บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์ สารเคมี และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์
   (Nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer): Bruker AVANCE 400
2. แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Mass spectrometer, MS): Finnigan LC-Q
3. อินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Infrared spectrophotometer, IR): Perkin-Elmer FT-IR
4. คอลัมน์ (Column)
5. แผ่นโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatograph, TLC): Merck
6. ตู้ตรวจวัดรังสีอัลตราไวโอเลต (UV detector)
7. เครื่องชั่ง 4 และ 5 ตำแหน่ง
8. ปั๊มลม (Pump)
9. ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
10. บีกเกอร์ (Beaker)
11. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
12. กรวยแยก (Separatory funnel)
13. หลอดทดลอง (Test tube)
14. ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
15. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
16. หลอดฉีดยา (Syringe)
17. เครื่องควบแน่น (Condenser)
18. เครื่องกวน (Stirrer)
19. ขวดแก้วขนาดเล็ก (Vial)
20. หลอดหยด (Dropper)
21. หลอดฉีดยาและเข็ม (Syringe and needle)
22. Aluminium foil
23. Eppendorf

3.1.2 **สารเคมี**

1. สารสกัดสตีวิโอไซด์
2. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane; CH_2Cl_2)
3. เมทานอล (Methanol; CH_3OH)
4. เอทิลอะซีเตต (Ethyl acetate; EtOAc)
5. เฮกเซน (Hexane; C_6H_{14})
6. เอทานอล (Ethanol; C_2H_5OH)
7. 4-เมทอกซีเบนซาลดีไฮด์ (4-methoxybenzaldehyde)
8. แอมโมเนียมโมลิปเดต (Ammonium molybdate; $(NH_4)_6MoO_4.4H_2O$)
9. แอมโมเนียม ซีเรียม ซัลเฟต (Ammonium cerium (IV) sulfate)
10. โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ (Sodium sulfate anhydrous; Na_2SO_4 anhydrous)
11. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl)
12. เตตระไฮโดรฟิวแรน (Tetrahydrofuran; THF)
13. ลิเทียมอะลูมิเนียมไฮไดรด์ (Lithium aluminium hydride; $LiAlH_4$)
14. เมทิลไอโอไดด์ (Methyliodide; MeI)
15. โพแทสเซียมคาร์บอเนต (Potassium carbonate; K_2CO_3)
16. กรดซัลฟุริก (Sulfuric acid; H_2SO_4)
17. ดิวเทอโรคลอโรฟอร์ม (Deuterochloroform; $CDCl_3$) (NMR solvent)
18. ดิวเทอโรเมทานอล (Deuteromethanol; CD_3OD) (NMR solvent)
19. ดิวเทอโรไพริดีน (Deuteropyridine; C_5D_5N) (NMR solvent)
20. Nitrogen gas 99.9999% (N_2 Tank)

3.1.3 **อาหารเพาะเชื้อ**

1. กลูโคส (Glucose)
2. เปปโทน (Peptone)
3. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
4. สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract)

3.1.4 **จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง**

Bacillus megaterium NRRL B-938

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 สังเคราะห์สารตั้งต้นและวิเคราะห์โครงสร้าง

นำสารสกัดสตีวิโอไซด์ (**1**) (7 กรัม) ละลายด้วย 20% สารละลายกรดซัลฟุริก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 ^{O}C กวนสารละลายผสมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นทำสารละลายผสมให้อุ่นที่อุณหภูมิ 35-40 ^{O}C สกัดด้วยเอทิลอะซีเตตปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และล้างส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซีเตตด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 นำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง แล้วนำสารผลิตภัณฑ์ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็น ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (98:2) ได้สารไอโซสตีวิออล (**3**) จำนวน 2.4 กรัม (96%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาโครงสร้างที่แน่นอนด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี (^{1}H-NMR spectroscopy) แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry) และเปรียบเทียบกับสารที่มีอยู่แล้ว

3.2.2 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารไอโซสตีวิออลโดยวิธีการทางเคมีและวิเคราะห์โครงสร้างของสาร ดังต่อไปนี้

3.2.2.1 สังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล

ละลายสาร **3** (2.2 กรัม) ในเตตระไฮโดรฟิวแรนจำนวน 5 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมโบโรไฮไดด์ จำนวน 850 มิลลิกรัม กวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำปริมาตร 15 มิลลิลิตร สกัดด้วยเอทิลอะซีเตตปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง และล้างส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซีเตตด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรอง แล้วนำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง แล้วนำสารผลิตภัณฑ์ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็น ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (97:3) ได้สาร **4** จำนวน 2.17 กรัม (98%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.2.2 สังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์

นำสาร **4** (2.1 กรัม) มาละลายด้วยอะซีโตนปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมคาร์บอเนตจำนวน 150 มิลลิกรัม กวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เติมเมทิลไอโอไดด์จำนวน 1.2 มิลลิลิตร กวนสารละลายผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมน้ำปริมาตร 15 มิลลิลิตร สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนปริมาตร 80 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง และล้างส่วนสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนด้วยน้ำ ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรอง

แล้วนำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง แล้วนำสารผลิตภัณฑ์ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็นไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (99:1) ได้สาร **18** จำนวน 1.8 กรัม (82%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.2.3 สังเคราะห์สารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19

ละลายสาร **18** (950 มิลลิกรัม) ในเตตระไฮโดรฟิวแรนจำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วเติมลิเทียมอะลูมิเนียมไฮไดรด์ จำนวน 920 กรัม นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายโซเดียมซัลเฟตลงไปปริมาตร 4 มิลลิลิตร กรอง นำส่วนสารละลายมาระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร ใช้ตัวชะไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (96:4) ได้สาร **19** จำนวน 800 มิลลิกรัม (81%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.3 ปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพ

3.2.3.1 การเตรียมเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938

3.2.3.1.1 การเตรียมเชื้อบนอาหารแข็ง

นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ที่ได้จากแหล่งเก็บเชื้อ Northern Regional Research Laboratory (NRRL) มลรัฐอิลลินอยด์ ประเทศสหรัฐอเมริกา ถ่ายลงในอาหารเพาะเชื้อแข็ง (Nutrient Agar; NA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเตรียมเชื้อในรูปของเซลล์แขวนลอยให้ได้ความเข้มข้น 10^8 ต่อมิลลิลิตร

3.2.3.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ในอาหารเหลว

นำเซลล์แขวนลอยที่เตรียมไว้ข้างต้นมา 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว (ภาคผนวก ก) ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง

3.2.3.2 การเติมสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์

ชั่งสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (**18**) จำนวน 400 มิลลิกรัม แล้วนำไปละลายด้วยตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร และ Tween 80 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กวนจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ปิเปตต์

สารละลายของสารตั้งต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 10 มิลลิกรัมต่อ 1 ฟลาสก์) ลงในฟลาสก์ที่มีเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 เจริญอยู่ (จากข้อ 3.2.3.1.2) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าต่อ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 ^{O}C) เป็นเวลา 7 วัน

3.2.3.3 การวิเคราะห์หาสารเมแทบอไลท์ในข้อ 3.2.3.2

เก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากข้อ 3.2.3.2 มาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย แล้วนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร ใช้ตัวชะเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต (20:60) ได้สาร **20** จำนวน 7.5 มิลลิกรัม (2.8%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

3.2.3.4 การเติมสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19

ชั่งสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (**19**) จำนวน 400 มิลลิกรัม แล้วนำไปละลายด้วยตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร และ Tween 80 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร คนจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ปิเปตต์สารละลายของสารตั้งต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 10 มิลลิกรัมต่อ 1 ฟลาสก์) ลงในฟลาสก์ที่มีเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 เจริญอยู่ (จากข้อ 3.2.3.1.2) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าต่อ ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 ^{O}C) เป็นเวลา 7 วัน

3.2.3.5 การวิเคราะห์หาสารเมแทบอไลท์ในข้อ 3.2.3.4

เก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากข้อ 3.2.3.4 มาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย แล้วนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร ใช้ตัวชะเฮกเซน-เอทิลอะซีเตต (20:65) ได้สาร **21** จำนวน 2.6 มิลลิกรัม (1.1%) สาร **22** จำนวน 7.0 มิลลิกรัม (2.8%) และสาร **23** จำนวน 3.5 มิลลิกรัม (1.3%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปหาโครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี