือนกันแต่ต่างกันว่า Optical activity ได้

4. ภาวะในการทำงานของเอนไซม์ไม่รุนแรง การทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเกิดได้ในภาวะที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบจึงไม่ต้องอาศัยสารเคมีที่รุนแรง ความเป็นกรดเป็นด่างไม่สูงหรือต่ำ

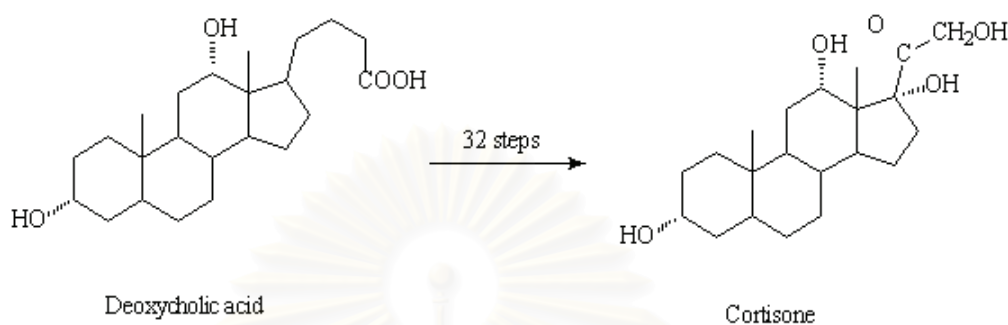
เกินไปซึ่งมักใกล้เคียงค่าความเป็นกลางอีกทั้งยังทำปฏิกิริยาในภาวะที่อุณหภูมิไม่สูงนัก โดยทั่วไปมักต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่สภาพความเป็นกรดต่างหรือที่อุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพและไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งคุณสมบัติในข้อนี้ทำให้การใช้เอนไซม์ในการผลิตง่ายต่อการควบคุมภาวะ มีความปลอดภัยและลดปัญหาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

5. เอนไซม์จะทำงานโดยการลดพลังงานกระตุ้น (Lowering of activation energy) ในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาใด ๆ นั้นโมเลกุลของสารจะต้องมีพลังงานที่ต่ำที่สุดที่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ เรียกว่าพลังงานกระตุ้น (activation energy) ยิ่งปฏิกิริยาเกิดยากขึ้นก็ต้องมีพลังงานกระตุ้นที่สูงขึ้นด้วย การที่จะให้โมเลกุลของสารมีพลังงานมากพอนั้นอาจต้องมีการให้พลังงาน เช่น ให้ความร้อนสูง แต่โดยการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์จะทำงานโดยการลดพลังงานกระตุ้นที่ต้องใช้ให้น้อยลงทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้แม้ในตำแหน่งของสารตั้งต้นที่ยากต่อการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาโดยไม่ต้องใช้ภาวะในการกระตุ้นที่รุนแรง

จากคุณสมบัติดังกล่าวของกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันทำให้มีการนำกระบวนการนี้มาใช้ในการดัดแปรหรือเปลี่ยนแปลงสารต่างๆหลายชนิด โดยนำมาทดแทนกระบวนการทางเคมี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการทางเคมีมีความจำเพาะต่ำกว่าการกระตุ้นโดยเอนไซม์ บางปฏิกิริยาต้องอาศัยการกระตุ้นภายใต้ภาวะที่รุนแรงและอันตราย เช่น ที่อุณหภูมิสูงและใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย บางปฏิกิริยาต้องอาศัยอุปกรณ์ที่ยุ่ยยากราคาแพง มีค่าใช้จ่ายในการผลิตสูง และต้องใช้ปฏิกิริยาหลายขั้นตอนจึงจะได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ นอกจากนี้บางปฏิกิริยาไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดขึ้นได้โดยปฏิกิริยาทางเคมี จากเหตุผลข้างต้นทำให้ไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันเข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมยา และด้านการแพทย์ โดยนำมาใช้ในกระบวนการผลิตแทนวิธีทางเคมีหรือทดแทนวิธีทางเคมีบางส่วนเพื่อให้ได้สารตัวกลางเพื่อใช้ผลิตโดยวิธีทางเคมีต่อไป นอกจากนี้ยังนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างหรือสังเคราะห์สารเคมีชนิดใหม่ หรือตัวยาชนิดใหม่เพื่อความหลากหลายในการนำมาประยุกต์ใช้อีกด้วย (Rose, 1980)

ตัวอย่างในการนำกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ในระยะแรกคือนำมาใช้ในการผลิตยาสเตอรอยด์ ในการผลิตคอร์ติโซน (Cortisone) ซึ่งเป็นสารสเตอรอยด์ชนิดหนึ่งซึ่งใช้บรรเทาอาการปวดในโรค Rheumatoid arthritis (Forgaty และ Kelly, 1990) ในการผลิต

คอร์ติโซน จากสารตั้งต้นคือ Deoxycholic acid พบว่าต้องเติมออกซิเจน ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 11 ซึ่งโดยกระบวนการทางเคมีต้องอาศัยปฏิกิริยาถึง 32 ขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 1

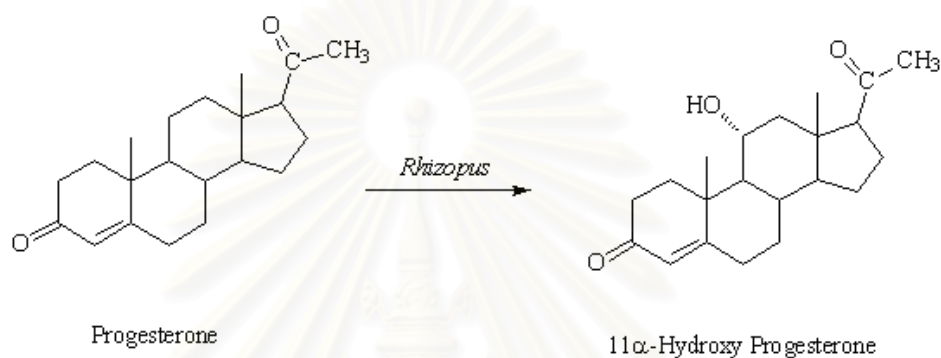


ภาพที่ 1 การเปลี่ยน Deoxycholic acid เป็น Cortisone โดยวิธีทางเคมี (Forgaty และ Kelly, 1990)

จากการผลิตโดยวิธีนี้ คอร์ติโซนที่ได้มีราคาประมาณ 200 ดอลลาร์ต่อกรัม แต่หลังจากที่ Peterson และ Morrey (1952) พบว่าเชื้อราคือ *Rhizopus* สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 11 ในโมเลกุลของโปรเจสเตอโรน (Progesterone) ได้ โดยใช้ปฏิกิริยาเพียงหนึ่งขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 2 และนำ 11 แอลฟา-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน (11 α -hydroxyprogesterone) ที่ได้ไปผลิตคอร์ติโซนและไฮดรอกซีคอร์ติโซนโดยวิธีทางเคมีต่อไป จากการค้นพบครั้งนี้ส่งผลให้มีการศึกษาการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของสารสเตอรอยด์กันมากขึ้นทั้งในการใช้เชื้อราแบคทีเรีย และแอกติโนมัยซิส (*Actinomyces*) ส่งผลให้ราคาของคอร์ติโคสเตอรอยด์ลดลงเหลือเพียงต่ำกว่า 1 ดอลลาร์ต่อกรัม (Forgaty และ Kelly, 1990) จากการศึกษามาจนถึงปัจจุบันพบว่าเชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิดสามารถเปลี่ยนโครงสร้างของสารสเตอรอยด์หลายชนิดได้ (Iizuka และ Naito, 1981)

ในปัจจุบันนอกจากสารสเตอรอยด์แล้วได้มีการนำกระบวนการนี้มาใช้ในการสังเคราะห์หรือดัดแปรสารชนิดต่างๆมากมาย เช่น อัลคาลอยด์ (alkaloid) ยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลิน รวมถึงการใช้กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มชันในการดัดแปรสารเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) บางชนิดด้วย เนื่องจากในโครงสร้างของสารเทอร์พีนอยด์นั้นพบว่าการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาบางชนิดโดยวิธีทางเคมี เช่น ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation reaction) โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิล

หรือปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation reaction) โดยการเติมออกซิเจนในโครงสร้างของสารเทอร์พีนอยด์นั้นทำได้ยาก โดยเฉพาะในตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมที่ยากต่อการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา (Lamare และ Furstoss, 1990)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยน Progesterone เป็น 11 α -hydroxy progesterone โดย *Rhizopus* (Forgaty และ Kelly, 1990)

สารเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid compounds)

สารเทอร์พีนอยด์ เป็นสารที่เกิดจากการจับกันของหน่วยของไอโซพรีน (Isoprene unit) ดังแสดงในภาพที่ 3 ในลักษณะต่างๆกัน เช่น บางชนิดอาจจับกันเป็นวง ทั้งนี้แล้วแต่ functional group และ ระดับของความไม่อิ่มตัว (degree of unsaturation) ซึ่งการจับกันของ isoprene จะต่อกันแบบหัวต่อกับท้าย (head-to-tail)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุตสาหกรรมน้ำหอมและเครื่องสำอางรวมถึงอาหารและเครื่องดื่มได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารเทอร์พีนอยด์บางชนิดสามารถใช้ในการรักษาโรคบางอย่างได้ บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เช่น sesquiterpene lactone ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ triterpene บางชนิดมีฤทธิ์ต้านไวรัส และมาลาเรีย (วีณา, 2534) diterpene บางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและมีปฏิริยาต่อต้านการเกิดเนื้องอก (antitumor activity) (Tomson, 1993) เป็นต้น

ent-kaur-16-en-19-oic acid จาก *Croton oblongifolius* Roxb. หรือเปล้าใหญ่

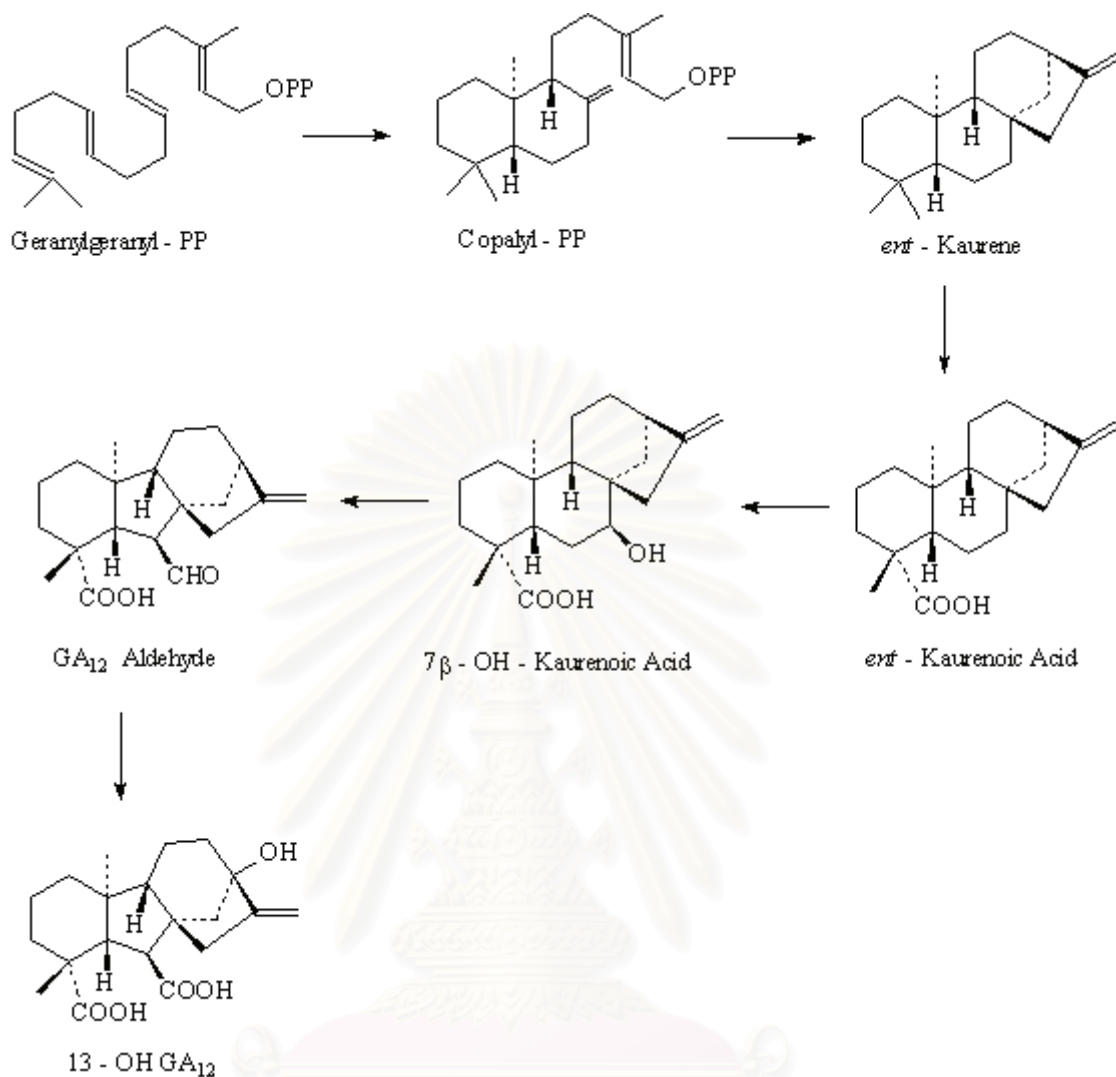
Croton oblongifolius Roxb. หรือเปล้าใหญ่ จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง โดยมักพบกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย เปล้าใหญ่จัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านชนิดหนึ่งซึ่งมีผลในการรักษาโรคหลายชนิด ในประเทศไทยมีงานวิจัยหลายชิ้นรายงานถึงสารเคมีที่พบในพืชสกุลนี้ ซึ่ง *Croton oblongifolius* Roxb. จัดเป็นพืชสมุนไพรของไทยที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากพบว่าเกือบทุกส่วนของต้นสามารถใช้เป็นยาได้ โดยใบสามารถใช้เป็นยาบำรุง ผลใช้รักษาอาการปวดประจำเดือน เมล็ดใช้เป็นยาห้ามเลือด เปลือกใช้รักษาอาการท้องอืด ส่วนรากใช้รักษาโรคท้องร่วงได้ (เสงี่ยม, 2505) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีในต้นเปล้าใหญ่ โดยพบว่าสารที่สกัดได้จากต้นเปล้าใหญ่ที่พบในพื้นที่ต่างๆในประเทศไทยประกอบด้วยสารเคมีที่จัดเป็นสารไดเทอร์พีนอยด์หลายชนิด เช่น Cembrane diterpenoid (Roengsumran และคณะ 1999a) Labdane diterpenoid (Roengsumran และคณะ, 1999b) จากส่วนของเปลือก Clerodane diterpenoid (Aiyar และ Seshadri, 1972) Pimarane diterpenoid (Aiyar และ Seshadri, 1970) และ Isopimarane diterpenoid (Aiyar และ Seshadri, 1971) จากส่วนของเปลือกและเนื้อไม้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม Kaurane diterpene อีกด้วยคือ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* (สุภาพร, 2543)

ent-kaur-16-en-19-oic acid (Kaurenoic acid) จัดเป็น tetracyclic diterpene (Hanson, 1994) ชนิดหนึ่งซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น kaurene diterpene สารนี้สามารถพบได้ในพืชหลายชนิด โดยพบว่า *ent-kaur-16-en-19-oic acid* เป็นสารสำคัญตัวหนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) (Stumpf และ Conn, 1980) ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อการเจริญของพืช เช่น มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์และการยืดยาวของลำต้น เร่งการออกดอกในพืชบางชนิด และมีผลต่อการงอกของเมล็ด เป็นต้น (สมบุญ, 2538) นอกจากนี้ในพืชแล้วยังพบได้ในเชื้อราคือ *Gibberella fujikuroi* ซึ่งเป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ของ *Fusarium moniliforme*

(Turner, 1971) ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพืชโดยมีผลทำให้พืชนั้นเจริญเติบโตผิดปกติ เนื่องจากได้รับ จิบเบอเรลลินมากเกินไป

ในการศึกษาวิถีการสังเคราะห์ kaurene และจิบเบอเรลลินนั้นพบว่ากระบวนการสังเคราะห์มีความคล้ายคลึงกันทั้งในพืชและจุลินทรีย์ โดยวิถีการสังเคราะห์แสดงในภาพที่ 4 จากภาพจะเห็นได้ว่าในกระบวนการสังเคราะห์ต้องผ่านสารตัวกลางคือ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* (kaurenoic acid) เพื่อเปลี่ยนเป็น 7β -hydroxykaurenoic acid และจิบเบอเรลลิน (GA_{12}) ต่อไป จากการค้นพบนี้ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* เพิ่มมากขึ้น นอกเหนือจากคุณสมบัติที่เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินแล้วยังพบว่าตัวมันเองมีฤทธิ์ให้ผลคล้ายกับจิบเบอเรลลินอีกด้วย (Mori และ Matsui, 1966) นอกจากนี้พืชบางชนิดที่มีการสกัดพบ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* นั้นพบว่าเป็นพืชสมุนไพรสามารถนำมารักษาโรคบางชนิดได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* และอนุพันธ์ของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดยในปี ค.ศ. 1986 โดย Yang และคณะได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ (-)-*kaur-16-en-19-oic acid* และ ของผสมของ kaurenoids 3 ชนิดคือ 3α -angeloyloxy-, 3α -tiglinoyloxy- และ 3α -seneciolyloxy-*kaur-16-en-19-oic acid* ในอัตราส่วน 2:1:1.5 ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จาก *Wedelia chinensis* พบว่ามีผลในการยับยั้งความเสียหายของเซลล์เพาะเลี้ยงชั้นปฐมภูมิโดยใช้เซลล์ต้นหนูในการทดลอง พบว่าสามารถลดการทำลายของเซลล์ที่เกิดจากการชักนำของสารเคมีคือ Carbon tetrachloride (CCl_4) และ D-galactosamine (GalN) ได้

นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* และอนุพันธ์ที่มีต่อเชื้อไวรัส HIV โดยในปี ค.ศ. 1996 โดย Wu และคณะ ได้ศึกษาผลของ kaurane derivative ที่สกัดได้จากผลของ *Annona squamosa* คือ $16\beta,17$ -dihydroxy *ent-kaur-19-oic acid* พบว่าสามารถต้านการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส HIV (HIV replication) ใน K9 lymphocyte cell ได้ โดยมีค่า $IC_{50} = 0.8 \mu\text{g/ml}$ และในปี ค.ศ. 1998 โดย Chang และคณะได้ศึกษาสารที่สกัดได้จากผลของ *Annona glaba* 13 ชนิด พบว่า kaurane derivative 2 ชนิดคือ methyl- 16α -hydroxy- 19 -*al-ent-kauran-17-oate* มีผลออกฤทธิ์อย่างอ่อนในการต้านการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส HIV ใน K9 lymphocyte cell และอนุพันธ์อีกชนิดหนึ่งคือ 16α - 17 -dihydroxy-*ent-kauran-19-oic acid* ให้ผลในการยับยั้ง HIV- reverse transcriptase ได้



ภาพที่ 4 การสังเคราะห์ทางชีวภาพของ kaurene และจิบเบอเรลลิน (GA₁₂) (Stumpf และConn, 1980)

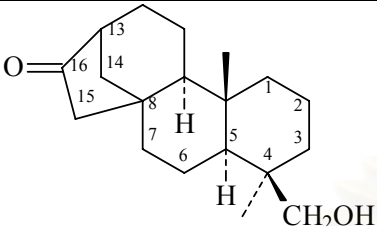
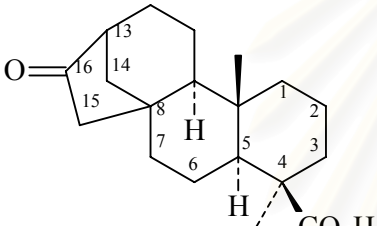
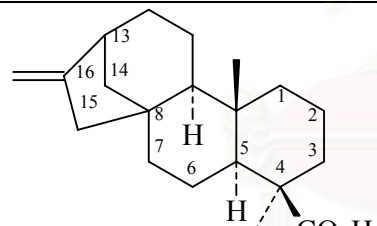
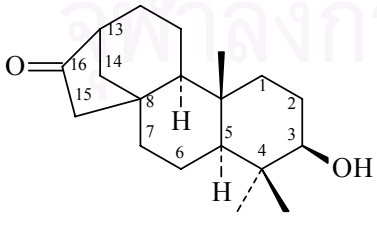
ฤทธิ์ทางชีวภาพของ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid ที่มีการศึกษากันอีกอย่างหนึ่งคือ ความสามารถในการยับยั้ง *Trypanosoma cruzi* ซึ่งเป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่งทำให้เกิดโรค Chagas' disease (American trypanosomiasis) โดยในปี ค.ศ. 1995 โดย Alves และคณะ พบว่า *ent*-kaur-16-en-19-oic acid ที่สกัดได้จาก *Mikania obtusata* มีผลในการยับยั้ง trypomastigote ในเลือด โดยมีค่า IC₅₀ = 0.5 มก./มล. ในปี ค.ศ.1996 โดย Costa และคณะได้ศึกษาผลของ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid, (-)-trachyloban-19-oic acid และ (-)-kauran-16 α -ol ที่สกัดได้จากรากของ *Viguiera aspilioides* และ (-)-kaur-16-en-19-ol ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent*-kaur-16-en-19-oic โดยวิธีทางเคมี พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีผลในการยับยั้ง *T. cruzi* ได้

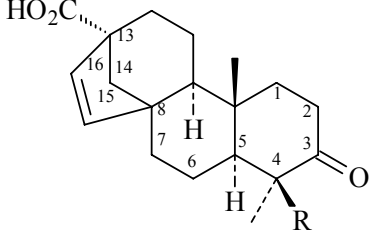
นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ที่สกัดได้จากเปลือกของ *Annona glabra* พบว่ามีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งเชื้อรา มีฤทธิ์ฆ่าแมลงอย่างอ่อน (insecticidal activity) ยับยั้งการงอกของสปอร์ (sporocidal activity) และมีผลทาง Cytotoxic activity เมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง (Padmaja และคณะ, 1995) อีกทั้ง *kaur-16-en-19-oic acid* ยังมีผลในการลดอาการอักเสบ (anti-inflammatory) (Alves และคณะ, 1995) และเป็นสารต้านการเกิดเนื้องอก (Silva และคณะ, 1999) อีกด้วย

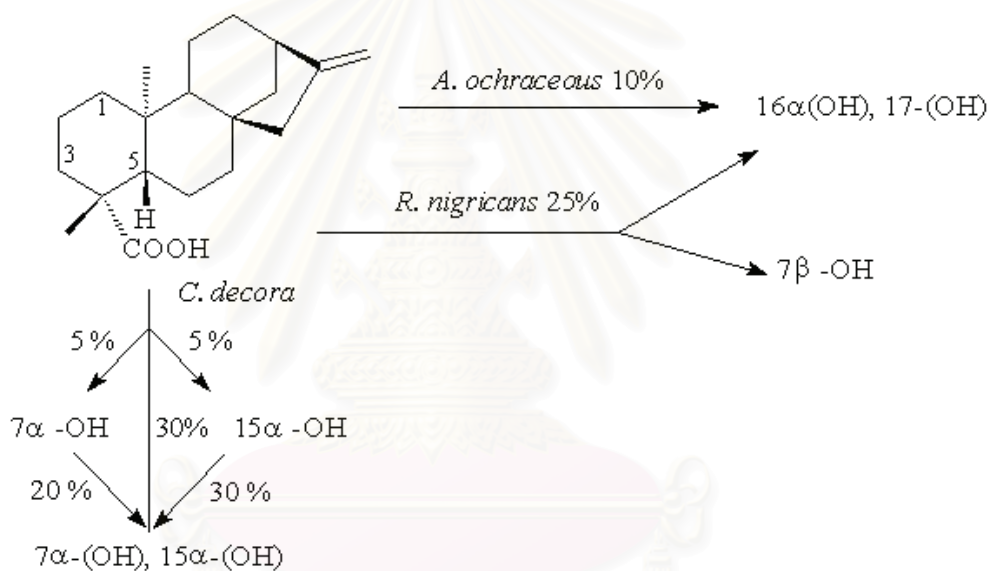
จากคุณสมบัติของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* และอนุพันธ์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวทำให้มีผู้สนใจทำการทดลองเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* เพื่อให้ได้อนุพันธ์ชนิดใหม่หรือเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกทั้งมีรายงานว่าสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างหลักของ *kaurane diterpenoids* นั้นสามารถเพิ่มผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่มนี้ได้ ซึ่งในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของ *kaurene* โดยอาศัยจุลินทรีย์โดยกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันนั้นนับว่าเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ยิมนำมาใช้ในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* เนื่องจากคุณสมบัติของกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันดังกล่าวมาข้างต้น โดยมีรายงานในการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* เช่นในปี ค.ศ. 1973 โดย Beilby และคณะ ได้รายงานการเปลี่ยนโครงสร้างของสารตั้งต้น 6 ชนิด โดยผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 3 โดย 4 ชนิด (1-4) มีโครงสร้างหลักเป็น *ent-Kaurane* หนึ่งในจำนวนนั้นคือ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* และสารตั้งต้นอีก 2 ชนิด (5-6) ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น *ent-Beyerene* โดยอาศัยเชื้อรา คือ *Aspergillus ochraceous*, *Calonectria decora* และ *Rhizopus nigricans*

ในปี ค.ศ. 1977 โดย Ghisalberti และคณะ ได้ศึกษาการใช้กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid*, *ent-16-oxo-17-kauran-19-oic acid* และ *ent-19-hydroxy-16-oxo-17nor-kaurane* โดยเชื้อรา 3 ชนิดคือ *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus ochraceous* และ *Calonectria decora* ในส่วนของสารตั้งต้นคือ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* พบว่า *C. decora* สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ได้โดยให้ผลิตภัณฑ์ 3 ชนิด ชนิดแรกคือ 7,15-dihydroxylated acid ส่วนชนิดที่ 2 ชนิดและ 3 มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 α และ 15 α ตามลำดับ *R. nigricans* ให้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือชนิดแรกสามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 β อีกชนิดหนึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 16 และ 17 ส่วน *A. ochraceous* นั้นให้ผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียวคือมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 16 และ 17 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 5

ตารางที่ 3 ผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ *ent*-Kaurane และ *ent*-Beyerene โดย *Aspergillus ochraceus*, *Calonectria decora* และ *Rhizopus nigricans* (Beilby และคณะ, 1973)

สารตั้งต้น	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	<i>A. ochraceus</i>	<i>C. decora</i>	<i>R. nigricans</i>
 <p>1)</p>	<p>16α-OH (10)</p>	<p>1β-OH (10) 7β-OH (10)</p>	<p>1β-OH (20) 7β-OH (20)</p>
 <p>2)</p>	<p>13-OH (5) 13,16α-OH (5)</p>	<p>1β-OH (5) 7β-OH (15) 7α-OH (40)</p>	<p>1β-OH (30) 7β-OH (30) 7α-OH (5)</p>
 <p>3)</p>	<p>16β,17-OH (20)</p>	<p>15β-,7β-OH (30) 15β-OH (5) 7β-OH (5)</p>	<p>7α-OH (25)</p>
 <p>(4)</p>	<p>6α-OH (30) 7β-OH (25)</p>	<p>7β-OH (40)</p>	<p>1β-OH (25) 7β-OH (35)</p>

 <p>5) R=H ; 6) R=CH₃</p>	3 α -OH	6 α -OH (50)	--
---	----------------	---------------------	----



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid โดย *Aspergillus ochraceous*, *Calonectria decora* และ *Rhizopus nigricans* (Ghisalberti และคณะ,1977)

ในปี ค.ศ.1999 Silva และคณะได้ทำการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid โดยเชื้อราคือ *Rhizopus stolonifer* โดยเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วันได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิดคือ *ent*-7 α -hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid และ *ent*-12 β -hydroxy-kaur-9 (11), 16-dien-19-oic acid และเมื่อบ่มเป็นเวลา 15 วัน ได้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชนิดคือ *ent*-16 β , 17-dihydroxy-kaur-19-oic acid โดยผลการวิจัยแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นฉบับแรกที่รายงานเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid เป็น *ent*-12 β -hydroxy-kaur-9 (11), 16-dien-19-oic acid และ *ent*-16 β ,17-dihydroxy-kaur-19-oic acid โดยอาศัย *R.stolonifer* ได้ และจากผล

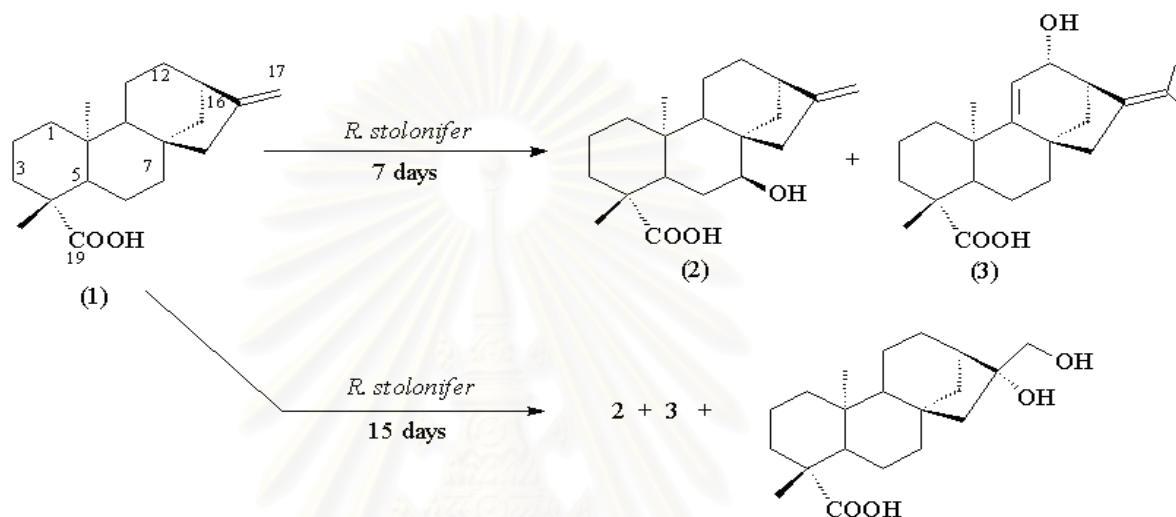
การทดลองเห็นได้ว่า *R. stolonifer* สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันในโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ในตำแหน่งของวง (Ring) B, C และ D ได้ นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนชัน (Dehydrogenation) ได้อีกด้วยโดยเห็นได้จากโครงสร้างของ *ent-12 β -hydroxy-kaur-9(11)dien-19-oic acid* ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 9 และ 11 นอกจากนี้พบว่า *ent-7 α -hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid* ที่ได้ นั้นเป็นสารที่มีโครงสร้างเหมือนกับสารตัวกลางในการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินและฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของพืช และ *ent-16 β , 17-dihydroxy-kaur-19-oic acid* ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างเช่นเดียวกับสารต้านเชื้อไวรัส HIV ที่รายงานโดย Kupchan และคณะ ในปี 1972 (Silva และคณะ, 1999)

เชื้อรา *Aspergillus niger*

Aspergillus niger เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota สามารถพบได้ทั่วไป ลักษณะทั่วไปของราชนิดนี้คือ เส้นใยมีสีขาว พู สายใยมีผนังกัน (Septate hypha) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) โดยการสร้างสปอร์ (Spore) ที่เรียกว่าโคนิเดีย (Conidia) โดยเกิดที่ปลายของเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ (Conidiophore) ซึ่งที่ปลายของเส้นใยจะมีเซลล์ที่เรียกว่าเพียลิด (Phialide) ทำหน้าที่สร้างโคนิเดีย เมื่อเส้นใยแก่จะสร้างสปอร์ที่มีสีดำ

A. niger เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งซึ่งพบว่ามีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถนำมาผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น Citric acid, Gluconic acid, Fumaric acid และ Oxalic acid เป็นต้น (Raper และ Fennell, 1977) นอกจากนี้ *A. niger* ยังเป็นแหล่งเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิดอีกด้วย ในกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชัน *A. niger* นับว่าเป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการเปลี่ยนโครงสร้างของสารชนิดต่างๆ โดยเฉพาะการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของสารเทอร์ปีนอยด์หลายชนิด ซึ่งมีรายงานการใช้เชื้อรานี้ในการเปลี่ยนโครงสร้างของ grindelic acid โดย Hoffmann และ Punnapayak ในปี ค.ศ. 1988 พบว่าพบที่สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของ grindelic acid ได้ โดยได้ผลิตภัณฑ์คือ 3 α -hydroxygrindelic acid นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ *A. niger* ในการเปลี่ยนโครงสร้างสารที่มีโครงสร้างแบบ kaurane diterpene บางชนิดด้วย เช่นใน ปี ค.ศ. 1974 โดย Anderson มีรายงานการใช้กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันในการเปลี่ยนโครงสร้างของสารตั้งต้น 3 ชนิดคือ 17-Norkauran-16-one, *ent*-17-Norkauran-16-one และ 17-Norphyllocladan-16-one โดยใช้ *A. niger* บ่มเป็นเวลา 5 วัน เมื่อใช้ 17-Norkauran-16-one เป็นสารตั้งต้นได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอน

ที่ 3β เมื่อใช้ *ent*-17-Norkauran-16-one เป็นสารตั้งต้นได้ผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3α และเมื่อใช้ 17-Norphyllocladan-16-one เป็นสารตั้งต้นได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด ชนิดแรกมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3β อีกชนิดหนึ่งมีการเติมหมู่คีโตนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 เช่นกัน โดยผลการทดลองแสดงในภาพที่ 7 ภาพที่ 8 และภาพที่ 9

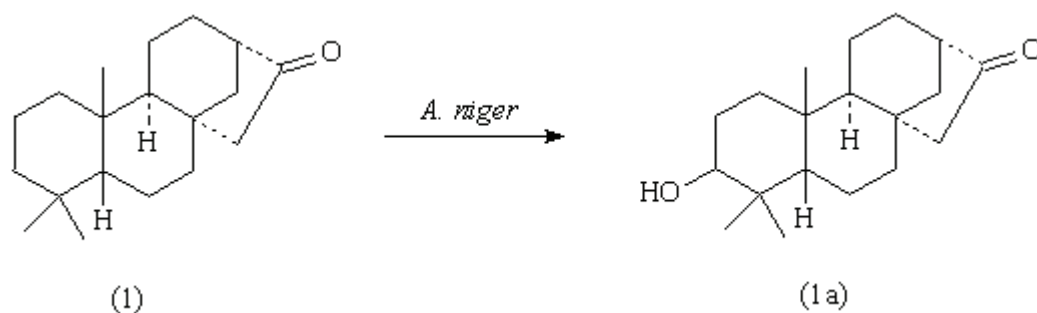


ภาพที่ 6 การเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (1) โดย *Rhizopus stolonifer* และผลิตภัณฑ์ที่ได้ *ent*-7 α -hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid (2), *ent*-12 β -hydroxy-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid (3) และ *ent*-16 β ,17-dihydroxy-kaur-19-oic acid (4) (Silva และคณะ, 1999)

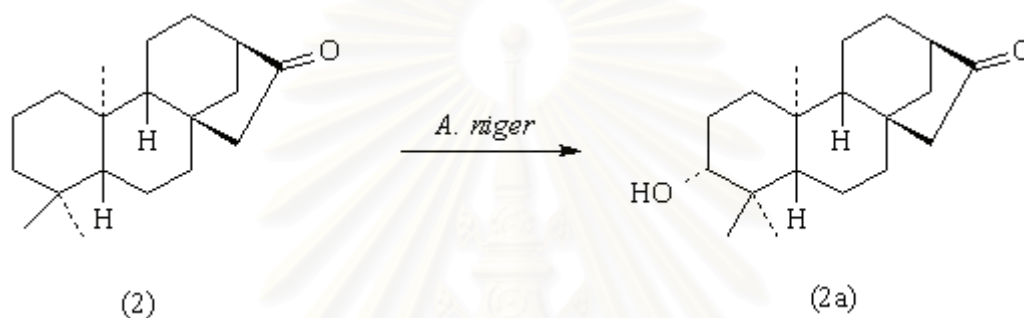
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปี ค.ศ. 1986 โดย Granadose และคณะได้ทำการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent*-18-acetoxykaur-16-en-3, 7-dione (1) โดย *A. niger* พบว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงให้ผลิตภัณฑ์ 1 ชนิดคือ เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งของ Acetoxy group (2) และเมื่อบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์ คือ *ent*-16 β ,18-trihydroxykauran-3,7-dione (3) , *ent*-17,18-trihydroxykauran-3,7-dione (4), *ent*-16 α ,17,18-trihydroxykauran-3,7-dione(5) และ *ent*-16 β ,17,18-trihydroxykauran-3,7-dione (6) ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 10

ในปี ค.ศ. 1999 มีรายงานการเปลี่ยนโครงสร้างของ isosteviol (*ent*-16-ketobeyeran-19-oic acid) ด้วย *Aspergillus niger* , *Penicillium chrysogenum* และ *Rhizopus arrhizus* โดย Oliveira และคณะ ซึ่งในส่วนของ *A. niger* พบว่าสามารถเปลี่ยนโครงสร้างของ isosteviol ได้ โดยเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบหาสารผลิตภัณฑ์เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ *ent*-7 α -hydroxy-16-ketobeyeran-19-oic acid และ *ent*-1 β ,7 α -dihydroxy-16-ketobeyeran-19-oic acid และเมื่อใช้เชื้อ *P. chrysogenum* พบว่าได้ผลิตภัณฑ์หนึ่งชนิดคือ *ent*-17-hydroxy-16-ketobeyeran-19-oic acid ส่วนเชื้อรา *R. arrhizus* สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของ isosteviol ได้ เป็น *ent*-7 α -hydroxy-16- ketobeyeran-19-oic acid ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 11, 12 และ 13 ตามลำดับ

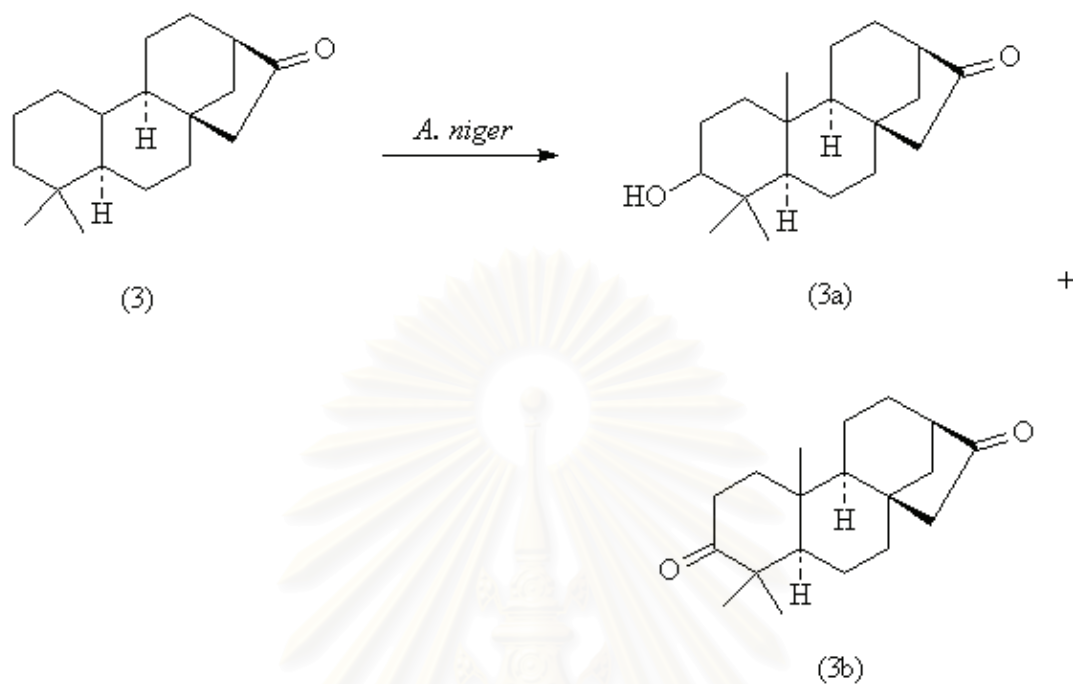


ภาพที่ 7 การเปลี่ยน 17-Norkauran-16-one (1) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3β (1a) โดย *A. niger* (Anderson และคณะ, 1974)



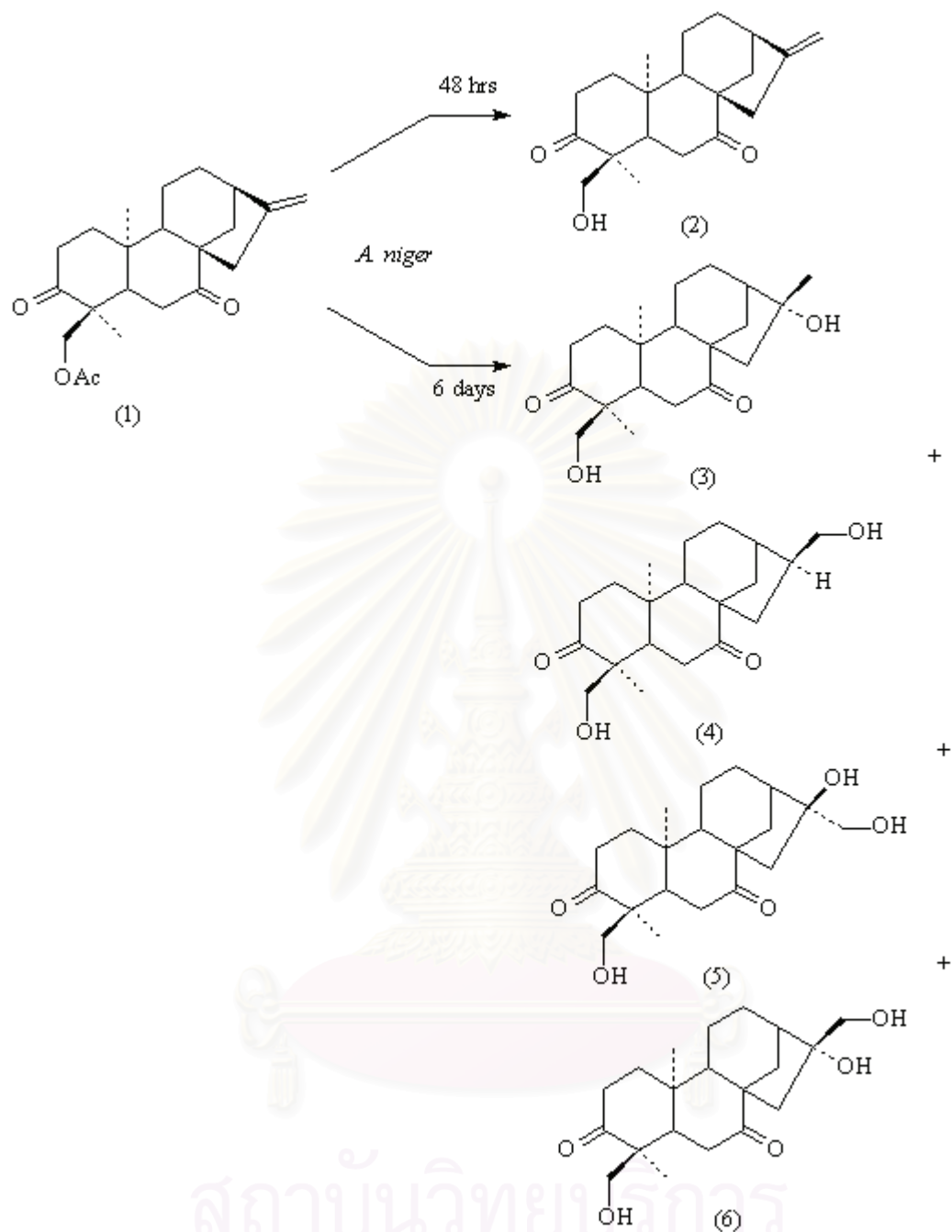
ภาพที่ 8 การเปลี่ยน *ent*-17-Norkauran-16-one (2) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3α (2a) โดย *A. niger* (Anderson และคณะ, 1974)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

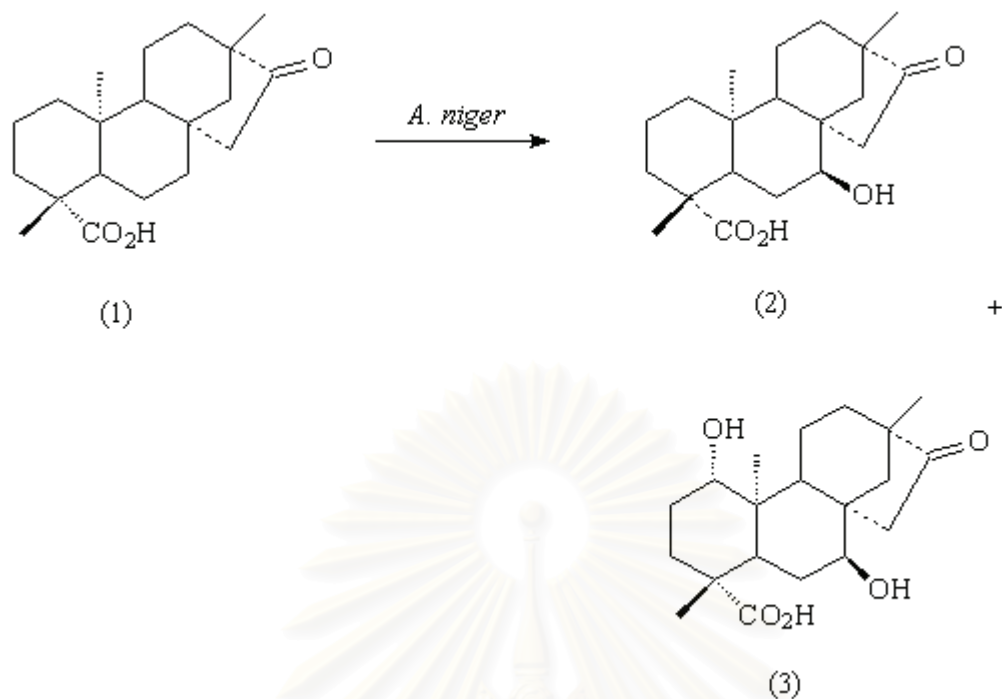


ภาพที่ 9 การเปลี่ยน 17-Norphyllocladan-16-one (3) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 β (3a) และหมู่คีโตนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 (3b) โดย *A. niger* (Anderson และคณะ, 1974)

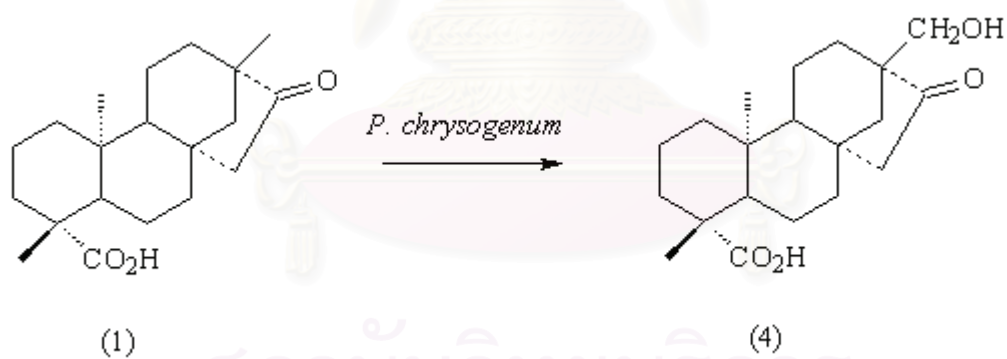
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



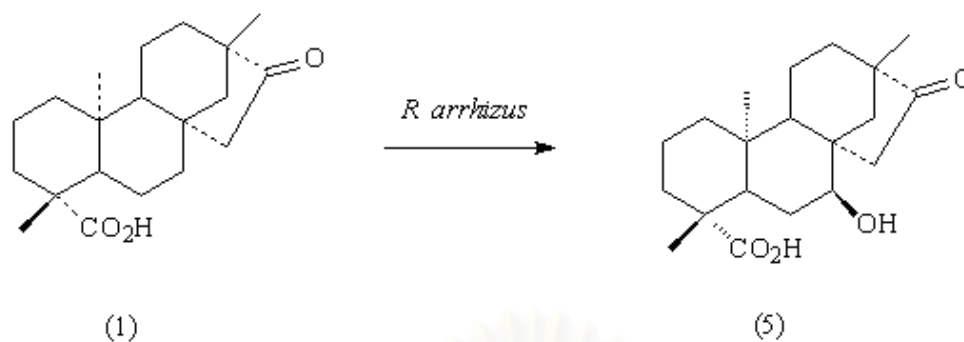
ภาพที่ 10 การเปลี่ยน *ent*-18-acetoxykaur-16-en-3,7-dion (1) เป็นผลิตภัณฑ์ 5 ชนิด โดย *A. niger* (Granados และคณะ, 1986)



ภาพที่ 11 การเปลี่ยน isosteviol (1) เป็น *ent*-7 α -hydroxy-16-ketobeyeran-19-oic acid (2) และ *ent*- β , 7 α -dihydroxy-6-ketobeyeran-9-oic acid (3) โดย *A. niger* (Oliveira และคณะ, 1999)



ภาพที่ 12 การเปลี่ยน isosteviol (1) เป็น *ent*-17-hydroxy-16-ketobeyeran-19-oic acid (4) โดย *A. niger* (Oliveira และคณะ, 1999)



ภาพที่ 13 การเปลี่ยน isosteviol (1) เป็น *ent*-7 α -hydroxy-16- ketobeyeran-19-oic acid (5) โดย *R. arrhizus* (Oliveira และคณะ, 1999)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องเขย่า (Shaker)
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Stream Sterilizer/Autoclave) ของบริษัท Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiching, Taiwan
3. เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) รุ่น N-N series ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co.,LTD, Japan
4. แผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางเคลือบด้วยซิลิกาเจล silica gel 60 F₂₅₄ ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ion analyzer 255 ของบริษัท Corning,USA.
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น U4600P ของบริษัท Sartorius
7. เครื่องเอกซเรย์โครงสร้างผลึก (X-ray Diffractometer) SIEMEN SMART Diffractometer ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
8. เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น Trio 2000 ของบริษัท Micro mass

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-potassium hydrogen phosphate)	Carlo Erba Reagent
ซิลิกา เจล (Silica gel 60 Art. 1.07734.1000 (70-230 mesh ATMS))	Merck
โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium sulfate anhydrous)	Carlo Erba Reagent
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide)	Merck
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	Merck
ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)	Carlo Erba Reagent
ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract)	Difco
เอทิลอะซิเตต (Ethylacetate)	Carlo Erba Reagent
เมทานอล (Methanol)	BDH laboratory supplies
กรดแอสติก (Acetic acid)	Carlo Erba Reagent
เด็กโทรส (Dextrose)	Merck
ทวิน 80(tween 80)	Fluka
เฮกเซน (Hexanes)	J.T.Baker
ไอโอดีน (Iodine)	Fluka
วุ้นผง (Agar)	Difco

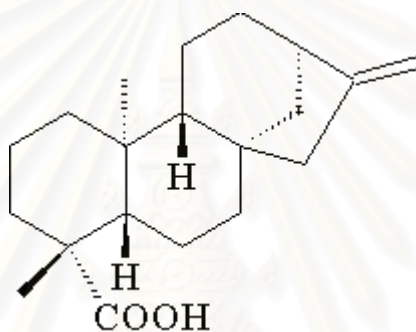
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อ *Aspergillus niger* จากห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์เชิงอุตสาหกรรม ภาควิชาพฤกษ-ศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 สารตั้งต้น (Substrate)

ent-kaur-16-en-19-oic-acid สกัดได้จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius* Roxb.) จากกยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดย สุภาพร ศิริมงคล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 302 สูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{30}O_2$ และโครงสร้างทางเคมีแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid*

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 วิธีการเก็บรักษาและเลี้ยงจุลินทรีย์

3.5.1.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อเชื้อราโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากบนอาหารแข็งเอียง (Slant agar) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ Potato Dextrose Agar (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (Room temperature) เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.1.2 การเตรียมสปอร์แขวนลอย (Spore suspension)

เตรียมสปอร์แขวนลอยใน 1% tween 80 ในน้ำกลั่น โดยเท 1% tween 80 ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเก็บเชื้อในข้อ 3.5.1.1 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยให้สปอร์ของรากระจายตัวใน 1% tween 80 จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นับสปอร์โดยใช้ Haemocytometer (ภาคผนวก จ) และปรับจำนวนให้มีความเข้มข้น 2.5×10^6 - 2.5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.5.1.3 การงอกเป็นสายใย

ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ในข้อ 3.5.1.2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สำหรับเตรียมหัวเชื้อคือ SMG medium (ภาคผนวก ก) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.5.2 การเปลี่ยนโครงสร้างโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพของ *ent-kaur-16-en-19-oic-acid*

นำหัวเชื้อจากข้อ 3.5.1.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวชนิดเดียวกับที่ใช้ในการงอกเป็นสายใย ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารตั้งต้นซึ่งละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ โดยให้แต่ละขวดมีปริมาณของสารตั้งต้นเท่ากับ 20 มิลลิกรัม นำไปเขย่าที่ภาวะเดิมเป็นเวลา 7 วัน

3.5.3 การสกัดแยกผลิตภัณฑ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อราพร้อมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 3.5.2 มาสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน โดยที่อัตราส่วนไดคลอโรมีเทนต่อน้ำเลี้ยงเชื้อเป็น 1:1 และทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นนำชั้นของไดคลอโรมีเทนมากำจัดน้ำออกด้วยการเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำไดคลอโรมีเทนที่กำจัดน้ำออกแล้วมาระเหยเอาไดคลอโรมีเทนออกจนแห้งโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน นำสารที่สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์โดยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography)

3.5.4 การวิเคราะห์สารที่สกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography)

หยดสารที่ได้จากการสกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.5.3 บนแผ่นอินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC aluminum sheet silica gel 60 F₂₅₄) รอให้สารที่หยดแห้ง จากนั้นนำไปวางในโถแก้วที่บรรจุด้วยตัวทำละลาย (ระบบตัวทำละลายที่ใช้แสดงในภาคผนวก ข) โดยให้ตำแหน่งเริ่มต้นที่หยดสารอยู่เหนือระดับของตัวทำละลาย ปิดฝาให้สนิท รอให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงแนวของตัวทำละลาย (Solvent front) จากนั้นนำแผ่นซิลิกาออกจากโถแก้ว ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยให้แผ่นซิลิกาสัมผัสกับไอระเหยของสารไอโอดีน ทำเครื่องหมายรอบตำแหน่งของสารที่ปรากฏ และวัดระยะทางในการเคลื่อนที่ของสาร พร้อมทั้งหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Ratio of front (R_f)) โดยวิธีในภาคผนวก ข

3.5.5 การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

3.5.5.1 วิธีการเตรียมคอลัมน์ของซิลิกา เจล

นำซิลิกาเจลงน้ำหนักประมาณ 20 เท่า ของน้ำหนักสารที่ต้องการแยกมาแช่ในตัวทำละลายที่เหมาะสมจนให้เข้ากัน ค่อยๆบรรจุซิลิกาเจลงลงในคอลัมน์แก้ว ขนาด 2 X 50 เซนติเมตร รอให้ซิลิกาเจลงเรียงตัวในคอลัมน์จนกระทั่งไม่มีการยุบตัวของผิวซิลิกาเจลง จากนั้นล้างคอลัมน์โดยการผ่านตัวทำละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ในการแช่ซิลิกาเจลง ปริมาตรอย่างน้อยหนึ่งเท่าของปริมาตรคอลัมน์

3.5.5.2 การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์

นำสารที่แยกได้ในข้อ 3.5.3 มาสกัดด้วยเฮกเซน นำส่วนของเฮกเซนออก นำส่วนที่ไม่ละลายในเฮกเซนมาบรรจุลงในคอลัมน์ที่เตรียมได้ในข้อ 3.5.5.1 แล้วชะด้วยระบบตัวทำละลายอย่างต่อเนื่อง โดยใช้ตัวระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน-เอธิลอะซิเตต และ เอธิลอะซิเตต-เมทานอล โดยปรับปริมาณตัวทำละลายแต่ละชนิดเพื่อเพิ่มสภาพขั้ว (Polarity) ของระบบตัวทำละลาย เก็บสารที่ผ่านจากคอลัมน์โดยใช้หลอดแก้ว นำสารที่เก็บได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟี จากนั้นรวมสารที่มีระยะเวลาการเคลื่อนที่ตรงกันเข้าไว้ด้วยกันแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน

3.5.6 การตกผลึก

3.5.6.1 นำสารที่แยกได้จากวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีมาตกผลึก โดยนำมาละลายในเอธิลอะซิเตตโดยให้สารละลายหมดในเอธิลอะซิเตตปริมาณน้อยที่สุดขณะร้อนจากนั้นเติมเฮกเซนทีละหยดจนสารละลายเริ่มขุ่นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก

3.5.6.2 ถ้าสารที่แยกได้จากวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีไม่ละลายในเอธิลอะซิเตตให้นำมาละลายในเมทานอลขณะร้อน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก

3.5.7 การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่องมือทางเคมี

3.5.7.1 ตรวจโครงสร้างของโมเลกุลด้วยเครื่องแมสเปกโตรมิเตอร์ (MS) โดยนำสารตัวอย่างมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง Mass spectrometer รุ่น Trio 2000 ของบริษัท Micro mass ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography โดยที่วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 0.1% Formic acid ใน 50:50 ของ Methanol: Water (อัตราไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร/นาที) เครื่อง Mass spectrometer ใช้ส่วนผลิตไอออนชนิด atmospheric pressure chemical ionization (APCI)

3.5.7.2 ตรวจโครงสร้างของโมเดล โดยการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโมเดลสามมิติโดยเครื่องเอกซเรย์โครงสร้างผลึกของบริษัท SIEMEN SMART ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



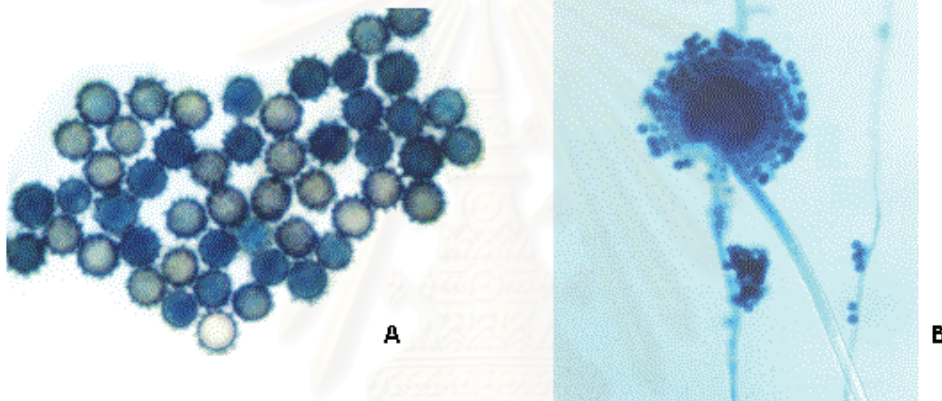
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

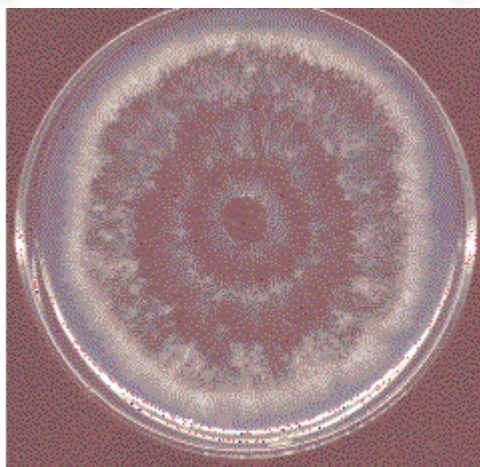
ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus niger*

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus niger* บนอาหาร Potato Dextrose Agar ลักษณะสปอร์ และส่วนสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ *A. niger* มีลักษณะแสดงในภาพที่ 15 และลักษณะโคโลนี เมื่อเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar เป็นเวลา 5 วันแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 15 ลักษณะของสปอร์ (A) และส่วนสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (B) ของ *A. niger* (กำลังขยาย 420 เท่า)



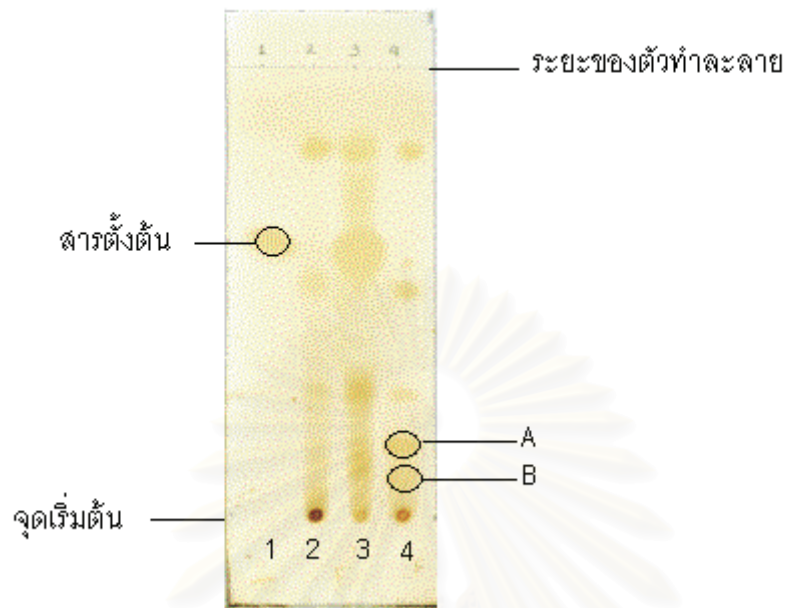
ภาพที่ 16 ลักษณะโคโลนีของ *A. niger* เมื่อเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar เป็นเวลา 5 วัน

4.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างผลิตภัณฑ์

หลังจากเติมสารตั้งต้นคือ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.5.2 แล้ว เก็บตัวอย่างมาทดสอบหาสารผลิตภัณฑ์ โดยทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 14 วัน โดยแบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนไดคลอโรมีเทนต่อสารตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 นำส่วนของไดคลอโรมีเทนมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอินฟราเรดโครมาโตกราฟีตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.5.4 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 2 ชุด คือ ชุดควบคุมที่ 1 คือเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ไม่ใส่สารตั้งต้น และชุดควบคุมที่ 2 ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและสารตั้งต้นโดยไม่ใส่เชื้อ พร้อมทั้งเทียบกับสารตั้งต้นมาตรฐานด้วย ทำการทดสอบโดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน: เอธิลอะซิเตต: กรดแอสติก ผลการทดลองพบว่า ในวันที่ 2 หลังจากใส่สารตั้งต้นเริ่มปรากฏตำแหน่งของสารเป็นจุดสีน้ำตาลเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคอินฟราเรดโครมาโตกราฟีซึ่งมีระยะเวลาการเคลื่อนที่ต่ำกว่าระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสารตั้งต้น และมีระยะเวลาการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด โดยจุดสีน้ำตาลที่คาดว่าจะจะเป็นผลิตภัณฑ์จะมีสีเข้มขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งมีสีเข้มที่สุดในวันที่ 7 หลังจากใส่สารตั้งต้น

4.3 การตรวจสอบหาสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดโครมาโตกราฟี

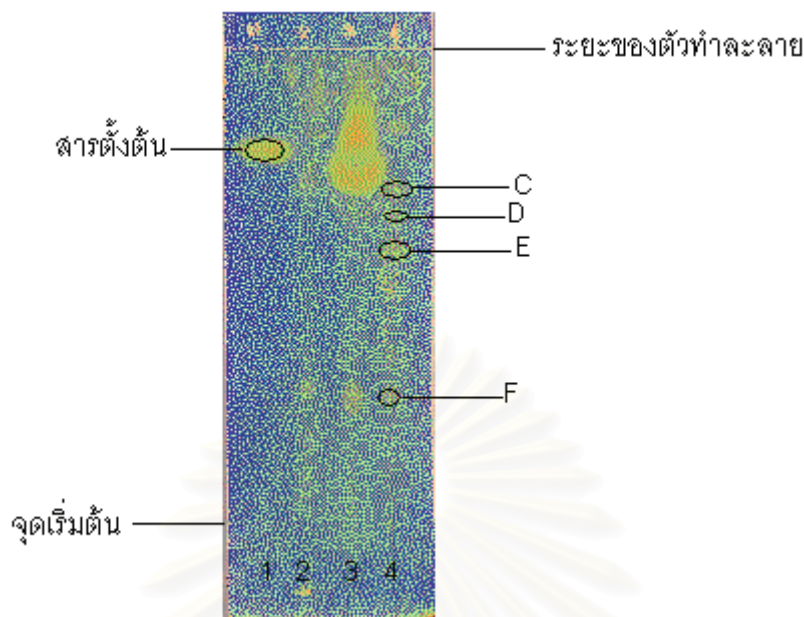
นำสารที่สกัดได้จากส่วนของไดคลอโรมีเทนมาทำการทดสอบด้วยเทคนิคอินฟราเรดโครมาโตกราฟีตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.5.4 โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน: เอธิลอะซิเตต : กรดแอสติก (70:30:2) ผลการทดลองพบว่าปรากฏตำแหน่งของสารที่คาดว่าน่าจะเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มชัน ซึ่งมีระยะเวลาการเคลื่อนที่ต่ำกว่าสารตั้งต้นสองจุดด้วยกัน โดยสารตั้งต้นมีค่า $R_f = 0.64$ สารที่คาดว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ตัวแรก (A) มีค่า $R_f = 0.16$ ตัวที่สอง (B) มีค่า $R_f = 0.1$ ตามลำดับ โดยผลการตรวจสอบแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดย *Aspergillus niger* เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน : เอธิลอะซิเตต : กรดแอสติก ในอัตราส่วน 70:30:2

- 1 คือ สารตั้งต้น (*ent-kaur-16-en-19-oic acid*)
- 2 คือ ส่วนของไดคลอโรมีเทนที่สกัดจากการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่สารตั้งต้น
- 3 คือ ส่วนของไดคลอโรมีเทนที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อและสารตั้งต้นที่ไม่มีเชื้อ
- 4 คือ ส่วนของไดคลอโรมีเทนที่สกัดจากชุดทดลอง

จากโครมาโตแกรมในภาพที่ 17 จะสังเกตเห็นว่าที่จุดเริ่มต้นยังมีจุดสีน้ำตาลปรากฏอยู่ ทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุมทั้งสองชุด ดังนั้นจึงคาดว่าน่าจะมีสารที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ดีในระบบตัวทำละลายระบบนี้ จึงทำการเปลี่ยนระบบตัวทำละลายใหม่เพื่อเพิ่มสภาพขั้วให้สารที่อยู่ในบริเวณจุดเริ่มต้นสามารถเคลื่อนที่ได้ดีขึ้นโดยใช้ระบบตัวทำละลายใหม่คือ เอธิลอะซิเตต:เมทานอล ในอัตราส่วน 85:15 โดยผลการทดลองแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดย *Aspergillus niger* เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกซะน : เมทานอล ในอัตราส่วน 85:15

- 1 คือ สารตั้งต้น (*ent-kaur-16-en-19-oic acid*)
- 2 คือ ส่วนของไดคลอโรโรมีเทนที่สกัดจากการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ใส่สารตั้งต้น
- 3 คือ ส่วนของไดคลอโรโรมีเทนที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อและสารตั้งต้นที่ไม่มีเชื้อ
- 4 คือ ส่วนของไดคลอโรโรมีเทนที่สกัดจากชุดทดลอง

จากโครมาโตแกรมในภาพที่ 18 จะเห็นได้ว่าในชุดทดลองปรากฏตำแหน่งของสารที่คาดว่าจะเป็ผลิตภัณฑ์ 3 จุด คือจุด C ($R_f = 0.68$) จุด D ($R_f = 0.61$) และจุด E ($R_f = 0.58$) ตามลำดับ ส่วนสารตั้งต้น (*ent-kaur-16-en-19-oic acid*) มีค่า $R_f = 0.70$ นอกจากนี้ยังปรากฏจุดของสารที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : เฮกซะน : เมทานอล ในอัตราส่วน 70 : 30 : 2 แต่สามารถเคลื่อนที่ได้ในระบบตัวทำละลาย เฮกซะน : เมทานอล ในอัตราส่วน 85 : 15 คือจุด F แต่เนื่องจากมีระยะเวลาการเคลื่อนที่ตรงกับจุดที่ปรากฏในชุดควบคุมที่ 1 และ 2 ดังนั้นจึงคาดว่าจุด F ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการนี้

จากผลการทดสอบด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟีเมื่อเปรียบเทียบระบบตัวทำละลายทั้งสองระบบพบว่าระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 85:15 สามารถแยกสารได้ดีกว่าระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : เอธิลอะซิเตต : กรดแอสซิติค ในอัตราส่วน 70:30:2 โดยระบบตัวทำละลาย เอธิลอะซิเตต : เมทานอล ให้โครมาโตแกรมซึ่งแยกสารออกได้เป็น 3 จุดด้วยกัน ส่วนระบบตัวทำละลายเฮกเซน : เอธิลอะซิเตต : กรดแอสซิติค นั้นให้โครมาโตแกรมซึ่งแยกสารออกได้เพียง 2 จุด ดังนั้นจึงเลือกระบบตัวทำละลาย เอธิลอะซิเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 85:15 เป็นระบบตัวทำละลายในการตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟีในงานวิจัยนี้

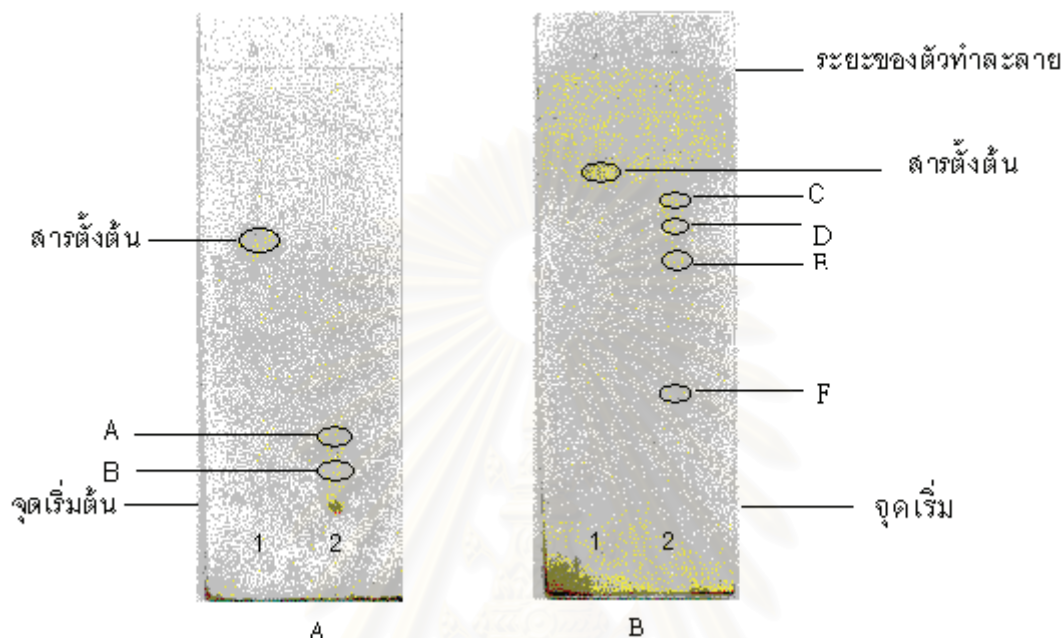
เมื่อได้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วทำการทดสอบระยะเวลาในการสร้างผลิตภัณฑ์อีกครั้งหนึ่งโดยใช้ตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 85 : 15 ผลการทดลองพบว่า ในวันที่ 2 หลังจากใส่สารตั้งต้นตรวจพบสารที่คาดว่าจะเป็ผลิตภัณฑ์ 3 จุดด้วยกัน โดยจุดที่มีค่า $R_f = 0.68$ จะมีสีเข้มที่สุดรองลงมาคือ จุดที่มีค่า $R_f = 0.61$ และ 0.58 ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 วันหลังจากเติมสารตั้งต้นพบว่าสีของจุดที่มีค่า $R_f = 0.68$ และ 0.61 จะจางลง ส่วนสีของจุดที่มีค่า $R_f = 0.58$ จะเข้มขึ้นและมีสีเข้มที่สุดในวันที่ 7 หลังจากใส่สารตั้งต้น จากนั้นสีของทั้ง 3 จุดจะค่อยๆ จางลงและจางที่สุดในวันที่ 14 หลังจากใส่สารตั้งต้น

4.4 การสกัดสารผลิตภัณฑ์

สกัดสารผลิตภัณฑ์ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.5.3 โดยใช้ไดคลอโรมีเทนต่อน้ำเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 1:1 จากน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2.5 ลิตร ปริมาณสารตั้งต้น 1.0 กรัม สารสกัดที่ได้จากการระเหยเอาไดคลอโรมีเทนออกมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลหนัก 3.28 กรัม

4.5 การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์

จากโครมาโตแกรมในภาพที่ 17 และ 18 พบว่านอกจากจุดของสารที่คาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว ยังจากภูต่าแหน่งสารอื่นๆที่มีระยะการเคลื่อนที่ตรงกับชุดทดลองทั้ง 2 ชุดด้วย จึงนำส่วนที่ได้จากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนที่ได้ในข้อ 4.4 มาสกัดด้วยเฮกเซนเพื่อเอาสารประกอบที่มีขั้วต่ำๆ ซึ่งมีระยะการเคลื่อนที่สูงกว่าสารที่คาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ออก เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนมาทดสอบด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟีอีกครั้ง โดยทดสอบกับตัวทำละลายทั้งสองระบบ ผลการทดสอบแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 19 โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดย *Aspergillus niger* เมื่อป่มเป็นเวลา 7 วัน หลังสกัดสารจากส่วนของไดคลอโรมีเทนด้วยเฮกเซน ทดสอบด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยภาพ 19A ใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกเซน : เอธิลอะซิเตต : กรดแอซิติค ในอัตราส่วน 70:30:2 และ ภาพ 19B ใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 85:15

1 คือ สารตั้งต้น (*ent-kaur-16-en-19-oic acid*)

2 คือ สารจากส่วนของไดคลอโรมีเทนหลังจากสกัดด้วยเฮกเซน

จากภาพที่ 19A และ 19B พบว่าไม่ปรากฏจุดของสารอื่นๆที่มีระยะการเคลื่อนที่สูงกว่าสารที่คาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ จากนั้นนำสารที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน - เอธิลอะซิเตต และ เอธิลอะซิเตต - เมทานอล โดยปรับปริมาณของตัวทำละลายแต่ละชนิดโดยให้สภาพขั้วเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทดสอบลำดับส่วนที่เก็บได้ด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลาย เอธิลอะซิเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 85:15 เก็บสารที่มีระยะการเคลื่อนที่ตรงกันเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟีเข้าไว้ด้วยกัน ทำการเก็บลำดับส่วนจนกระทั่งไม่มีจุดของสารปรากฏอีกเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมา-

โตกราฟี จากวิธีนี้ได้สารที่คาดว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์แยกอยู่ในลำดับส่วน 3 ส่วนด้วยกัน นำลำดับส่วนที่มีสารผลิตภัณฑ์ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน ซึ่งน้ำหนักลำดับส่วนที่ได้ โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4

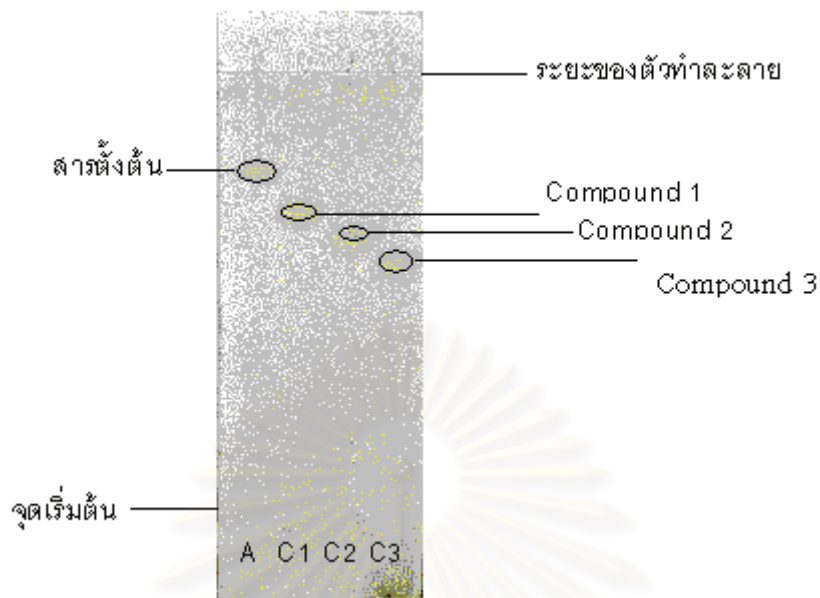
ตารางที่ 4 ผลการแยกสารจากส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ตัวชะ	สารที่แยกได้	น้ำหนักลำดับส่วน (มิลลิกรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์เทียบกับสารตั้งต้น	ลักษณะสาร
25 % เฮกเซนในเอธิลอะซิเตต	Compound 1	211	7.0	ของแข็งสีขาวขุ่น
100% เอธิลอะซิเตต	Compound 2	45	1.5	ของแข็งสีขาวขุ่น
5% เมธานอลในเอธิลอะซิเตต	Compound 3	538	17.9	ของแข็งสีขาวขุ่น

หมายเหตุ ผลการทดลองในตารางที่ 4 ได้จากการใช้ปริมาณสารตั้งต้นหนัก 3.0 กรัม

นำสารที่ได้ในแต่ละลำดับส่วนมาทดสอบด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต : เมธานอล ในอัตราส่วน 85 :15 ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 20

จากภาพที่ 20 พบว่าในแต่ละลำดับส่วนปรากฏจุดของสารเพียงจุดเดียว โดย Compound 1 มีระยะการเคลื่อนที่สูงที่สุด ($R_f = 0.68$) รองลงมาคือ Compound 2 ($R_f = 0.61$) และ Compound 3 ($R_f = 0.58$) ตามลำดับ เมื่อเทียบโครมาโตแกรมในภาพที่ 20 กับภาพที่ 18 ซึ่งเป็นส่วนสกัดก่อนผ่านคอลัมน์พบว่าตำแหน่งของสารที่คาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดสอดคล้องกัน



ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมของลำดับส่วนที่ได้จากการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ทดสอบด้วยเทคนิคอินเลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตต : เมทานอล ในอัตราส่วน 85 :15

A คือ สารตั้งต้น (*ent-kaur-16-en-19-oic acid*)

ลำดับส่วน Compound 1 (C1) มีค่า $R_f = 0.68$

ลำดับส่วน Compound 2 (C2) มีค่า $R_f = 0.61$

ลำดับส่วน Compound 3 (C3) มีค่า $R_f = 0.58$

4.6 การตกผลึก

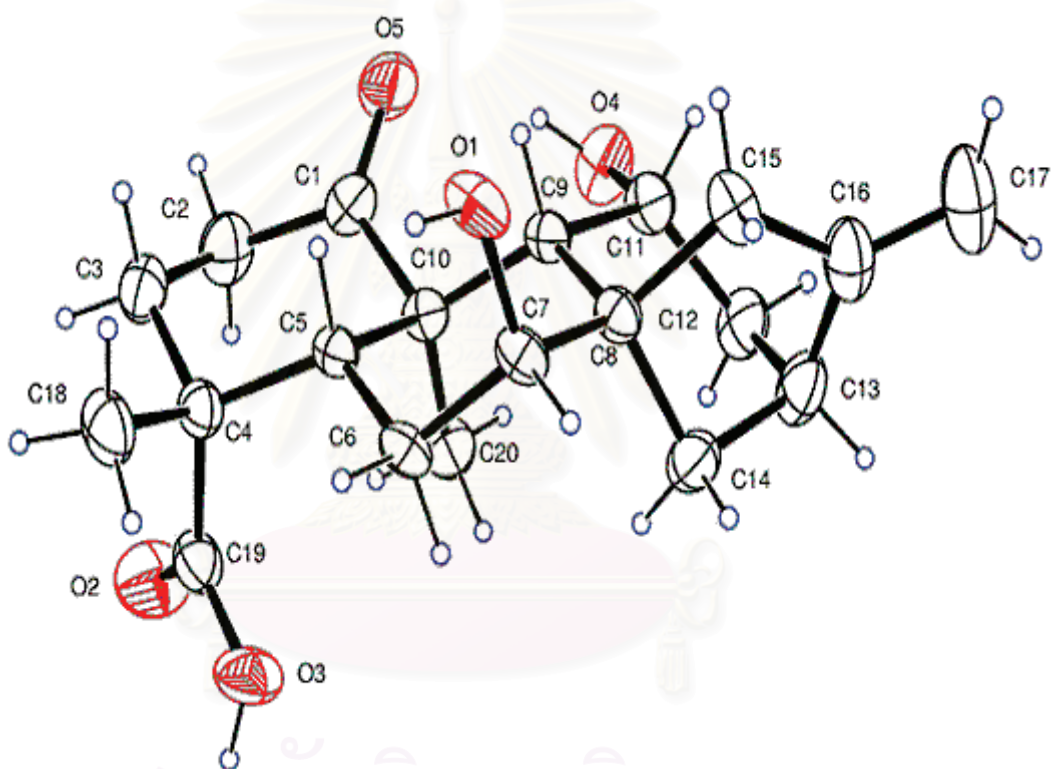
นำลำดับส่วนที่ได้ทั้งสามส่วนมาตกผลึก โดย Compound 1 และ Compound 2 ตกผลึกตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.5.6.1 พบว่า Compound 1 และ Compound 2 ไม่สามารถตกผลึกได้ ส่วน Compound 3 สามารถตกผลึกได้ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.5.6.2 โดยผลึกที่ได้เป็นผลึกใสรูปแท่ง มีจุดหลอมเหลว 247- 248 องศาเซลเซียส

4.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์โดยวิธีทางเคมี

4.7.1 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของ Compound 3

4.7.1.1 การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโมเลกุลสามมิติของ Compound 3

นำผลึกของ Compound 3 ที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโมเลกุลสามมิติโดยเทคนิค Single-Crystal X-ray Diffraction ผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกแสดงในภาคผนวก ค และ ภาพ ORTEP ซึ่งแสดงตำแหน่งของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ของ Compound 3 ในรูปแบบ 3 มิติ แสดงในภาพที่ 21

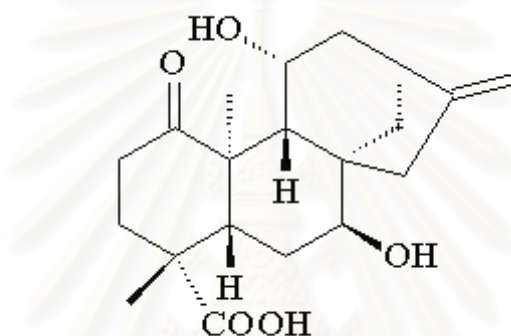


ภาพที่ 21 ภาพแสดงโครงสร้างแบบ ORTEP ของ Compound 3

4.7.1.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีได้ผลดังแสดงในภาคผนวก ง พบว่ามีค่ามวลต่อประจุสูงสุดที่ 349 จากเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีแสดงว่าสารดังกล่าวมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 348 โดยที่ค่ามวลต่อประจุ 349 ที่ปรากฏอยู่ในสเปกตรัมแสดงถึงภาวะของสารที่มีการรวมตัวกับโปรตอน 1 ตัว ($[M+H]^+$ โดยที่ M แทนมวลโมเลกุลของ Compound 3)

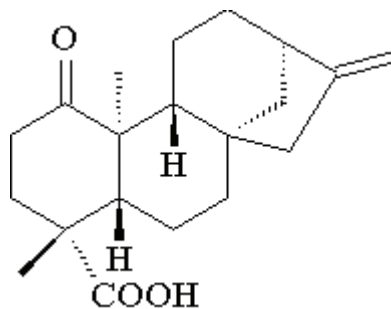
จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโมเลกุลสามมิติประกอบกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีของ Compound 3 สอดคล้องกับสารที่มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_5$ โครงสร้างทางเคมี แสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 22 โครงสร้างทางเคมีของ Compound 3

4.7.2 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของ Compound 1

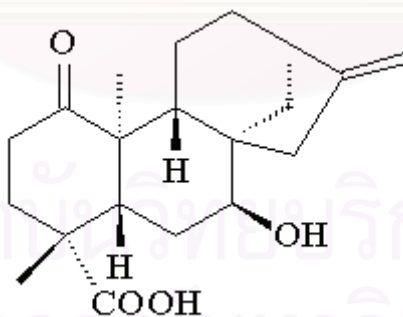
นำ Compound 1 ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี ผลการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ง จากแมสสเปกตรัมที่ได้พบว่า Compound 1 มีค่ามวลต่อประจุสูงสุดเท่ากับ 317 จากเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีแสดงว่าสารดังกล่าวมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 316 โดยที่ค่ามวลต่อประจุ 317 ที่ปรากฏอยู่ในสเปกตรัมแสดงถึงภาวะของสารที่มีการรวมตัวกับโปรตอน 1 ตัว ($[M+H]^+$ โดยที่ M แทนมวลโมเลกุลของ Compound 1) ซึ่งเมื่อเทียบผลการทดลองกับสารตั้งต้นและผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก Compound 3 คาดว่า Compound 1 ควรจะมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_3$ โดยน่าจะมีสูตรโครงสร้างดังในภาพที่ 23 นอกจากนี้ยังปรากฏค่ามวลต่อประจุที่ 299, 349 และ 381 อันแสดงถึง $[M-H_2O+H]^+$, $[M+MeOH+H]^+$, $[M+2MeOH+H]^+$ ตามลำดับ (โดย M แทนมวลโมเลกุลของ Compound 1)



ภาพที่ 23 โครงสร้างที่คาดว่าจะจะเป็นของ Compound 1

4.7.3 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของ Compound 2

นำ Compound 2 ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี ผลการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ง จากแมสสเปกตรัมที่ได้พบว่า Compound 2 มีค่ามวลต่อประจุสูงสุดเท่ากับ 333 จากเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีแสดงว่าสารดังกล่าวมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 332 โดยที่ค่ามวลต่อประจุ 333 ที่ปรากฏอยู่ในสเปกตรัมแสดงถึงภาวะของสารที่มีการรวมตัวกับโปรตอน 1 ตัว ($[M+H]^+$ โดยที่ M แทนมวลโมเลกุลของ Compound 2) ซึ่งเมื่อเทียบผลการทดลองกับสารตั้งต้นและผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก Compound 3 คาดว่า Compound 1 ควรจะมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_4$ โดยน่าจะมีสูตรโครงสร้างดังในภาพที่ 24 นอกจากนี้ยังปรากฏค่ามวลต่อประจุที่ 315, 365 และ 397 อันแสดงถึง $[M-H_2O+H]^+$, $[M+MeOH+H]^+$, $[M+2MeOH+H]^+$ ตามลำดับ (โดย M แทนมวลโมเลกุลของ Compound 2)



ภาพที่ 24 โครงสร้างที่คาดว่าจะจะเป็นของ Compound 2

เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมของ Compound 1 และ Compound 2 พบว่าแมสสเปกตรัมของ Compound 1 มีค่ามวลต่อประจุที่ 333 ปรากฏอยู่ด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของ Compound 2 ซึ่งมีค่ามวลต่อประจุ 333 คาดว่าสารที่มีค่ามวลต่อประจุ 333 ที่ปรากฏในแมสสเปกตรัมของ Compound 1 น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกันกับ Compound 2 ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในส่วนของ Compound 1 มี Compound 2 ปนอยู่ด้วยเล็กน้อย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างผลิตภัณฑ์

จากการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างผลิตภัณฑ์พบว่าสามารถพบผลิตภัณฑ์ได้ในวันที่ 2 หลังจากใส่สารตั้งต้นคือ *ent*-kaur-16-en-19 oic acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีการทดลองในบทที่ 3 ข้อ 3.5.2 โดยในวันที่ 2 หลังจากเติมสารตั้งต้น เมื่อทดสอบตัวอย่างด้วยเทคนิคอินไลน์เออร์โคมาโตกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต : เมทานอล อัตราส่วน 85 : 15 พบว่าปรากฏจุดของสารในโครมาโตแกรมบนแผ่นอินไลน์เออร์โคมาโตกราฟี 3 จุดด้วยกันคือ จุดที่มีค่า $R_f = 0.68$, 0.61 และ $R_f = 0.58$ โดยจุดที่มีค่า $R_f = 0.68$ และ 0.61 จะมีสีเข้มกว่าจุดที่มีค่า $R_f = 0.58$ และเมื่อวันที่ 4 หลังจากเติมสารตั้งต้นพบว่าจุดที่มีค่า $R_f = 0.59$ จะเริ่มมีสีเข้มขึ้นเรื่อยๆ และเข้มกว่าจุดที่มีค่า $R_f = 0.68$ และ 0.61 และเข้มที่สุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสีจะค่อยๆจางลง ส่วนสารที่มีค่า $R_f = 0.68$ และ 0.61 นั้นสีจะจางลงหลังจากวันที่ 4 โดยสารที่คาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์หลักน่าจะเป็นสารที่มีค่า $R_f = 0.58$ และเป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดเนื่องจากจุดที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโตแกรมมีสีเข้มกว่าจุดอื่นๆ ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างผลิตภัณฑ์คือการบ่มเป็นเวลา 7 วันหลังจากเติมสารตั้งต้น

การตรวจหาผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคอินไลน์เออร์โคมาโตกราฟี

เมื่อนำสารสกัดในส่วนของไดคลอโรมีเทนมาทดสอบด้วยเทคนิคอินไลน์เออร์โคมาโตกราฟีโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ระบบ คือ เฮกเซน : เอธิลอะซิเตต : กรดแอสติก อัตราส่วน 70 : 30 : 2 และ เอธิลอะซิเตต : เมทานอล อัตราส่วน 85 : 15 พบว่าในระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต : เมทานอล อัตราส่วน 85 : 15 สามารถแยกสารได้ดีกว่าระบบตัวทำละลายแบบแรก เห็นได้จากโครมาโตแกรมที่ปรากฏจุดของสารผลิตภัณฑ์ 3 จุด ในขณะที่ระบบตัวทำละลายระบบแรกสามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ได้เพียง 2 จุด ดังนั้นระบบตัวทำละลายที่ควรใช้ในการตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์คือ เอธิลอะซิเตต : เมทานอล อัตราส่วน 85 : 15

การทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ในการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารผลิตภัณฑ์แยกอยู่ในลำดับส่วน 3 ส่วนด้วยกันคือ Compound 1, Compound 2 และ Compound 3 เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออก พบว่าทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ซึ่งเมื่อทดสอบโดยเทคนิคอินฟราเรดโครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวทำละลายคือ เฮกซิลอะซิเตต : เมทานอล อัตราส่วน 85 : 15 พบว่า Compound 1 มีค่า $R_f = 0.68$, Compound 2 มีค่า $R_f = 0.61$ และ Compound 3 มีค่า $R_f = 0.58$ ตามลำดับ จากค่า R_f สามารถเรียงลำดับสภาพขั้วของสารทั้ง 3 ชนิดได้โดย Compound 3 มีสภาพขั้วสูงที่สุด รองลงมาคือ Compound 2 และ Compound 1 ตามลำดับ และจากปริมาณของสารที่ได้ทั้ง 3 ชนิดคิดเป็นร้อยละของผลิตภัณฑ์ต่อปริมาณสารตั้งต้นได้ โดย Compound 3 คิดเป็นร้อยละของผลิตภัณฑ์ต่อปริมาณสารตั้งต้นเท่ากับ 17.9 ซึ่งเป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ Compound 1 คิดเป็นร้อยละ 7.0 และ Compound 2 คิดเป็นร้อยละ 1.5 ของปริมาณสารตั้งต้นตามลำดับ

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดโดยเทคนิคทางเคมี

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Compound 3 โดยการวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโมเลกุลสามมิติโดยเทคนิค Single-Crystal X-ray Diffraction และเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าสอดคล้องกับสารที่มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_5$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 348 และมีโครงสร้างทางเคมีดังในภาพที่ 22 จากโครงสร้างทางเคมีของ Compound 3 ที่วิเคราะห์ได้เทียบกับโครงสร้างทางเคมีของสารตั้งต้น พบว่ามีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของสารตั้งต้น 2 หมู่ด้วยกันคือที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 และ 11 และมีออกซิเจนเพิ่มขึ้น 1 โมเลกุลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 จากภาพ ORTEP ซึ่งแสดงโครงสร้างของ Compound 3 พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งของคาร์บอนอะตอม ไฮโดรเจนอะตอม ออกซิเจนอะตอม และระนาบของโครงสร้างทางเคมีของ Compound 3 จะเห็นได้ว่าในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมที่ 7 นั้นเป็นตำแหน่งที่ตรงกันข้ามกับตำแหน่งคาร์บอนที่ 20 ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งนี้เนื่องมาจากเป็นตำแหน่งที่ไม่มีหมู่ฟังก์ชันนัล (functional group) อื่นๆ มากีดขวางทำให้ง่ายต่อการเข้าทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกันกับการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งของคาร์บอนที่ 11 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ตรงกันข้ามกับตำแหน่งของคาร์บอนที่ 15

ในการที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 11 ในโครงสร้างของ Compound 3 นั้น น่าจะเกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 11 ในโครงสร้างของ Compound 2 โดยมีรายงานการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 11 ในโครงสร้างของ kaurane diterpenoid

บางชนิด โดยในปี ค.ศ. 1994 Fraga และคณะ ได้ดัดแปลงโครงสร้างของ *ent-16 β ,17-epoxy-7 α -hydroxykaurane* โดยเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 11 คือ *ent-7 α ,11 α ,17-tetrahydroxykaurane* และในปี ค.ศ. 1996 Fraga และคณะได้รายงานการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 และ 11 ในโครงสร้างของ *3 α -hydroxy-15-oxo-ent-(16S)-kaurane* โดย *Gibberella fujikuroi* ได้ผลิตภัณฑ์หลักคือ *3 α ,7 α ,11 β -trihydroxy-15-oxo-ent-(16S)-kaurane* ซึ่งมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 และ 11 อีกทั้งยังมีผลิตภัณฑ์ตัวอื่น ๆ ที่ได้จากกระบวนการเดียวกันอีก 5 ชนิด ซึ่งหนึ่งในจำนวนนั้นคือ *3 α ,7 α -dihydroxy-15-oxo-ent-(16S)-kaurane* ซึ่งเป็นการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 ในโครงสร้างของสารตั้งต้นรวมอยู่ด้วย

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Compound 1 เนื่องจากไม่สามารถตกผลึกได้จึงไม่สามารถใช้การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกโมเลกุลสามมิติในการวิเคราะห์โครงสร้างของ Compound 1 ได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีในการทำนายโครงสร้างของ Compound 1 ซึ่งผลจากแมสสเปกตรัมและข้อมูลเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นและผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก Compound 3 คาดว่า Compound 1 ควรจะมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_3$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 316 และน่าจะมีโครงสร้างดังในภาพที่ 23 จากโครงสร้างทางเคมีที่คาดว่าจะ เป็นของ Compound 1 เทียบกับสารตั้งต้นพบว่า มีโครงสร้างที่ต่างจากสารตั้งต้นคือมีออกซิเจนเพิ่มขึ้นอีก 1 โมเลกุลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 ซึ่งในการเติมออกซิเจนที่ตำแหน่งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลแล้วจึงเปลี่ยนเป็นออกซิเจน แต่จากผลที่ปรากฏในโครมาโตแกรมเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคอินเลย์อร์โครมาโตกราฟีพบว่า Compound 1 เป็นจุดที่มีสีเข้มกว่า Compound 2 และ Compound 3 ในช่วงแรกของการบ่ม ซึ่งคาดว่า Compound 1 น่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ตัวแรกในกระบวนการนี้ เมื่อวิเคราะห์ Compound 1 ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี พบว่ามีการเติมหมู่คีโตนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 แทนที่จะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล จากงานวิจัยของ Oliveira และคณะ ในปี ค.ศ. 1999 ในการเปลี่ยนโครงสร้างของ *isosteviol* ซึ่งเป็นไดเทอร์พีนอยด์ที่มีโครงสร้างแบบ *kaurene diterpene* ชนิดหนึ่ง โดย *A. niger* พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 1 ซึ่งสามารถตรวจพบได้เมื่อบ่มเป็นเวลานานกว่า 7 วัน นั้นแสดงว่าผลิตภัณฑ์ซึ่งมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 1 นี้ค่อนข้างจะคงตัว ซึ่งถ้ามีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งนี้ของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ก็น่าจะสามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ได้ แต่ในการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดย *A. niger* ในงานวิจัยนี้ไม่พบ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า *A. niger* สายพันธุ์นี้สามารถเติมออกซิเจนที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 1 ของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid*

ได้โดยตรง หรือถ้ามีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของสารตั้งต้นที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 1 ก่อนการเปลี่ยนเป็นหมู่คีโตนจริง การที่ตรวจไม่พบสารชนิดนี้อาจเกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลแล้วจึงเปลี่ยนไปเป็นหมู่คีโตนภายในเวลาอันรวดเร็วจนทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อทำการตรวจสอบสารผลิตภัณฑ์ตามเวลาในการทดลอง

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Compound 2 พบว่า เนื่องจากไม่สามารถตกผลึกได้ เช่นเดียวกับ Compound 1 ดังนั้นจึงใช้เทคนิคในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ Compound 1 ในการทำนายโครงสร้างของ Compound 2 ซึ่งผลจากแมสสเปกตรัมและข้อมูลเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น และผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก Compound 3 คาดว่า Compound 2 ควรจะมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{28}O_4$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 332 และน่าจะมีสูตรโครงสร้างดังในภาพที่ 24 จากโครงสร้างทางเคมีที่คาดว่าจะเป็นอย่างของ Compound 2 เทียบกับสารตั้งต้น พบว่ามีโครงสร้างที่ต่างจากสารตั้งต้น คือมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 และมีหมู่คีโตนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 ซึ่งในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 7 นั้นพบว่าเป็นตำแหน่งที่พบได้บ่อยในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของสารที่มีโครงสร้างแบบ kaurane diterpenoid โดยอาศัยจุลินทรีย์ เช่น จากรายงานของ Beilby และคณะ ในปี ค.ศ. 1973 Ghisalberti และคณะ ปี ค.ศ. 1977 และ ในงานวิจัยของ Silva และ คณะ ในปี ค.ศ. 1999 ได้ทำการเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดยอาศัยเชื้อราพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 ในโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* รวมอยู่ด้วยแต่ไม่พบการเติมออกซิเจนที่ตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 นอกจาก *ent-kaur-16-en-19-oic acid* แล้วยังมีรายงานการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 โดยใช้สาร kaurane diterpenoid อื่นๆเป็นสารตั้งต้นอีกด้วย (Boaventura และคณะ, 1995 ; Oliveira และคณะ, 1999 ; Vieira และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เชื้อรา *A. niger* ในการเปลี่ยนโครงสร้างของ isosteviol ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งคาร์บอนที่ 7 เช่นกัน ซึ่งในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของ kaurane diterpenoid บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 นั้นอาจเป็นตำแหน่งที่ง่ายต่อการทำปฏิกิริยาทั้งนี้ขึ้นกับความจำเพาะของเอนไซม์ด้วย

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของ Compound 1, Compound 2 และ Compound 3 ทั้ง 3 ชนิดพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งคาร์บอนที่ 16 และ 17 โดยในงานวิจัยอื่นที่มีผู้รายงานไว้แล้วพบว่าเมื่อใช้ kaurane diterpenoid บางชนิดเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนโครงสร้างโดยอาศัยจุลินทรีย์ นอกจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลหรือออกซิเจนในวง A B และ C แล้ว ยังมีการทำปฏิกิริยาในส่วนของคาร์บอนอะตอมที่ 16 และ 17 ด้วย (Ghisalberti และคณะ, 1977; Granados และคณะ, 1986; Boaventura และคณะ, 1995 และ Takahashi และคณะ, 1999) แต่

ในงานวิจัยนี้พบว่า *A. niger* จะไม่เข้าทำปฏิกิริยาในตำแหน่งคาร์บอนที่ 16 และ 17 ของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความจำเพาะของเอนไซม์

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งสามชนิดสามารถสรุปได้ว่า *Aspergillus niger* สามารถเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ได้สารผลิตภัณฑ์ 3 ชนิดด้วยกัน คือ Compound 1, Compound 2 และ Compound 3 โดยแสดงในภาพที่ 25 จากภาพที่ 25 เมื่อพิจารณาโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ทั้งสามชนิดที่ได้จากผลการวิเคราะห์ทางเคมี และผลจากการทดสอบด้วยเทคนิคอินฟราเรดโครมาโตกราฟี อาจคาดได้ว่าผลิตภัณฑ์ชนิดแรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันในงานวิจัยนี้น่าจะเริ่มจากเชื้อ *A. niger* เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเติมหมู่คีโตนที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 1 ในโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ได้ผลิตภัณฑ์ชนิดแรกคือ Compound 1 จากนั้นจะเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 7 ในโครงสร้างของ Compound 1 ได้เป็น Compound 2 และสุดท้ายคือการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 11 ในโครงสร้างของ Compound 2 ได้ผลิตภัณฑ์คือ Compound 3 ซึ่ง Compound 3 น่าจะเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการนี้ เนื่องจากเป็นสารที่มีปริมาณมากและมีความคงตัวกว่าผลิตภัณฑ์ตัวอื่น

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

1. จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่ายังไม่สามารถแยกผลิตภัณฑ์บางตัวให้บริสุทธิ์ได้คือในส่วนของ Compound 1 ซึ่งมี Compound 2 ปนอยู่เล็กน้อย ดังนั้นในงานขั้นต่อไปจึงควรทำการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ควรมีการวิเคราะห์เพื่อเก็บข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มเติม เช่น ข้อมูลในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR และ IR เป็นต้น เพื่อความสมบูรณ์ในการวิเคราะห์โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ต่อไป

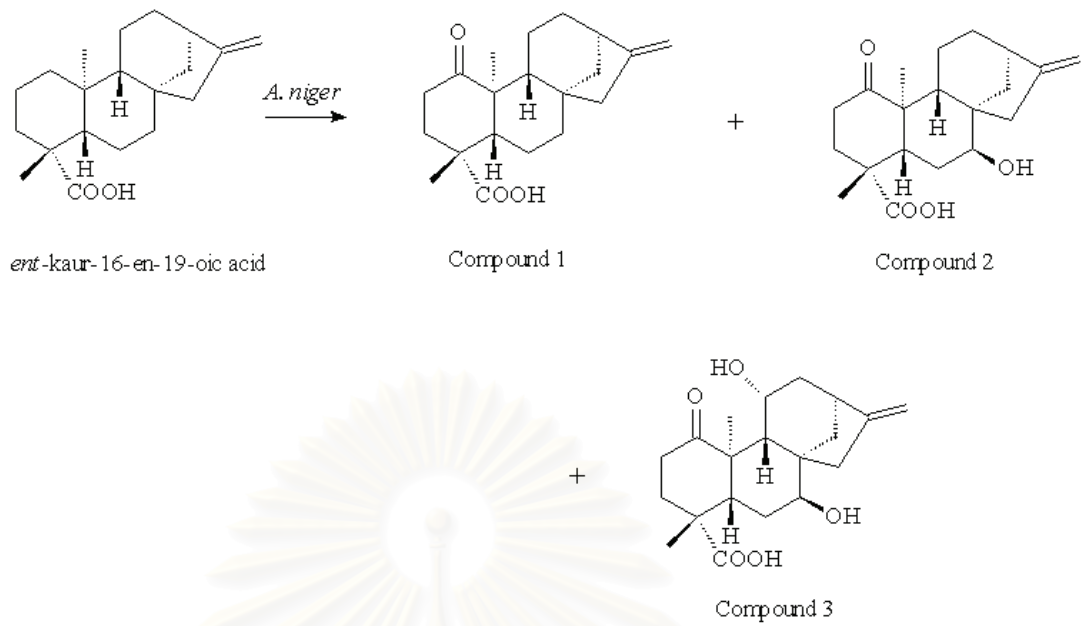
2. จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดพบว่า *A. niger* สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและไฮดรอกซิเลชัน ในตำแหน่งของวง A และ B ในโครงสร้างของ *ent-kaur-16-en-19-oic acid* โดยเติมหมู่คีโตนที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 และเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 และ 11 ซึ่งควรมีการศึกษาถึงความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยาของเชื้อราชนิดนี้โดยทดลองเปลี่ยนสารตั้งต้นที่ใช้เป็นสารซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ kauranoic acid ที่มีหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ เช่น kaurane diterpenoid ที่มีหมู่ methyl ester, alcohol หรือ epoxide

ในโครงสร้างหรือเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสารไดเทอร์พีนอยด์ชนิดอื่น เช่น labdane diterpenoid, clerodane diterpenoid หรือ hardwickiic acid เป็นต้น เพื่อศึกษาว่าเมื่อทำการเปลี่ยนสารตั้งต้น จะสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ในตำแหน่งเดิมหรือไม่ ซึ่งในกรณีที่พบว่า *A. niger* สายพันธุ์นี้มีความจำเพาะต่อตำแหน่งในการทำปฏิกิริยาในการเติมออกซิเจนที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 1 และหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 7 และ 11 ก็จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของ kaurane diterpenoid หรือ diterpenoid ชนิดอื่นๆ ที่ต้องการเติมหมู่ไฮดรอกซิลและออกซิเจนอย่างจำเพาะได้

3. ทำการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เนื่องจากมีรายงานว่า *ent-kaur-16-en-19-oic acid* ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นนั้นเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างหนึ่ง ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ว่ามีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือไม่ เช่น ทดสอบผลทาง cytotoxic activity เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยี-ชีวภาพต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนโครงสร้างของ *ent*-kaur-16-en-19-oic acid โดย *Aspergillus niger* เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- วีณา วิรัชฉริยากุล. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2538. สรรพวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุภาพร ศิริมงคล. 2543. คอเรนโดเทอร์พีนจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* Roxb. จากกัญบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2502. ไม้เทศเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. เขษมบรรณกิจ.

ภาษาอังกฤษ

- Aiyar, V.N. and Seshadri, T.R. 1970. Components of *Croton oblongifolius*. Tetrahedron, 26: 5275 - 5279.
- Aiyar, V.N. and Seshadri, T.R. 1971. Components of *Croton oblongifolius* Roxb. Indian J.Chem. 9: 613 - 614.
- Aiyar, V.N. and Seshadri, T.R.1972. 11-dehydro-hardwickiic acid from *Croton oblongifolius*. Phytochemistry, 11:1473 - 1476.
- Alves, T. M. A., Chaves, P. P. G., Santos L.M.S.T., Nagem, T.J., Murta, A.M.F., Deravolo, I.P., Romanha, A.J. and Zani, C. 1995. A Diterpene from *Mikania obtusata* Active on *Trypanosoma cruzi*. Planta. Med. 61: 85 - 87.
- Anderson, A.B., Maccrindle, R. and Turnbull, J.K. 1974. Microbiological Transformation of 17-Norkauran-16-one, *ent*-17-Norkauren-16-one, and 17-Norphyllocladan-16-one by *Aspergillus niger*. Can. J. Chem. 53: 1181 - 1188.
- Asakawa, Y., Takahashi, H., Toyota, M. and Noma, Y. 1991. Biotransformation of

- monoterpenoids, (-)- and (+)- Menthol, Terpenolene and Carvotanacetone by *Aspergillus* species. Phytochemistry 30 (12): 3981 - 3987.
- Beilby, J.P., Ghisalberti, E.L., Jefferies, P.R., Sefton, M.A. and Sheppard, P.N. 1973. Microbiological Transformation of Tetracyclic Triterpenes. Tetrahedral Lett. 28: 2589 - 2592.
- Blanch, H.W., Drew, S. and Wang, I.C.1985. Comprehensive Biotechnology. Pergamon press.
- Boaventura, M.A.D., Oliveira, A.B., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B. and Takahashi, J.A. 1995. The biotransformation of methyl *ent*-15-oxokaur-16-en-19-oate by *Rhizopus stolonifer* and *Mucor plumbeus*. Phytochemistry. 40: 1667-1669.
- Chang, F.R., Yang, P.Y., Lin, J.Y., Lee, K.H. and Wu, Y.C. 1998. Bioactive Kaurane Diterpenoids from *Annona glabra*. J. Nat. Prod. 61: 437- 439.
- Costa, F.B., Albuquerque, S. and Vidhnewski, W. 1966. Diterpenoid and Synthesis Derivative from *Viguiera aspilioides* with Trypanocidal activity. Planta. Med. 62: 557- 559.
- Cowan, M.M.1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Micro. Rew. 12: 564-582.
- Fogarty, W.M. and Kelly, C.T.1990. Transformation of Antibiotic and Steroids. Microbial Enzyme and Biotechnology. Elsevier Science Publishing CO.INC.
- Fraga, B.M., Gonzalez, P., Guillermo, R., Hanson, J.R., Hernandez, H.G. and Takahashi, J.A. 1994. The microbiological transformation of two *ent* -16 β ,17-epoxykaurane derivatives by *Gibberella fujikuroi* . Phytochemistry.37: 717- 721.
- Fraga, B.M., Hernandez, H.G.and Guillermo, R.1996. The Biotransformation of Two 3,15-Oxygenate *ent* - Kaurane Derivatives by *Gibberella fujikuroi*. J. Nat. Prod. 59: 952-957.
- Ghisalberti, E.L., Jefferies, P.R., Sefton, M.A. and Sheppard, P.N.1977. Microbiological Transformation of 19-oxygenated *ent*-kauranes. Tetrahedron.33: 2451 - 2456.
- Granados, A.G., Martinaz, A., Onorato, M.E. and Arias, J.M.1986. Microbial Transformation of Tetracyclic Diterpenes: Conversion of *ent*-Kaurenones by *Aspergillus niger*. J. Nat. Prod. 49: 126 - 132.
- Hanson, J.R. 1992. The Microbiological Transformation of Diterpenoids. Nat. Prod. Rep.: 139 - 151.
- Hoffmann, J.J. and Punnapayak, H.1988. Bioconversion of Grindellic acid into 3 α -hydroxygrindellic acid. J. Nat. Prod. 51: 125 - 128.
- Iizuka, H.and Naito, A. 1981. Microbial Conversion of Steroids and alkaloids. University of

Tokyo Press.

- Lamare, V. and Furstoss, R. 1990. Bioconversion of Sesquiterpenes. Tetrahedron 46: 4109 - 4132.
- Mari, K. and Matsui, M. 1966. Total synthesis of (±)-Kaur-16-en-19-oic acid. Tetrahedron Letters. 2: 175-180.
- Madyastha, K.M. and Krishna Murthy, N.S.R. 1988. Transformation of Acetates of Citronellol, Geraniol and Linalool by *Aspergillus niger* : Regiospecific Hydroxylation of Citronellol by Cell - Free System. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 324 - 329.
- Moat, A.G. and Foster, J.W. 1988. Microbial Physiology. John Wiley & Son.
- Oliveira, B.H., Santos, M.C. and Leal, S.P. 1999. Biotransformation of the diterpenoid, isostervioid, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chysoginum* and *Rhizopus arrhizus*. Phytochemistry. 51: 727-741.
- Pedmaja, V., Thankamany, V., Hara, N., Fujimoto, Y. and Hisham, A. 1995. Biological Activity of *Annona glabra*. J. Ethnopharmacology. 48: 21-24.
- Peterson, D.H. and Murray, H.C. 1952. Microbiological Oxygenation of Steroid at Carbon 11. J. Am. Chem. Soc. 74: 1871 - 1872.
- Pinder, A.R. 1960. The Chemistry of Terpenes. John Wiley & Son INC.
- Prave, P., Faust, U., Sittig, W. and Sakatsch, D.A. 1987. Biotransformation. Fundamentals of Biotechnology. VOH Verlagsgesellschaft mbH.
- Prema, B.R. and Bhattacharyya, P.K. 1962. Microbial Transformation of Terpenes II : Transformations of α -pinene. Appl. Microbiol. 10: 524 - 528.
- Raper, K.B., Fennell, D. 1977. The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing.
- Roengsumran, S., Petson, A., Sommit, D. and Vilaivan, T. 1999 a. Labdane Diterpenoids from *Croton oblongifolius*. Phytochemistry. 50: 449 - 453.
- Roengsumran, S., Singtotong, P., Pudhom, K., Ngamrochanavanic, N., Petson, A. and Chaichantipyuth, C. 1999 b. Neocrotocembranal from *Croton oblongifolius*. J. Nat. Prod. 62: 1163 - 1168.
- Rose, A.H. 1980. Microbial Enzymes and Bioconversions. Academic Press.
- Silva, E.A., Takahashi, J.A., Boaventura, M.A.D., Oliveira, A.B. 1999. The biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. Phytpchemistry. 59: 397-400.
- Stumpf, P.K. and Conn, E.E. 1980. The Biochemistry of Plant. Academic Press.

- Tomson, R.H. 1993. The Chemistry of Natural Products. Chapman & Hall.
- Turner, W.B. 1971. Fungal Metabolites. Academic Press.
- Vieria, H.S., Takahashi, J.A. and Boaventura, M.A.D. 2000. Biotransformation of methyl *ent*-17-hydroxy-16 β -Kauran-19-oate by *Rhizopus stolonifer*. App. Micro. Biotech. 53: 601 - 604.
- Wang, D.I.C., Cooney, G.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrer, A.E. and Lilly, M.D. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. John wiley & Son.
- Wu, Y.C., Hung, Y.C., Chang, F.R., Consentino, M. and Wang, H.K. 1996. Identification of *ent*-16 β ,17-Dihydroxykauran-19-oic Acid as an Anti-HIV Principle and Isolation of New Diterpenoids Annosquamosin A and B from *Annona squamosa*. J. Nat. Prod. 59: 635 - 637.
- Yang, L.L., Yen, K.Y., Konno, C., Oshima, Y. Kiso, Y. and Hikino, H. 1986. Antihepatotoxic Principal of *Wedelia Chinensis* Herbs. Planta. Med.: 499 - 500.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหาร

Potato Dextrose Agar (PDA) มีองค์ประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำมันฝรั่งที่ล้างสะอาดแล้วมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. ไปต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก สังเกตได้จากเมื่อใช้มือบีบแล้วมันฝรั่งจะนิ่มและแตกออกง่าย จากนั้นกรองแยกเอาส่วนที่เป็นน้ำออกมา เติมน้ำกลั่นที่เหลือลงไป คนให้ละลายหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Soy Bean Meal Glucose medium (SMG medium) มีองค์ประกอบดังนี้

น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5	กรัม
soy bean meal	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ไดโบแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ซึ่ง soy bean meal ในสัดส่วนต่ออาหาร 50 มล.ใสในขวดรูปชมพู่แต่ละขวด ผสม ส่วนผสมอื่นๆเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นแล้วคนให้ละลาย ปรับ pH เท่ากับ 7 จากนั้นแบ่งใส่ขวดรูป ชมพู่ที่ซึ่ง soy bean meal เตรียมไว้ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Ratio of front (R_f))

เมื่อนำแผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบางออกจากโถแก้วที่บรรจุตัวทำละลายแล้ววัดระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (solvent front) และระยะการเคลื่อนที่ของสารที่ปรากฏบนแผ่นอินเลเยอร์โครมาโตกราฟี จากนั้นนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ระบบตัวทำละลายที่ใช้ (Solvent system) ในการทดลอง

เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดแอซีติก	อัตราส่วน	70 : 30 : 2
(Hexane : Ethyl acetate : acetic acid)		
เอทิลอะซิเตต : เมทานอล	อัตราส่วน	85 : 15
(Ethyl acetate : Methanol)		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ข้อมูลของผลึก และโครงสร้างของ Compound 3

Empirical formula	$C_{20}H_{28}O_5$
Formula weight	348.42
Temperature	293(2) K
Wavelength	$0.71073 \text{ \AA}^\circ$
Crystal system, space group	orthorhombic, P2(1)2(1)2(1)
Unit cell dimensions	$a = 7.87820(10) \text{ \AA}^\circ$ alpha = 90 deg. $b = 14.2772(2) \text{ \AA}^\circ$ beta = 90 deg. $c = 15.7818(2) \text{ \AA}^\circ$ gamma = 90 deg.
Volume	$1775.12(4) \text{ \AA}^{\circ 3}$
Z, Calculated density	4, 1.304 mg/m ³
Absorption coefficient	0.092 mm ⁻¹
F(000)	752
Theta range for data collection	1.92 to 30.45 deg.
Limiting indices	$-11 \leq h \leq 11$, $-17 \leq k \leq 19$, $-18 \leq l \leq 21$
Reflections collected / unique	13268 / 4958 [R(int) = 0.0152]
Completeness to theta = 30.45	0.946
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	4958 / 0 / 338
Goodness-of-fit on F ²	1.035
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0300, wR2 = 0.0798
R indices (all data)	R1 = 0.0331, wR2 = 0.0823
Absolute structure parameter	-0.5(6)
Largest diff. peak and hole	0.207 and -0.130 e. \AA^{-3}

ตำแหน่งพิกัดของอะตอมในแนวแกน x ,y และ z และตัวแปรแทนที่ไอโซโทปคที่เท่ากัน นิยามเป็น 1/3 ของเส้นแกนออร์โธโกนอล (U(eq))

	x	y	z	U(eq)
C(1)	5393(2)	11329(1)	-1115(1)	31(1)
C(2)	4052(2)	11967(1)	-750(1)	40(1)
C(3)	3854(2)	11819(1)	204(1)	37(1)
C(4)	3549(1)	10790(1)	445(1)	27(1)
C(5)	4994(1)	10188(1)	41(1)	22(1)
C(6)	5064(1)	9168(1)	340(1)	25(1)
C(7)	6793(1)	8741(1)	140(1)	25(1)
C(8)	7114(1)	8732(1)	-816(1)	24(1)
C(9)	6860(1)	9731(1)	-1221(1)	23(1)
C(10)	5186(1)	10263(1)	-957(1)	23(1)
C(11)	7283(1)	9630(1)	-2191(1)	30(1)
C(12)	6577(2)	8757(1)	-2631(1)	37(1)
C(13)	6920(2)	7864(1)	-2112(1)	40(1)
C(14)	6020(2)	7968(1)	-1253(1)	34(1)
C(15)	8933(2)	8355(1)	-1017(1)	34(1)
C(16)	8772(2)	7818(1)	-1847(1)	40(1)
C(17)	10022(3)	7381(1)	-2251(1)	58(1)
C(18)	3635(2)	10732(1)	1426(1)	39(1)
C(19)	1734(1)	10495(1)	216(1)	32(1)
C(20)	3579(2)	9945(1)	-1446(1)	32(1)
O(1)	8134(1)	9250(1)	547(1)	34(1)
O(2)	673(1)	11013(1)	-77(1)	57(1)
O(3)	1411(1)	9605(1)	408(1)	43(1)
O(4)	6814(1)	10418(1)	-2708(1)	44(1)
O(5)	6599(2)	11671(1)	-1492(1)	47(1)

C (1-20) คือ ตำแหน่งของคาร์บอนอะตอม และ O (1-5) คือ ตำแหน่งของออกซิเจนอะตอม

ความยาวพันธะระหว่าง คาร์บอน - คาร์บอน และ คาร์บอน - ออกซิเจน ในโครงสร้างของ
Compound 3

พันธะ	ความยาวพันธะ(อังสตรอม)
C(1)-O(5)	1.2218
C(1)-C(2)	1.5096
C(1)-C(10)	1.5515
C(2)-C(3)	1.5296
C(3)-C(4)	1.5357
C(4)-C(19)	1.5338
C(4)-C(18)	1.5530
C(4)-C(5)	1.5622
C(5)-C(6)	1.5316
C(5)-C(10)	1.5867
C(6)-C(7)	1.5254
C(7)-O(1)	1.4347
C(7)-C(8)	1.5296
C(8)-C(14)	1.5516
C(8)-C(15)	1.5630
C(8)-C(9)	1.5754
C(9)-C(11)	1.5745
C(9)-C(10)	1.5776
C(10)-C(20)	1.5503
C(11)-O(4)	1.4376
C(11)-C(12)	1.5306
C(12)-C(13)	1.5395

ความยาวพันธะระหว่าง คาร์บอน - คาร์บอน และ คาร์บอน - ออกซิเจน ในโครงสร้างของ Compound 3 (ต่อ)

พันธะ	ความยาวพันธะ(อังสตรอม)
C(13)-C(16)	1.5190
C(13)-C(14)	1.5370
C(15)-C(16)	1.5231
C(16)-C(17)	1.3294
C(19)-O(2)	1.2074
C(19)-O(3)	1.3320

C (1- 20) คือ ตำแหน่งของคาร์บอนอะตอม

O (1- 5) คือ ตำแหน่งของออกซิเจนอะตอม

ค่าของมุมที่เกิดพันธะระหว่างอะตอมของคาร์บอนและออกซิเจนในโครงสร้างของ Compound 3

พันธะ	มุมระหว่างพันธะ(องศา)
O(5)-C(1)-C(2)	119.24
O(5)-C(1)-C(10)	123.49
C(2)-C(1)-C(10)	117.23
C(1)-C(2)-C(3)	111.31
C(2)-C(3)-C(4)	113.05
C(19)-C(4)-C(3)	110.50
C(19)-C(4)-C(18)	105.15
C(3)-C(4)-C(18)	106.89
C(19)-C(4)-C(5)	115.61
C(3)-C(4)-C(5)	108.17
C(18)-C(4)-C(5)	110.20
C(6)-C(5)-C(4)	115.10
C(6)-C(5)-C(10)	111.49
C(4)-C(5)-C(10)	115.94
C(7)-C(6)-C(5)	110.42
O(1)-C(7)-C(6)	111.18

O(1)-C(7)-C(8)	108.95
C(6)-C(7)-C(8)	110.84
C(7)-C(8)-C(14)	110.61
C(7)-C(8)-C(15)	110.77
C(14)-C(8)-C(15)	100.21
C(7)-C(8)-C(9)	111.78
C(14)-C(8)-C(9)	112.68
C(15)-C(8)-C(9)	110.24
C(11)-C(9)-C(8)	106.52
C(11)-C(9)-C(10)	118.49
C(8)-C(9)-C(10)	115.80

ค่าของมุมที่เกิดพันธะระหว่างอะตอมของคาร์บอนและออกซิเจนในโครงสร้างของ Compound 3 (ต่อ)

พันธะ	มุมระหว่างพันธะ(องศา)
C(20)-C(10)-C(1)	107.05
C(20)-C(10)-C(9)	114.26
C(1)-C(10)-C(9)	110.00
C(20)-C(10)-C(5)	113.37
C(1)-C(10)-C(5)	103.61
C(9)-C(10)-C(5)	108.00
O(4)-C(11)-C(12)	106.63
O(4)-C(11)-C(9)	115.22
C(12)-C(11)-C(9)	116.04
C(11)-C(12)-C(13)	111.66
C(16)-C(13)-C(14)	101.80
C(16)-C(13)-C(12)	110.54
C(14)-C(13)-C(12)	107.96
C(13)-C(14)-C(8)	101.74
C(16)-C(15)-C(8)	105.73
C(17)-C(16)-C(13)	126.87

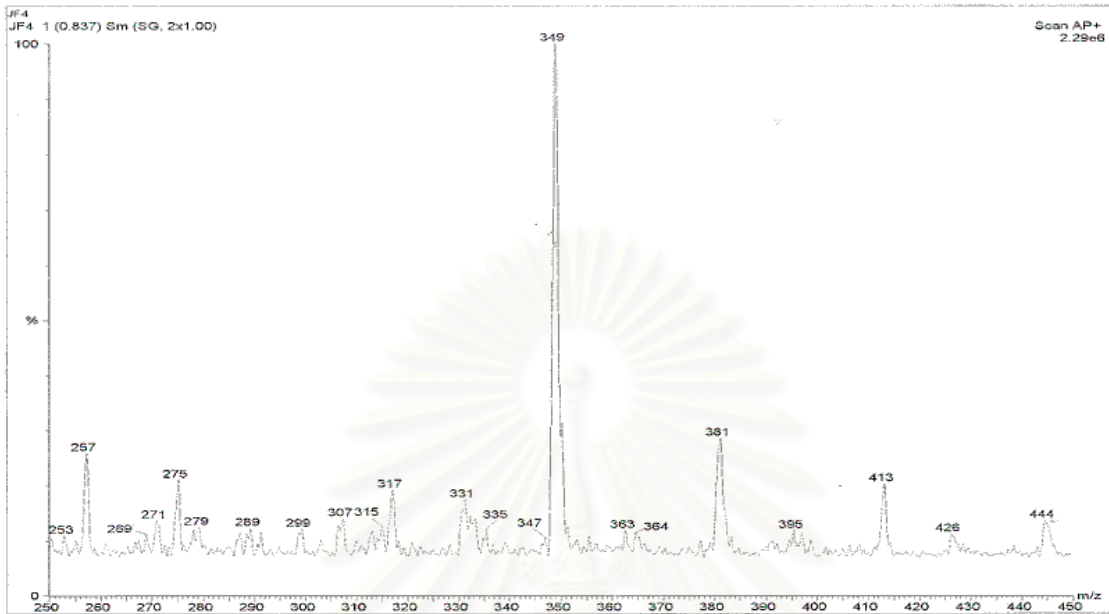
C(17)-C(16)-C(15)	125.95
C(13)-C(16)-C(15)	107.17
O(2)-C(19)-O(3)	122.68
O(2)-C(19)-C(4)	124.55
O(3)-C(19)-C(4)	112.70

C (1- 20) คือ ตำแหน่งของคาร์บอนอะตอม
O (1- 5) คือ ตำแหน่งของออกซิเจนอะตอม

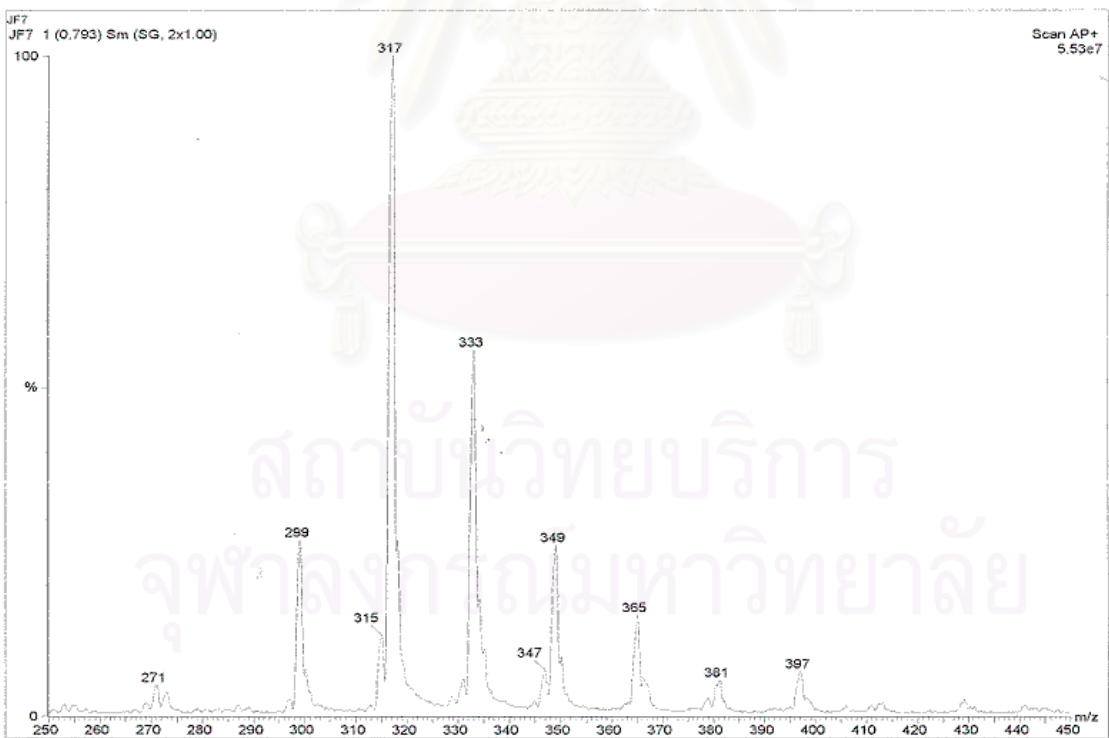


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

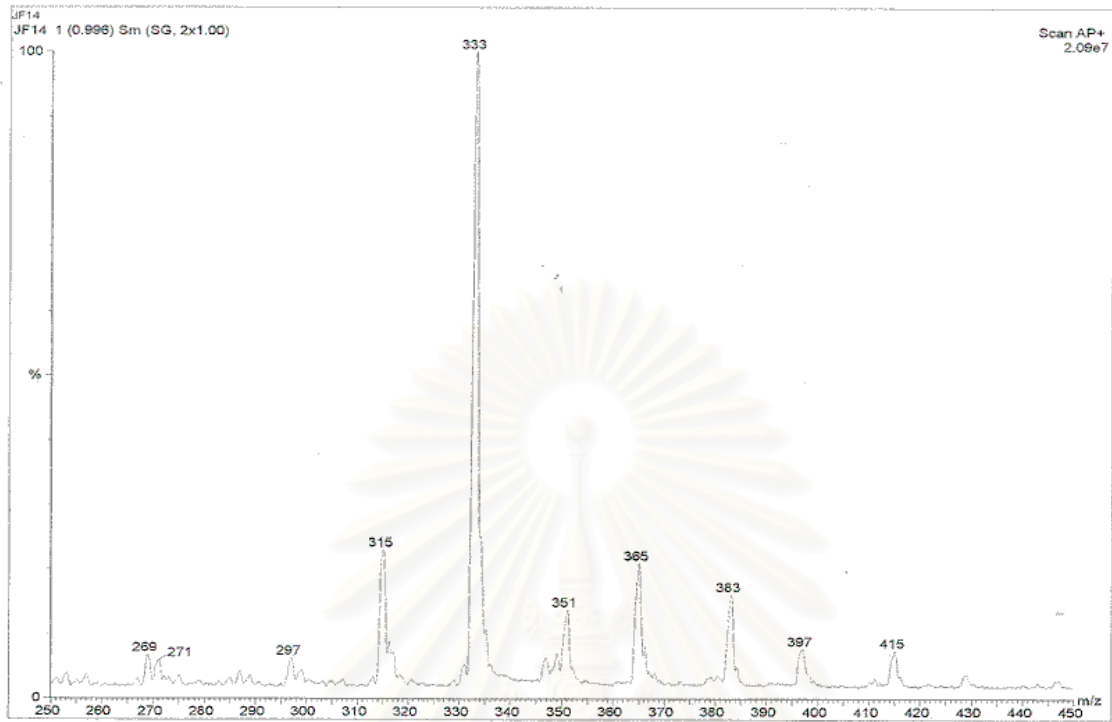
ภาคผนวก ง



แมสสเปกตรัมของ Compound 3



แมสสเปกตรัมของ Compound 1



แมสสเปกตรัมของ Compound 2

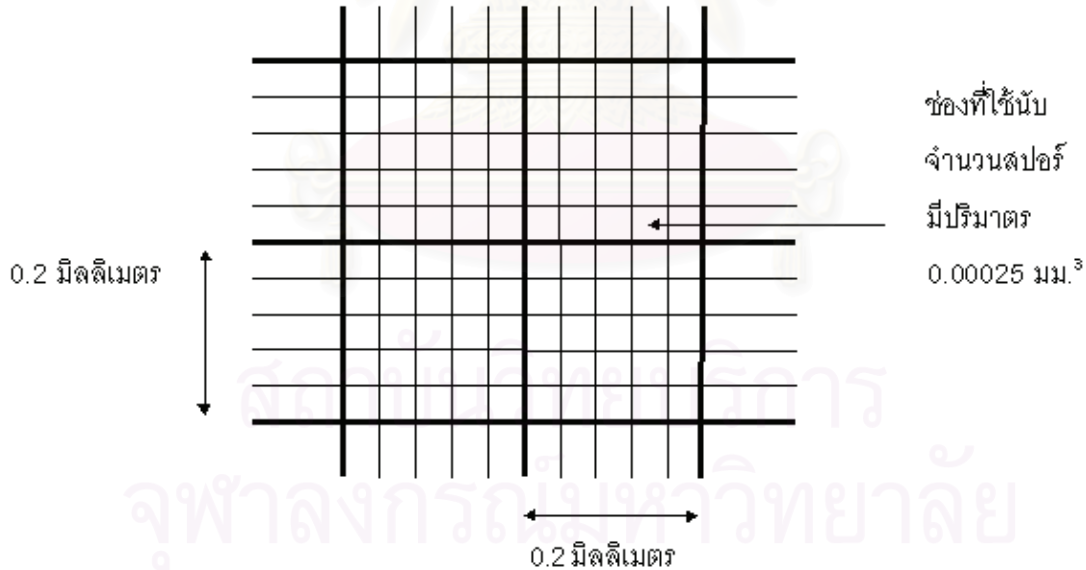
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

การตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count

โดยใช้ Counting chamber ของ Haemocytometer

Haemocytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของเชื้อรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอนและมีขอบยกสูงจากบริเวณที่ขีดไว้ เมื่อปิดด้วย cover glass และสไลด์ ในบริเวณที่มีขีดคิดเป็นความลึก 0.1-0.2 มิลลิเมตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่มีขีดแบ่งเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในช่องจะมีปริมาตร 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ($0.05 \times 0.05 \times 0.1$) เครื่องมือนี้จะมี cover glass ที่มีขนาดและความหนาเฉพาะ จึงไม่ควรใช้ cover glass อื่นปิดแทน เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องสไลด์กับกระจกปิดนี้ผิดไปได้ อีกประการหนึ่ง ถ้ากระจกหนาเกินไปจะมีปัญหาต่อการโฟกัสกล้อง



ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์

I
การตรวจนับ : ตัวอย่างสปอร์ ควรเจือจางในระดับที่สามารถจะตรวจนับจำนวนได้สะดวกในแต่ละช่องเล็ก ควรมีจำนวนอยู่ระหว่าง 1-10 เซลล์ เมื่อตรวจนับให้ปฏิบัติดังนี้

- ล้างเครื่องมือให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง
- ปิดทับบริเวณสี่เหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่ง ด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) ที่จำเพาะเจาะจง

- ใช้ปิเปตที่มีความจำเพาะกับเครื่องนี้ โดยแต่ละปลายปิเปตที่ช่องว่างระหว่างสไลด์และกระจกปิด โดยปล่อยให้ตัวอย่างค่อยๆ ซึมผ่านเข้าไปในบริเวณช่องซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น
- ตรวจนับโดยใช้ objective กำลังขยาย 40 เท่า
- นับจำนวนสปอร์ในแต่ละช่องเล็ก การตรวจนับควรตรวจนับทั้งสิ้นมากกว่า 10 ช่องขึ้นไป

การคำนวณ : ปริมาตรของสปอร์คำนวณหาจากจำนวนที่นับได้จากแต่ละช่องเล็กหารด้วยจำนวนช่อง จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ต่อหน่วยช่องเล็ก สมมติเป็น N เซลล์ต่อช่องเทียบหาค่าใน 1 มิลลิเมตร ดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{ตัวอย่าง } 0.00025 \text{ มม.}^3 \text{ มีจำนวนสปอร์} &= N \quad \text{เซลล์} \\
 \text{ตัวอย่าง } 1.0 \text{ มม.}^3 \text{ มีจำนวนสปอร์} &= \frac{N \times 10^3}{0.00025} \text{ เซลล์} \\
 &= 4N \times 10^6 \quad \text{เซลล์}
 \end{aligned}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจรัสลักษณ์ เพชรวัง เกิดวันที่ 11 กรกฎาคม พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2543



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย