พระบรมราชูปถัมภ์ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 คุณสมบัติและการสังเคราะห์กรดน้ำดีทางชีวภาพ

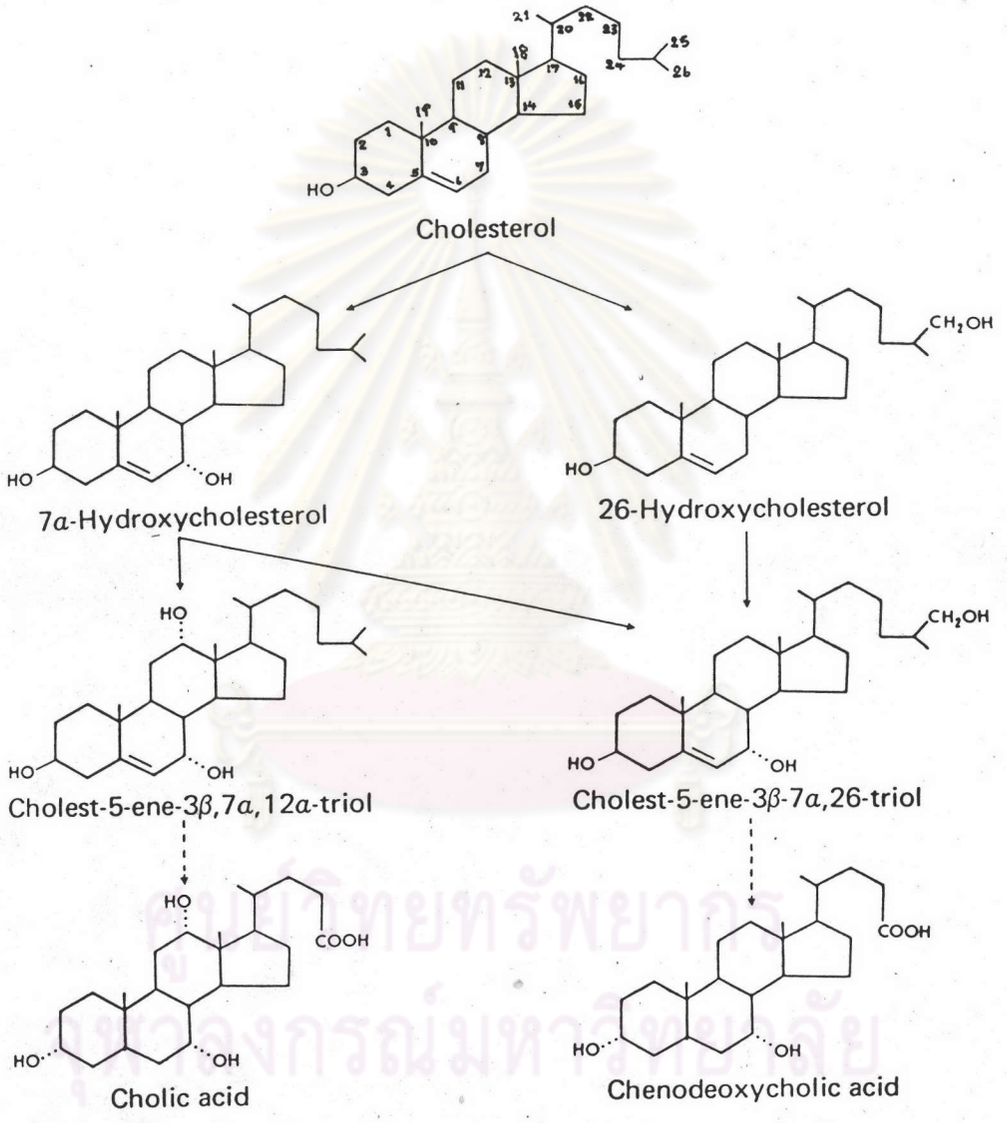
(General Properties and Biosynthesis of Bile Acids)

น้ำดี (bile) เป็นของเหลวทางชีวภาพ (biological fluid) ในร่างกายของสัตว์มีกระดูกสันหลัง น้ำดีที่สร้างขึ้นในร่างกายสัตว์แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันแตกต่างกันที่ปริมาณเท่านั้น องค์ประกอบของน้ำดีในคนมีดังนี้คือ (1) กรดน้ำดี (bile acids) ซึ่งสะสมในรูปของ เกลือน้ำดี (bile salts) เช่น ทอโรโคเลท (taurocholate) และไกลโคโคเลท (glycocholate) ฯลฯ บิลิรูบินไดกลูคูโรไนด์ (bilirubin diglucuronide) บรอมซัลฟาลิน (bromsulfarin) โรสเบนกอล (rosebengal) ฟลูออเรสซิน (fluorescein) ครีเอทีนีน (creatinine) อินูลิน (inulin) ซูโครส (sucrose) กลูโคส โปรตีน โคเลสเตอรอล (cholesterol) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) มิวโคโปรตีน (mucoprotein) โซเดียมอิออน โปตัสเซียมอิออน คลอไรด์อิออนและฟอสเฟต ฯลฯ

น้ำดีมีหน้าที่(2) ช่วยในการดูดซึมสารอาหารประเภทไขมันหรือสารที่สามารถละลายได้ในไขมัน (fat-soluble substances) ช่วยทำให้สารอาหารที่ถูกย่อยจากกระเพาะอาหารมีฤทธิ์เป็นกลางเพื่อให้เหมาะแก่การทำงานของเอ็นไซม์ที่ลำไส้เล็กและช่วยเร่งการทำงานของเอ็นไซม์จากตับอ่อน ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อยสารอาหารประเภทไขมัน

จากส่วนประกอบของน้ำดีตามที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น องค์ประกอบหลักที่สำคัญ คือ (1) กรดน้ำดี ซึ่งจะถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ตับจากสารตั้งต้น (precursor) คือ โคเลสเตอรอลได้ผลเป็นกรดน้ำดี เรียกว่า กรดน้ำดี

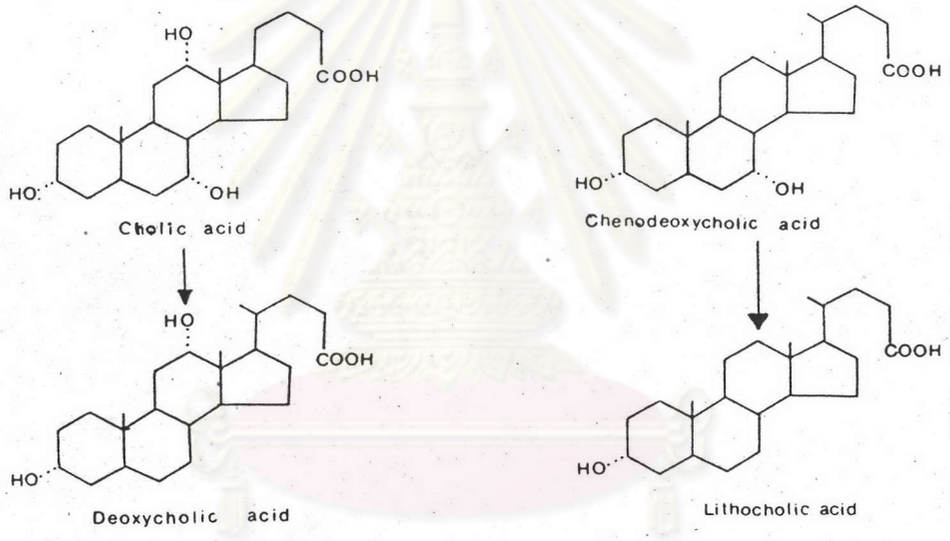
ปฐมภูมิ (primary bile acid) ได้แก่กรดโคลิก (cholic acid) กรดคีโนดีออกซีโคลิก (chenodeoxycholic acid) หลังจากนั้นจะถูกคอนจูเกต (conjugate) ด้วยกรดอะมิโนไกลซีน (glycine, H_2NCH_2COOH) หรือ ทอรีน (taurine, $H_2NCH_2CH_2SO_3H$) ได้เป็นเกลือน้ำดี รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ขั้นตอนการสังเคราะห์กรดน้ำดีอิสระและกรดน้ำดีคอนจูเกต เริ่มจากสารตั้งต้นคือ โคเลสเตอรอล(1)

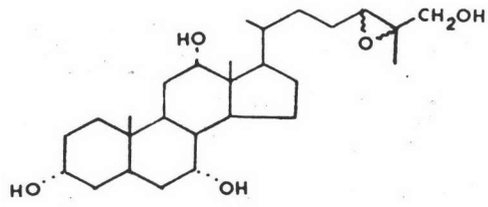
เมื่อพิจารณาโครงสร้างของกรดน้ำดี และโดยเฉพาะคอนจูเกตของกรดน้ำดีพบว่า มีคุณสมบัติคล้ายพวกสบู่ โดยโมเลกุลจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ (1) ส่วนที่ละลายได้ในน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ละลายได้ในไขมัน (hydrophobic) จากคุณสมบัตินี้ทำให้กรดน้ำดีเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของน้ำดีในการช่วยดูดซึมสารอาหารประเภทไขมันดังกล่าวแล้วข้างต้น

ในคนกรดน้ำดีปฐมภูมิจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดน้ำดีทุติยภูมิ (secondary bile acid) เช่น กรดดีออกซีโคลิก (deoxycholic acid) กรดลิโทโคลิก (lithocholic acid) โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การสร้างกรดน้ำดีทุติยภูมิในคน โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ (1)

น้ำดีที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะประกอบด้วยสารที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นหมู่อัลกอฮอล์ (bile alcohol)(3) เช่น น้ำดีในปลาฉลามจะเป็นสารประกอบจำพวกแอลฟาซิมนอล (α-scymnol) มีโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในรูปที่ 3 Haslewood(3) ได้ใช้ความแตกต่างของโครงสร้างน้ำดีเป็นเครื่องมือช่วยในการศึกษาวิวัฒนาการของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

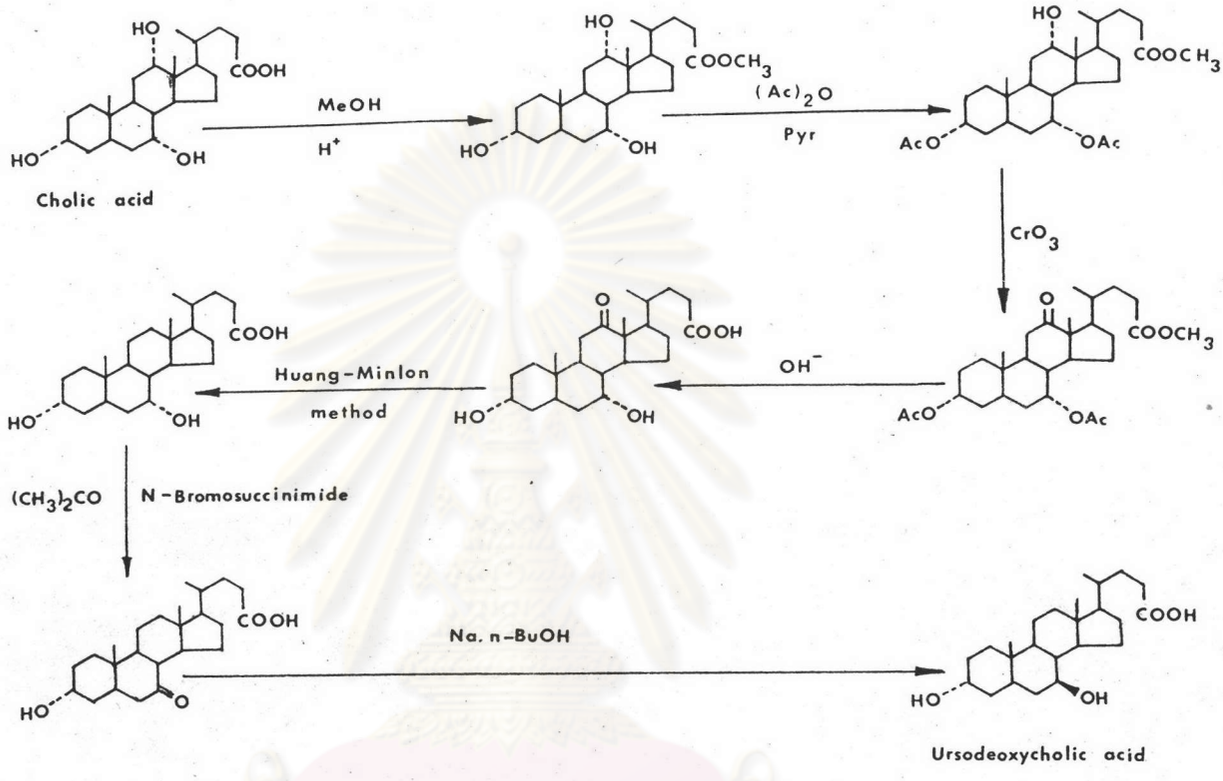


รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของแอลฟาชิมนอล

ประโยชน์ของน้ำดีทางด้านการแพทย์ได้ถูกค้นพบตั้งแต่ปีก่อนคริสต์ศักราช 1300 โดยชาวอียิปต์ ในปีก่อนคริสต์ศักราช 430 Hippcrates ได้ตั้งสมมติฐานว่าน้ำดีเป็นต้นเหตุของโรคต่าง ๆ จนกระทั่งปี ค.ศ. 1527 จึงได้มีการลบล้างสมมติฐานนี้ ในประเทศจีนได้มีผู้นำถุงน้ำดีของสัตว์มาใช้เป็นยารักษาโรค (2)

ในปี ค.ศ. 1975 Danzinger และคณะ (4) ได้รายงานว่ากรดคีโนดีออกซีโคลิก (Chenodeoxycholic acid) มีคุณสมบัติในการละลายก้อนนิ่วที่เกิดจากโคเลสเตอรอล ต่อมาในปี ค.ศ. 1975 Makino และคณะ(5) ได้รายงานว่ากรดอูโซดีออกซีโคลิก (ursodeoxycholic acid) ซึ่งเป็นกรดที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งเดียวกันกับกรดคีโนดีออกซีโคลิกสามารถใช้ในการละลายก้อนนิ่วชนิดนี้ได้เช่นเดียวกัน

แหล่งของกรดอูโซดีออกซีโคลิกที่สำคัญได้มาจากการสกัดน้ำดีของหมี (6) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสกัดกรดน้ำดีจากน้ำดีของสัตว์อื่นๆ อีก เช่น กรดโคลิกได้มาจากการสกัดน้ำดีของวัว (7) ต่อมาได้เริ่มมีการสังเคราะห์กรดน้ำดีบางชนิดด้วยวิธีทางอินทรีย์เคมี โดยตั้งต้นจากโมเลกุลของกรดน้ำดีที่สกัดได้จากสัตว์ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์กรดอูโซดีออกซีโคลิก จากกรดโคลิก ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การสังเคราะห์กรดอูโซดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยวิธีทางอินทรีย์เคมี

เนื่องจากการผลิตกรดน้ำดีด้วยวิธีการสกัดจากอวัยวะของสัตว์ให้ผลผลิตต่ำ ปริมาณที่ผลิตได้น้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการทางการแพทย์ที่เพิ่มขึ้น ตัวอย่างความต้องการและปริมาณผลผลิตแสดงในตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ปริมาณน้ำดีที่ได้จากสัตว์ในประเทศสหรัฐอเมริกา(2)

แหล่งน้ำดี	ปริมาณน้ำดี (ตัน/ปี)				
	1901-1910	1911-1920	1921-1930	1931-1940	1940-1942
โคและ					
กระบือ	414.8	464.2	483.2	516.3	580.6
แกะ	41.0	32.1	48.6	64.4	70.1
สุกร	176.7	200.8	221.2	214.7	248.7

ตารางที่ 2 ปริมาณการนำเข้า น้ำดี สารประกอบของน้ำดี ของประเทศสหรัฐอเมริกา(2)

ปี	ปริมาณนำเข้า (ตัน)
1936	0.647
1937	1.938
1938	7.130
1939	5.175
1940	0.720
1941	14.865
1942	ไม่มีข้อมูล
1943	35.758

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้วิธีการสังเคราะห์กรดน้ำดีโดยวิธีทางอินทรีย์เคมีพบว่า มีความยุ่งยาก กระบวนการผลิตมีหลายขั้นตอน ได้ผลผลิตต่ำจึงมีต้นทุนการผลิตที่สูง ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์กรดอูโซดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งมีขั้นตอนในการสังเคราะห์ถึง 7 ขั้นตอน และได้กรดน้ำดีที่ต้องการในปริมาณ 9-14 เปอร์เซนต์เท่านั้น(8)ขั้นตอนที่ยุ่งยากสืบเนื่องมาจากต้องมีการป้องกันกลุ่มบางกลุ่มในโมเลกุลที่ไวต่อปฏิกริยาเพื่อไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

Murray และ Peterson (9) พบว่าเชื้อราบางชนิดสามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่โมเลกุลของสารประเภทสเตียรอยด์ได้ นับเป็นการเริ่มต้นของการศึกษาปฏิกริยาการเปลี่ยนรูปของสเตียรอยด์โดยจุลินทรีย์ (microbial transformation of steroids) ปฏิกริยานี้เกิดขึ้นโดยเอ็นไซม์ในจุลินทรีย์จึงมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่ใช้มากกว่าปฏิกริยาเคมีผลคือไม่มีความจำเป็นที่จะต้องป้องกันหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกริยาในโครงสร้างของสเตียรอยด์ ทำให้ผลผลิตที่ได้สูงขึ้น วิธีการสกัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์จะทำได้ง่ายขึ้นกว่าการสังเคราะห์ทางอินทรีย์เคมี

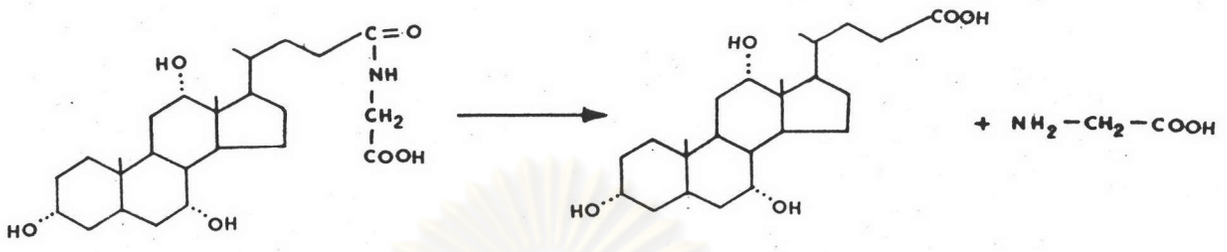
จากโครงสร้างของกรดน้ำดีดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นว่าโครงสร้างทางเคมีของกรดน้ำดีเป็นโครงสร้างแบบเดียวกับสารในกลุ่มสเตียรอยด์ คือ มีโครงสร้างนิวเคลียสส่วนที่เรียกว่า ไซโคลเพนทีโนฟีแนนทรีน (cyclopentenophenanthrene) ดังนั้นจึงได้มีผู้สนใจศึกษาและวิจัยปฏิกริยาการเปลี่ยนรูปของกรดน้ำดีโดยจุลินทรีย์ไว้มากมาย ตัวอย่างเช่น (10-14)

ก. <u>ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของกรดน้ำดีคอนจูเกต</u>

(Hydrolysis of Conjugate Bile Acids)

เนื่องจากพันธะระหว่างกรดน้ำดีและไกลซีนหรือทอรีน เป็นพันธะระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเรียกว่าพันธะเอไมด์ (amide linkage) ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับพันธะเปปไตด์ (peptide bond) ในสารประกอบโปรตีน แตกต่างกันที่พันธะระหว่างกรดน้ำดีและไกลซีนหรือทอรีนมีความคงทนต่อการย่อยสลายด้วยเอ็มไซม์สำหรับย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) และด้วยปฏิกริยาทางเคมี แต่พบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถย่อยสลายพันธะนี้ได้

เช่น การย่อยสลายกรดไกลโคโคลิกให้เป็นกรดโคลิกและไกลซีน (รูปที่ 5)



กรดไกลโคโคลิก กรดโคลิก ไกลซีน

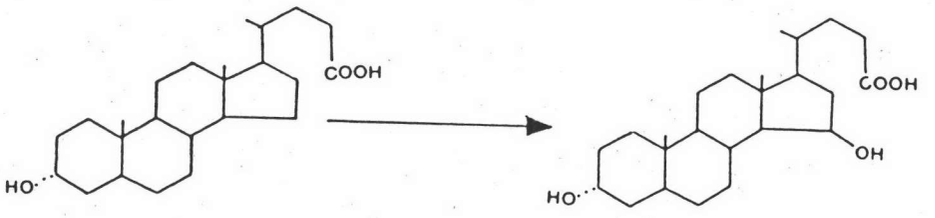
รูปที่ 5 การย่อยสลายกรดไกลโคโคลิกเป็นกรดโคลิกและไกลซีน

ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถนี้ เช่น Alcaligenes faecalis และ Lactobacillus arabinosus(10)

ข. ปฏิกริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxylation)

เป็นการเติมหมู่ไฮดรอกซิล หนึ่งกลุ่มหรือมากกว่าเข้าที่อะตอมของคาร์บอนตำแหน่งต่าง ๆ เช่น ในรูปที่ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

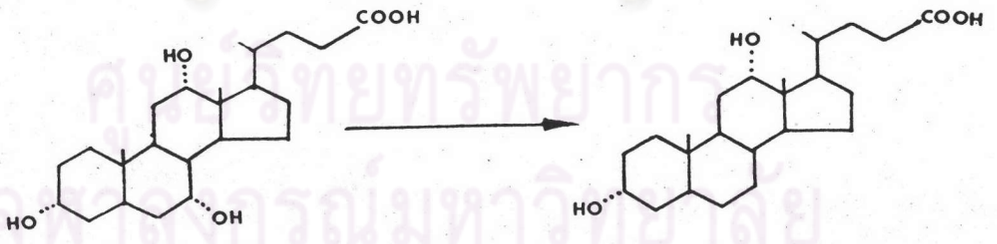


กรด 3 แอลฟา 5 เบตาโคลานิก กรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก

รูปที่ 6 การเปลี่ยนกรด 3 แอลฟา 5 เบตาโคลานิกเป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก โดยเชื้อรา Cunninghamella blakesleeana ST-22 (11)

ค. ปฏิกริยาการดึงหมู่ไฮดรอกซิล (Dehydroxylation)

คือปฏิกริยาที่มีการดึงหมู่ไฮดรอกซิลออกจากโครงสร้างนิวเคลียสของกรดน้ำดี เช่น ปฏิกริยาการเปลี่ยนกรดโคลิกไปเป็นกรดดีออกซีโคลิก ในรูปที่ 7

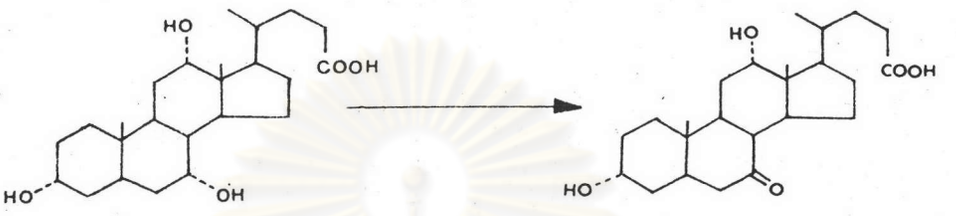


กรดโคลิก กรดดีออกซีโคลิก

รูปที่ 7 การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรดดีออกซีโคลิก โดยจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น E. coli (12)

ง. <u>ปฏิกริยาการดึงไฮโดรเจนอะตอม</u> (Dehydrogenation)

ปฏิกริยานี้อาจเกิดขึ้นกับไฮโดรเจนที่หมู่ไฮดรอกซิล หรือ ระหว่างคาร์บอนอะตอมคู่หนึ่ง ๆ เช่น ในรูปที่ 8 และรูปที่ 9

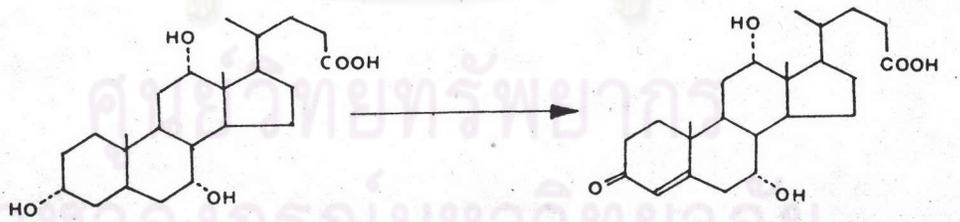


กรดโคลิก

กรด 3 แอลฟา 12 แอลฟาไดไฮดรอกซี 7 ออกโซโคลานิก

รูปที่ 8 การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรด 3 แอลฟา 12 แอลฟาไดไฮดรอกซี 7 ออกโซโคลานิก โดยเชื้อรา <u>Alcaligenes faecalis</u>(13)

หรือ



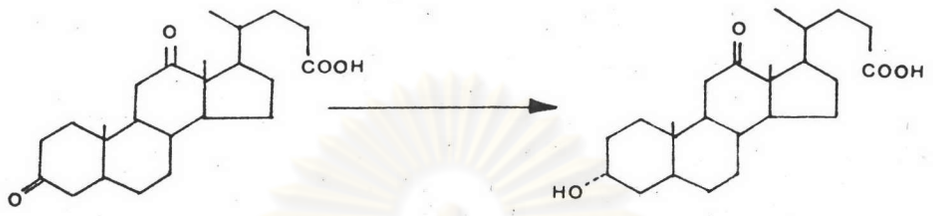
กรดโคลิก

กรด 7 แอลฟา 12 แอลฟาไดไฮดรอกซี 3 ออกโซโคล 4 เอนอิก

รูปที่ 9 การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรด 7 แอลฟา 12 แอลฟาไดไฮดรอกซี 3 ออกโซโคล 4 เอนอิก โดยแบคทีเรียมในดินสายพันธุ์ CE-1(14)

จ. <u>ปฏิกริยารีดักชัน</u> (Reduction)

เป็นปฏิกริยาที่เกิดขึ้นกับคาร์บอนอะตอมที่เป็นหมู่คีโตน หรือหมู่อัลดีไฮด์ไปเป็นหมู่ไฮดรอกซิล เช่นในรูปที่ 10 และรูปที่ 11

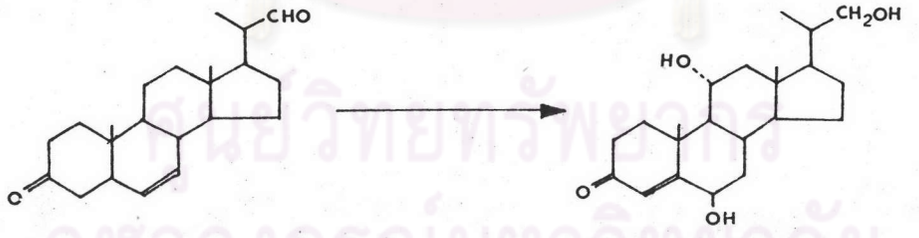


กรด 3, 12 ไดออกโซโคลานิก

กรด 3 แอลฟาไฮดรอกซี 12 ออกโซโคลานิก

รูปที่ 10 การเปลี่ยนกรด 3, 12 ไดออกโซโคลานิกเป็นกรด 3 แอลฟาไฮดรอกซี 12 ออกโซโคลานิก โดยยีสต์(13)

หรือ



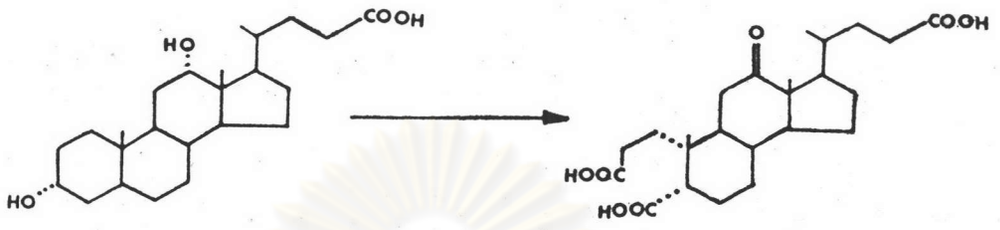
บิสนอโคล 4 เอน -3 ออน 22 ออล

6 เบตา 11 แอลฟา 22 ไตรไฮดรอกซี บิสนอโคล 4 เอน 3 โอน

รูปที่ 11 การเปลี่ยนบิสนอโคล 4 เอน 3 ออน 22 ออล เป็น 6 เบตา 11 แอลฟา 22 ไตรไฮดรอกซีบิสนอโคล 4 เอน 3 โอนโดยเชื้อรา <u>Rhizopus</u> **<u>arrhiza</u>** (13)

ฉ. <u>ปฏิกริยาการสลายโครงสร้างนิวเคลียส</u> (Degradation)

เป็นปฏิกริยาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างคาร์บอนอะตอมคู่หนึ่งคู่ใดในโมเลกุลของกรดน้ำดีต่าง ๆ เช่น



กรดดีออกซีโคลิก กรดดีออกซีไบเลียนิก

รูปที่ 12 การเปลี่ยนกรดดีออกซีโคลิกเป็นกรดดีออกซีไบเลียนิก โดย <u>Arthrobacter simplex</u> (10)

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น ปฏิกริยาการเปลี่ยนรูปกรดน้ำดีโดยจุลินทรีย์ เป็นปฏิกริยาที่เกิดขึ้นโดยเอ็นไซม์ จึงมีความจำเพาะต่อกรดน้ำดีและเป็นปฏิกริยาที่มีขั้นตอนเดียว ดังนั้นโดยการคัดเลือกจุลินทรีย์และกรดน้ำดีตั้งต้นที่เหมาะสมจะสามารถผลิตกรดน้ำดีชนิดที่ต้องการได้ ในการศึกษาขั้นต้นถึงชนิดและปริมาณของกรดน้ำดีที่จุลินทรีย์ผลิตได้นี้จะต้องผ่านขั้นตอนการสกัดแยก การทำให้บริสุทธิ์รวมไปถึงการวิเคราะห์ทางเคมีของสารเหล่านั้นอีกด้วย

1.2 <u>การสกัดแยกและการทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์</u>

(Extraction and Purification of Bile Acids)

ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่า น้ำดีมีองค์ประกอบมากมาย ดังนั้นการตรวจหาชนิดและปริมาณของกรดน้ำดี ตลอดจนการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิคส์และชีววิทยาของกรดน้ำดีจะต้องอาศัยการสกัดแยกกรดน้ำดีออกจาก

สิ่งเจือปนชนิดอื่น (nonbile acid material) วิธีการสกัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์จะแตกต่างกันไปขึ้นกับแหล่งน้ำดี ข้อมูลของการศึกษาวิจัยที่มีผู้รายงานไว้พอสรุปได้ ดังนี้

1.2.1 <u>การสกัดแยกกรดน้ำดีจากของเหลวทางชีวภาพ</u> (15 - 20)

1.2.1.1 <u>การสกัดแยกกรดน้ำดีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์</u>

(Organic Solvent Extraction)

กรดน้ำดีซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีในกลุ่มของสเตียรอยด์และมีความสามารถในการละลายในน้ำต่ำ โดยทั่วไปจะเกิดในธรรมชาติในรูปของเกลือน้ำดีหรือกรดน้ำดีคอนจูเกตซึ่งช่วยให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น การสกัดแยกกรดน้ำดีออกจากตัวกลางที่เป็นน้ำทำโดยเปลี่ยนโครงสร้างของกรดน้ำดีคอนจูเกต ซึ่งละลายได้ในน้ำไปเป็นกรดน้ำดีอิสระซึ่งไม่ละลายน้ำ จากนั้นใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สกัดแยก ความยากง่ายของการสกัดแยกขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดน้ำดี จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลของกรดน้ำดี สถานะการแตกตัวของหมู่คาร์บอกซิล และองศาการรวมตัวระหว่างกรดน้ำดีกับโปรตีน ตัวอย่างการสกัดแยกที่ได้มีการศึกษามาแล้ว เช่น การสกัดแยกกรดโคลิกจากน้ำดีของวัว(7) เริ่มต้นด้วยการสกัดสารจำพวกไขมันออกด้วยเฮกเซนหรือเบนซิน จากนั้นนำมาไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายของโซเดียมไฮดรอกไซด์ รีฟลักซ์ เพื่อทำให้กรดน้ำดีคอนจูเกตเปลี่ยนรูปเป็นกรดน้ำดีอิสระแล้วนำมาเติมกรดจนกระทั่งสารละลายเป็นกลางกรดดีออกซีโคลิกจะปนอยู่กับกรดโคลิก การแยกกรดโคลิกจะทำโดยใช้คุณสมบัติของการละลายในน้ำร้อนของสารประกอบแมกนีเซียมโคเลท จากนั้นนำมาทำให้เป็นกรดโคลิกก็จะได้กรดโคลิกที่บริสุทธิ์ อีกตัวอย่างหนึ่งคือ การสกัดแยกกรดอูโซดีออกซีโคลิก ซึ่งได้จากการเปลี่ยนรูปของกรดลิโทโคลิกโดยเชื้อ <u>Fusarium equiseti</u> M41(16) เริ่มต้นด้วยการปรับสารละลายผลิตภัณฑ์ให้มีพีเอชเป็นกรดเพื่อยับยั้งการแตกตัวของกรดน้ำดีมีผลทำให้การสกัดแยกง่ายขึ้น (กรดน้ำดีอิสระจะมีค่าพีเคเอของการแตกตัวของหมู่คาร์บอกซิลประมาณ 5.8 กรดน้ำดีไกลซีนคอนจูเกตและทอรีนคอนจูเกตจะมีค่าพีเคเอเท่ากับ 4.3 และ 1.9 ตามลำดับ) แล้วสกัดแยกด้วยเอทธิลอซีเตท ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผู้นิยมใช้อีกชนิดหนึ่ง คือ

ไดเอทธิลอีเธอร์ (17)

1.2.1.2 <u>การสกัดแยกด้วยเรซิน</u> (Resin Extraction)

ปัจจุบันได้มีผู้นำเรซินที่เป็นกลางมาใช้ในการศึกษากรดน้ำดีโดยเฉพาะในขั้นตอนการสกัดแยก ตัวอย่างเช่น การใช้ Amberlite XAD-2(18) ในการสกัดแยกกรดน้ำดีจากปัสสาวะ พลาสมาและเนื้อเยื่อของตับ การสกัดแยกอาจทำได้โดยบรรจุเรซินในคอลัมน์หรือไม่ใช้คอลัมน์ก็ได้ ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถสกัดแยกกรดน้ำดีออกจากเนื้อเยื่อ ได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าวิธีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ แต่วิธีการเตรียมเรซินค่อนข้างยุ่งยากและให้ผลไม่ค่อยแน่นอนจึงไม่เป็นที่นิยมมากนัก เรซินอีกชนิดหนึ่งที่มีผู้ทดลองใช้คือ Amberlyst XN-1006 ซึ่งเป็นแอนไอออนเอกซ์เชนจ์เรซิน (anion exchange resin) (19) โดยใช้ในการสกัดกรดน้ำดีในเซรุ่มของคน โดยมากมักใช้ในการทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์ซึ่งเป็นขั้นตอนหลังจากการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

สำหรับการสกัดแยกกรดน้ำดีออกจากตัวอย่างที่มีปริมาตรน้อยหรือในงานที่ต้องการความรวดเร็ว ได้มีการทดลองใช้ Sep-pak C18 Cartridge (20) ซึ่งเป็นซิลิกาเจลที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีที่ผิวและบรรจุในภาชนะที่ทำด้วยพลาสติก พบว่าวิธีนี้ให้ประสิทธิภาพสูงและไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลายอินทรีย์

1.2.2 <u>การทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์</u> (21-28)

(Purification of Bile Acids)

มีวิธีการหลายวิธีที่ได้นำมาใช้ในการทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์รวบรวมไว้ดังนี้

1.2.2.1 <u>โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ</u>

(Adsorption Chromatography)

1.2.2.1.1 <u>คอลัมน์โครมาโตกราฟี</u> (21)

(Column Chromatography)

ตัวดูดซับ (adsorbent) ที่นิยมใช้คือ กรดซิลิซิก

(silicic acid) หรือ เรียกว่า ซิลิกาเจล (silica gel) และอลูมิเนียมออกไซด์ (aluminium oxide)

อลูมิเนียมออกไซด์นิยมใช้ในการทำให้กรดน้ำดีที่อยู่ในรูปเอสเตอร์มีความบริสุทธิ์ แต่ไม่เหมาะในการทำให้กรดน้ำดีคอนจูเกตบริสุทธิ์เพราะอลูมิเนียมออกไซด์สามารถทำปฏิกริยากับกรดน้ำดีโดยเฉพาะกรดน้ำดีคอนจูเกตได้ (10) วิธีแก้ทำได้โดยการเปลี่ยนรูปกรดน้ำดีให้อยู่ในรูปของเอสเตอร์และเลือกใช้อลูมิเนียมออกไซด์เกรดที่เฉื่อยต่อปฏิกริยามาก ๆ

สารดูดซับที่นิยมใช้ในการทำให้กรดน้ำดีอิสระและคอนจูเกตมีความบริสุทธิ์สูงอีกชนิดหนึ่งคือ กรดซิลิซิก กรดซิลิซิกเป็นสารเฉื่อยจึงไม่เกิดปฏิกริยาใด ๆ กับกรดน้ำดี และในการทำให้บริสุทธิ์ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนรูปผลิตภัณฑ์กรดน้ำดีอิสระที่แยกจากของเหลวทางชีวภาพ นับเป็นการลดขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์

1.2.2.1.2 <u>โครมาโตกราฟีแบบแก้ว-กระดาษ</u>(21)
(Glass-Paper Chromatography)

วิธีการนี้ใช้สำหรับสารละลายผลิตภัณฑ์น้ำดีที่มีปริมาตรน้อยไม่เหมาะที่จะนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตัวดูดซับที่ใช้คือกระดาษที่ชุ่มด้วยกรดซิลิซิก หรือ โปแตสเซียมฟอสเฟต เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมตัวดูดซับยุ่งยาก วิธีการนี้จึงไม่นิยมใช้

1.2.2.1.3 <u>โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง</u> (21-24)
(Thin-Layer Chromatography)

เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์ เรียกว่า เพรพพาเรทีฟทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Preparative Thin - Layer Chromatography) ระบบตัวทำละลายที่ใช้มีผู้ศึกษาไว้มากมาย วิธีการนี้เหมาะสำหรับใช้กับสารละลายผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณน้อย ๆ (22) นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีนี้เหมาะสมในการใช้แยกกรดโคลานิกที่มีการแทนที่ด้วยหมู่ฟังชันต่าง ๆ 3 หมู่ (trisubstituted cholanic acid) (21)

012851
i18284395

1.2.2.2 พาร์ติชันโครมาโตกราฟี (21)

(Partition Chromatography)

วิธีการนี้เหมาะสมสำหรับใช้ในการทำให้กรดน้ำดีที่มีหมู่คาร์บอนิลแยกออกจากกรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งเดียวกันซึ่งกรดน้ำดีทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถแยกออกจากกันโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (21) ตัวพยุง(support)ที่นิยมใช้ คือ ผงโพลีเอทธีลิน(polyethylene powder)(25) ซีไลท์ 545(Celite 545)(26) วิธีนี้มีความยุ่งยากในด้านการเตรียมคอลัมน์ที่จะใช้ในการทำให้บริสุทธิ์

1.2.2.3 เคาน์เตอร์ - เคอร์เรนท์ดิสทริบิวชัน (27)

(Counter-Current Distribution)

ได้มีการทดลองใช้วิธีการนี้ในการทำให้กรดน้ำดีที่สกัดจากน้ำดีวัวมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น วิธีการนี้เครื่องมือค่อนข้างจะยุ่งยากและสิ้นเปลืองเวลาจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ แต่ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาหรือสกัดแยกจะใช้ประโยชน์ในการแยกโดยวิธีอื่นต่อไป เช่น พาร์ติชันโครมาโตกราฟี

1.2.2.4 ไอออนเอกซเชนจ์โครมาโตกราฟี(28)

(Ion Exchange Chromatography)

เรซินที่ได้มีผู้นำมาใช้ คือ ดีอีเอพี-เซฟาเด็กซ์แอลเอช20 (DEAP-Sephadex LH20) เนื่องจากการจับกันระหว่างเรซินและกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ มีความแข็งแรงมาก จึงต้องใช้ระบบตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นสูงและปริมาณมากทำให้วิธีการนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์ถึงแม้ว่าจะสามารถแยกกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ ได้ดีก็ตาม

1.3 การตรวจวัดปริมาณของกรดน้ำดี

(Quantitative Determination of Bile Acids)

เมื่อทำการสกัดแยกกรดน้ำดี และทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์แล้วขั้นตอน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่อไปคือ การตรวจวัดปริมาณของกรดน้ำดี วิธีการตรวจวัดปริมาณของกรดน้ำดีบางวิธีอาจใช้บ่งบอกชนิดของกรดน้ำดีได้ด้วย วิธีการตรวจวัดปริมาณที่ได้มีผู้ศึกษาและทดลองมีหลายวิธีซึ่งสรุปและรวบรวมไว้ได้ดังนี้

1.3.1 <u>การตรวจหาโดยตรง</u> (Direct Determination)

เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณของกรดน้ำดีโดยอาศัยการทำปฏิกริยากับสารเคมีบางชนิดแล้วเกิดสารประกอบที่มีสี ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเลทหรือเรืองแสงได้ ตัวอย่างเช่น สารประกอบที่เกิดขึ้นเมื่อกรดน้ำดีทำปฏิกริยากับกรดซัลฟูริคที่ร้อนจะมีสีน้ำตาลและสามารถดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลทได้ โดยที่ช่วงคลื่นของการดูดกลืนแสงจะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดน้ำดี ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริค อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนเพื่อให้เกิดปฏิกริยา(21)นอกจากการใช้กรดซัลฟูริคความเข้มข้นต่างๆ ในการตรวจวัดปริมาณกรดน้ำดีแล้ว ยังอาจใช้กรดซัลฟูริคผสมกับกรดน้ำส้มในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 ซึ่งพบว่าจะมีช่วงคลื่นของการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกับเมื่อให้กรดน้ำดีทำปฏิกริยากับกรดซัลฟูริคเข้มข้น ในการตรวจวัดปริมาณของกรดน้ำดียังอาจใช้วิธีการตรวจวัดการเรืองแสง แต่มักจะใช้ได้ดีกับกรดน้ำดีบริสุทธิ์เท่านั้น เนื่องจากวิธีการนี้จะถูกรบกวนโดยสารเจือปนอื่นๆ ได้ง่าย ในปัจจุบันวิธีการวัดปริมาณกรดน้ำดีมุ่งสนใจต่อกรดน้ำดี 3 ชนิดคือ (21) กรดโคลิก กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดดีออกซีโคลิก วิธีการตรวจวัดปริมาณมักจะทำได้โดยใช้กรดซัลฟูริคร่วมกับสารเคมีชนิดอื่นเพื่อช่วยให้ปฏิกริยามีความจำเพาะต่อกรดน้ำดีแต่ละชนิดมากขึ้น ตัวอย่างเช่น กรดซัลฟูริคเข้มข้นและเฟอฟูราลดีไฮด์ ในการตรวจหาปริมาณของกรดโคลิกโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 620 นาโนเมตรสามารถใช้ตรวจหาปริมาณกรดโคลิกที่มีอยู่ในกรดน้ำดีที่ยังไม่ทำให้บริสุทธิ์ได้โดยตรง กรดคีโนดีออกซีโคลิกสามารถตรวจหาปริมาณได้โดยให้ทำปฏิกริยากับกรดซัลฟูริคเข้มข้น และอเซติกแอนไฮไดรด์ (acetic anhydride) วัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 615 นาโนเมตร กรดโคลิก และดีออกซีโคลิกจะไม่เกิดปฏิกริยากับสารเคมีนี้ แต่ไอโซเมอร์ของกรดคีโนดีออกซีโคลิกอาจมีผลไปรบกวนการหาปริมาณได้ กรดดีออกซีโคลิกซึ่งมีกรดโคลิกหรือคีโนดีออกซีโคลิกปนอยู่จะไม่สามารถตรวจหาโดย

วิธีนี้ได้

วิธีการตรวจหาโดยตรงดังกล่างข้างต้นไม่ค่อยเหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจหากรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ มากนักรวมทั้งไม่สามารถใช้ในการตรวจหาปริมาณกรดน้ำดีได้ด้วย ทั้งนี้เพราะปฏิกริยามีความจำเพาะต่อชนิดของกรดน้ำดีต่ำ อย่างไรก็ตามการตรวจหาโดยวิธีนี้จะใช้บ่งบอกจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลในกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ ได้

1.3.2 <u>การตรวจหาโดยวิธีโครมาโตกราฟี</u>

(Chromatography Determination)

วิธีนี้นอกจากเป็นการตรวจหากรดน้ำดีแล้วยังเป็นการแยกกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ ออกจากกันด้วย วิธีโครมาโตกราฟีที่เหมาะสมและใช้ในการตรวจหากรดน้ำดีมีมากมายหลายชนิด คือ

1.3.2.1 <u>วิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางและโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ</u>

(Thin-Layer Chromatography and Paper Chromatography)

กรดน้ำดีที่แยกจากกันโดยวิธีนี้สามารถตรวจหาปริมาณคร่าว ๆ ได้ โดยให้ทำปฏิกริยากับสารเคมีเกิดเป็นสารประกอบที่มีสีหรือดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตหรือเรืองแสงได้ เช่น ใช้กรดซัลฟูริคฉีดพ่นลงบนแผ่นโครมาโตแกรมกรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิกจะให้สีเขียว กรดโคลิกและกรดดีออกซีโคลิกจะให้สีเหลืองเป็นต้น (29) นอกจากนี้ยังอาจใช้สารเคมีอื่น ๆ เป็นต้นว่าสารละลายของกรดฟอสโฟโมลิบดิก (phosphomolybdic acid solution) (30) สารละลายของอนิซาลดีไฮด์ (anisaldehyde solution) (31) ข้อเสียของการตรวจโดยใช้สารเคมีเหล่านี้จะทำให้เกิดการทำลายตัวอย่าง ในกรณีที่ต้องการแยกสารตัวอย่างไว้เพื่อหาปริมาณและศึกษาคุณสมบัติต่อไป มักจะใช้กลุ่มของสารเคมีที่ทำให้เกิดเครื่องหมายชั่วคราวตัวอย่างเช่น น้ำ (31) สารละลายของไอโอดีนในอะซีโตน (32) ไอของ

ผลึกไอโอดีน (33) วิธีการตรวจหากรดน้ำดีดังกล่าวข้างต้นไม่เหมาะสมในการศึกษาและวิเคราะห์ปริมาณของกรดน้ำดีเพราะมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกินเวลานาน มีความไวและความถูกต้องในการวัดปริมาณต่ำ

1.3.2.2 <u>วิธีแกสโครมาโตกราฟี</u> (Gas Chromatography) เป็นการตรวจหาชนิดและปริมาณของกรดน้ำดีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน กรดน้ำดีที่จะนำมาตรวจหาโดยวิธีนี้จะต้องถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารประกอบที่กลายเป็นไอได้ง่าย ที่ได้มีผู้ศึกษาแล้วคือ กรดน้ำดีในรูปของเมทธิลเอสเตอร์ (methyl ester)(34) เมทธิลเอสเตอร์ไตรเมทธิลไซลิล (methyl ester trimethylsilyl, TMS)(18) ไตรฟลูออโรอเซทิล (trifluoroacetyl, TFA) เฮกซาฟลูออโรไอโสโพรพานิลเอสเตอร์กับไตรฟลูออโรอเซทิลเอสเตอร์ (hexafluoroiso-propanyl ester and trifluoroacetyl ester) (35,36) เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาชนิดของแกสที่ใช้เป็นตัวพา (carrier gas) ชนิดของเครื่องตรวจวัด (detector) ชนิดของตัวดูดซับ (adsorbent) ด้วย วิธีนี้สามารถใช้ตรวจวัดปริมาณกรดน้ำดีที่สกัดแยกโดยที่ยังไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์และสามารถตรวจวัดปริมาณกรดน้ำดีได้ต่ำถึง 0.04 พิโคโมล (picomol)(15) ข้อเสียของวิธีนี้คือ ในการเตรียมอนุพันธ์เพื่อตรวจวัดอาจจะเกิดสารประกอบที่ไม่ต้องการได้

1.3.2.3 <u>วิธีไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี</u> (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) เนื่องจากกรดน้ำดีในธรรมชาติมักอยู่ในรูปของคอนจูเกตของทอรีนและไกลซีนและอาจอยู่ในสภาวะอิสระบ้าง วิธีการตรวจหากรดน้ำดีโดยใช้เอชพีแอลซีทำได้ง่ายโดยการเลือกชนิดของคอลัมน์และระบบชะสาร เป็นวิธีที่ใช้อุณหภูมิต่ำ ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถทำการตรวจวัดปริมาณกรดน้ำดีได้โดยใช้คุณสมบัติการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลทในช่วงคลื่น 193-210 นาโนเมตร (37) ข้อเสียคือ กรดน้ำดีในรูปคอนจูเกตหรือรูปอิสระจะมีค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไว

โอเลทต่ำ อย่างไรก็ตามปัจจุบันสามารถเตรียมอนุพันธ์ของกรดน้ำดีซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นกว่าช่วงเดิม เช่น อนุพันธ์พาราโบรโมฟีนาซิล (P-bromophenacyl) เมตาเมทอกซีฟีนาซิล (m-methoxyphenacyl) เป็นต้น วิธีการนี้ถึงแม้ว่าจะสามารถแยกกรดน้ำดีที่มีโครงสร้างคล้ายกันได้แต่ไม่นิยมในการใช้ตรวจหากรดน้ำดีในของเหลวทางชีวภาพ เนื่องจากมีความไวต่ำและจะต้องทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์ก่อน

1.3.3 <u>การตรวจหาโดยใช้เอ็นไซม์</u> (Enzymatic Determination)

วิธีการนี้อาศัยความจำเพาะของเอ็นไซม์ในการตรวจหากรดน้ำดี เช่น ใช้เอ็นไซม์ 3 แอลฟาไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (3α-hydroxy-steroid dehydrogenase, 3α -HSD) (39) ซึ่งจะจำเพาะต่อสูตรโครงสร้างของกรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่3 และอยู่ในตำแหน่งแอลฟา (3α-hydroxy) ซึ่งตรวจวัดได้ง่ายโดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เนื่องจากความจำเพาะของเอ็นไซม์ทำให้สามารถใช้วิธีนี้ตรวจหากรดน้ำดีในของเหลวทางชีวภาพ แต่จะบ่งบอกเพียงกลุ่มของกรดน้ำดีเท่านั้น นอกจากนั้นจะต้องใช้เอ็นไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งมีราคาแพงและเตรียมยากจึงยังไม่เป็นที่นิยมใช้

1.3.4 <u>การตรวจหาโดยใช้เรดิโออิมมูโนเอสเส</u>

(Radioimmunoassay Determination)

เริ่มมีการใช้วิธีการนี้เป็นครั้งแรกโดย Simmonds และคณะในปี ค.ศ. 1973 (40) โดยใช้ตรวจวัดกรดน้ำดีในเซรุ่ม สารรังสีที่ใช้คือไอโอดีน - 125 วิธีการนี้เหมาะสำหรับตรวจวัดปริมาณของกรดน้ำดีซึ่งจะต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนในท้องตลาดปัจจุบันได้มีการจำหน่ายน้ำยาสำเร็จรูปเป็นชุดสำหรับใช้ตรวจกรดไกลโคโคลิกและกรดไกลโคดีโนดีออกซีโคลิกอย่างแพร่หลาย

นอกจากการใช้วิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสแล้วยังมีผู้ใช้ฟลูออโรอิมมูโนเอสเส (fluoroimmunoassay)(15) โดยให้กรดน้ำดีทำปฏิกริยากับสารเคมีที่สามารถให้การเรืองแสง (fluorescence) ตัวอย่างเช่น ฟลูออเรสซินไทโอคาร์บอมิล

เอทธีลีนไดอามีน (fluoresceinthiocarbamyl ethylenediamine)

วิธีการตรวจหาโดยใช้หลักการอิมมูโนเอสเสทั้งสองวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากในการเตรียมสารต่าง ๆ และสารเคมีที่ใช้มีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหากรดน้ำดีในงานตรวจหาประจำ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษากระบวนการแยก และทำให้บริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ได้จากการแปรรูปโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16
2. ศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาและวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก
3. ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย