สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารตั้งต้นสเตียรอยด์จากสเตียรอลพืช โดย *Mycobacterium fortuitum*

นางสาว บุปผา หลักเรืองทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534

ISBN 974-578-571-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017443 I10313035

Optimal Conditions for the Production of Steroid Precursors from Plant Sterols by *Mycobacterium fortuitum*

Miss Buppa Lakruangsap

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-578-571-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารตั้งต้นสเตียรอยด์จากสเตียรอลพืช โดย *Mycobacterium fortuitum*
โดย	นางสาว บุปผา หลักเรืองทรัพย์
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดี บัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เรืองสาราญ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บุปผา หลักเรืองทรัพย์ : สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารตั้งต้นสเตียรอยด์จากสเตียรอลพืชโดย *Mycobacterium fortuitum* (Optimal Conditions for the Production of Steroid Precursors from Plant Sterol by *Mycobacterium fortuitum*) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, 110 หน้า. ISBN 974-578-571-7

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 และการผลิตสารตั้งต้นสเตียรอยด์จากสเตียรอลพืชโดยจุลินทรีย์ดังกล่าว พบว่า อาหารเลี้ยงหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ นิวเตรียนบรอท ที่เสริมด้วย 1.0 กรัม/ลิตร ผงสกัดยีสต์ 5.0 กรัม/ลิตร กลีเซอรอล และ 1.0 กรัม/ลิตร ทวีน 80 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเปลี่ยนสเตียรอลพืชไปเป็นสารตั้งต้นสเตียรอยด์ คือ 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน (AD) ประกอบด้วยสารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8 % (นน./นน.) หรือปริมาณกลูโคส 0.8 % (นน./นน.) และมีปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid content) 5.0 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมดเป็น 0.50 กรัม/ลิตร KH_2PO_4 0.50 กรัม/ลิตร $CaCO_3$ 3.0 กรัม/ลิตร $MgSO_4$ 2.0 กรัม/ลิตร NaCl 0.4 กรัม/ลิตร และสารละลายสเตียรอลพืชในคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 0.84 มก./มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารตั้งต้น และปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0-8.0 ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม คือ เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน จะให้การเปลี่ยนสเตียรอลเป็น AD สูงสุด 83.6 %

งานวิจัยนี้ยังรายงานวิธีที่เหมาะสมในการสกัดแยก AD ออกจากน้ำหมักและทำให้บริสุทธิ์ พบว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด คือ เอทธิลอะซีเตท ในอัตราส่วนน้ำหมัก:เอทธิลอะซีเตท เท่ากับ 1:2 (ปริมาตร/ปริมาตร) การสกัดทำซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที สามารถสกัด AD ออกมาได้ 97.99 % ของปริมาณที่มีอยู่ในน้ำหมัก การทำ AD ให้บริสุทธิ์ใช้วิธีโครมาโตกราฟีบนซิลิกาเจลคอลัมน์ 2 ครั้ง โดยครั้งแรกชะด้วย เอทธิลอะซีเตท:คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 15:85 (ปริมาตร/ปริมาตร) นำสารที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์ที่ 2 ซึ่งชะด้วย ไซโคลเฮกเซน:เอทธิลอะซีเตท ในอัตราส่วน 4:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ระเหยตัวทำละลายออก และตกผลึกสารประกอบที่ได้ด้วยตัวทำละลายผสม คือ เอทธิลอะซีเตทกับเฮกเซน ได้ผลึกสีขาวที่มีความบริสุทธิ์ 97 % และได้ผลิตผล 18.6 % ผลการวิเคราะห์ทางเคมีของสารประกอบที่ได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน AD พบว่า ข้อมูลการวิเคราะห์จุดหลอมเหลว แมสสเปกโตรสโคปี อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี และโปรตอน-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ยืนยันว่าสารประกอบที่ได้คือ 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน

ภาควิชา..เทคโนโลยีชีวภาพ.....	ลายมือชื่อนิสิต..บุปผา หลักเรืองทรัพย์.....
สาขาวิชา..เทคโนโลยีชีวภาพ.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..ไพเราะ ปิ่นพานิชการ.....
ปีการศึกษา..2533.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..นลิน นิลอุบล.....

Buppa Lakruangsap : Optimal Conditions for the Production of Steroid Precursors from Plant Sterols by *Mycobacterium fortuitum*. Thesis Advisor : Asso. Prof. Pairoh Pinpanichkarn, Ph. D., Co-Advisor : Asso. Prof. Naline Nilubol, Ph. D., 110 pp. ISBN 974-578-571-7

Optimal conditions for growth and bioconversion of plant sterol into steroid intermediate by *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 were investigated. The suitable medium compositions for inoculum were nutrient broth supplemented with 1.0 g/l yeast extract, 5.0 g/l glycerol and 1.0 g/l tween 80. The optimal medium compositions for bioconversion of plant sterol into steroid intermediate, 4-androstene-3, 17-dione (AD), consisted of termarmyl-hydrolyzed starch having 20.8 % (w/w) of reducing sugar or 0.8 % (w/w) of glucose with 5.0 g/l of total solid content as a carbon source, $(NH_4)_2HPO_4$ at a total nitrogen content of 0.50 g/l as a nitrogen source, 0.50 g/l of KH_2PO_4, 3.0 g/l of $CaCO_3$, 2.0 g/l of $MgSO_4$, 0.4 g/l of NaCl and plant sterol dissolved in chloroform at 0.84 mg/ml of the medium as a substrate. The medium was adjusted to pH 7.0-8.0. Under the suitable growth conditions which were at 30 °C with 200 rpm shaking for 5 days, 83.6 % bioconversion of sterol to AD was obtained.

Furthermore, conditions for extraction and purification of AD from the fermentation broth were also reported. The suitable solvent for extracting was ethylacetate. The ratio between culture broth and the solvent was 1:2 (v/v). Extraction was carried out 2 times for 15 minutes each. Under these conditions, 97.99 % of AD with respect to the amount present in the broth was recovered. It was purified by chromatography on silica gel column twice. The first silica gel column chromatography was eluted with a mixture of ethylacetate and chloroform at a ratio of 15:85 (v/v). The eluent was further chromatographed on a second silica gel column eluted with cyclohexane mixed with ethylacetate at a ratio of 4:1 (v/v). The eluent was evaporate. AD was crystallized by using the mixed solvent of ethylacetate and hexane. White crystal was obtained with 18.6 % recovery and 97 % purity. Chemical analyses of the crystal in comparison with standard AD which were melting point, mass spectroscopy, infrared spectroscopy and proton-nuclear magnetic resonance confirmed that the compound obtained was 4-androstene-3, 17-dione.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือแนวความคิด กำลังใจและความเข้าใจ อันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน (ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการคุมสอบวิทยานิพนธ์) รองศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เรืองสาราญ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาในแง่วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี

นอกจากนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ท่านผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณ คุณวาสนา โตเสี้ยง ผู้ซึ่งให้คำแนะนำความช่วยเหลือเป็นอันมากแก่ข้าพเจ้า ขอขอบคุณพี่ๆนักวิจัย เจ้าหน้าที่สถาบันฯ ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย และขอขอบคุณ พี่นี้ น้องจุ๊บ น้องตุ่ย ผู้ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือต่างๆ และเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา รวมทั้งพี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (กพวท หรือ STDB) ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยในครั้งนี้

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ ทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ ความช่วยเหลือ กำลังใจ กำลังกาย และกำลังทรัพย์แก่ข้าพเจ้าตลอดมาในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญรูป..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. วิธีดำเนินงานวิจัย..... 19

3. ผลการทดลอง..... 30

4. บทสรุปและวิจารณ์..... 75

เอกสารอ้างอิง..... 82

ภาคผนวก..... 89

ประวัติผู้เขียน..... 110

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างพื้นฐานของสเตียรอยด์.....	2
2	สารตั้งต้นสเตียรอยด์.....	3
3	แผนผังแสดงการผลิตสารประกอบสเตียรอยด์จากสเตียรอล.....	7
4	การตัดหมู่ข้างเคียงของคอเลสเตียรอลโดยจุลินทรีย์.....	9
5	การเปลี่ยนเบตา-ซิโตสเตียรอลไปเป็นสเตียรอยด์โดยจุลินทรีย์ผ่าเหล่าของ *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842.....	12
6	กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อนิวเตรียนบรอทที่เสริมผงสกัดยีสต์ กลีเซอรอล และทวีน 80 ในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง.....	35
7	กราฟแสดงการเจริญและการผลิต AD ของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิต AD ในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง.....	36
8	ค่า R_f ของสารมาตรฐาน AD และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ในระบบตัวทำละลาย 2 ระบบ.....	66
9	ลักษณะของแก๊สโครมาโตแกรมของสาร AD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79.....	68
10 ก	แมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD.....	70
10 ข	แมสสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ที่ผลิตโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79.....	70
11 ก	อินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD.....	72
11 ข	อินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ที่ผลิตโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79.....	72
12 ก	NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD (วัดด้วย ^{1}H-NMR).....	74

รูปที่ หน้า

12 ข NMR สเปกตรัมของสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ที่ผลิตโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS313.79..... 74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างจุลินทรีย์ผ่าเหล่าที่ตัดเฉพาะหมู่ข้างเคียงของสเตียรอล.....	11
2	การย่อยสเตียรอลโดยจุลินทรีย์เมื่อใช้สารยับยั้งเอนไซม์ น้ำมันและตัวดูดซับ.....	15
3	ผลของการใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดต่างๆต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการเขย่าแบบวงกลมเป็นเวลา 3 วัน.....	31
4	ผลของการใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดต่างๆต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการเขย่าแบบเส้นตรงเป็นเวลา 3 วัน.....	31
5	ผลของการใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดต่างๆต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการเขย่าแบบวงกลมเป็นเวลา 3 วัน.....	32
6	ผลของการใช้อาหารเลี้ยงหัวเชื้อชนิดต่างๆต่อการเจริญของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบการเขย่าแบบเส้นตรงเป็นเวลา 3 วัน.....	33
7	ผลการวิเคราะห์ร้อยละของการเปลี่ยนสเตียรอลไปเป็น AD โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เป็นเวลา 7 วัน ในระบบการเขย่าแบบวงกลมและแบบเส้นตรง.....	37
8	ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆต่อการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน.....	39

ตารางที่ หน้า

9 ผลการผันแปรเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลรีดิวส์ (นน./นน.) ในสารละลายแป้งย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน..... 40

10 ผลการผันแปรปริมาณของแข็งของสารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ 20.8% (นน./นน.) ต่อการผลิต AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน..... 41

11 ผลการผันแปรไนโตรเจนทั้งหมดในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต AD ตามภาคผนวกที่ 1.3 ต่อการสร้าง AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน..... 43

12 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆต่อการผลิต AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน..... 44

13 ผลการผันแปรปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ต่อการผลิต AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน..... 46

14 ผลการผันแปรปริมาณเกลือแร่แต่ละชนิดต่อการผลิต AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน โดยให้ปริมาณของเกลือแร่ชนิดอื่นๆเท่ากับในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6 47

15 ผลการผันแปรปริมาณสเตียรอลที่ใช้เป็นสารตั้งต้นต่อการผลิต AD โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน..... 49

ตารางที่ หน้า

16 ผลของความเป็น กรด-ด่าง เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต AD จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30° ซ. 50

17 ผลของอุณหภูมิต่อ การเลี้ยง เชื้อ ต่อการผลิต AD จาก สเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 หลังจากหมักเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เมื่อความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 51

18 เปรียบเทียบปริมาณ AD ที่ได้จากสเตียรอล โดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 เมื่อผันแปรระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ.... 52

19 ประสิทธิภาพของตัวทำละลายชนิดต่างๆในการสกัด AD จากน้ำหมัก..... 54

20 ผลการผันแปรปริมาตรเอทธิลอะซีเตทและไดคลอโรมีเทนในการสกัด AD จากน้ำหมัก..... 55

21 ผลการผันแปรเวลาในการสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตท และไดคลอโรมีเทน..... 56

22 ผลของการเป็นกรด-ด่างในการสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตท และไดคลอโรมีเทน..... 57

23 ผลการผันแปรจำนวนครั้งในการสกัด AD จากน้ำหมักด้วยเอทธิลอะซีเตท หรือ ไดคลอโรมีเทน..... 58

24 ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีบนแผ่นทินเลเยอร์..... 60

25 ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของสาร AD และความสามารถในการแยกสาร AD กับสิ่งเจือปนที่อยู่ใกล้กันบนแผ่นโครมาโตแกรม..... 61

26 ความบริสุทธิ์ของสาร AD ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์..... 64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย