

บทที่ 5

อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

5.1 การสังเคราะห์สารตั้งต้น

สารสกัดสตีวิโอไซด์ (1) นำมาทำปฏิกิริยากับ 20% สารละลายกรดซัลฟูริก ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 °C แล้วนำสารผลิตภัณฑ์มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็นสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ได้สารไอโซสตีวียอล (3) (96%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาโครงสร้างที่แน่นอนด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าสอดคล้องกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

5.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารไอโซสตีวียอลโดยวิธีการทางเคมี

5.2.1 การสังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอล

สารไอโซสตีวียอล (3) นำมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยการทำปฏิกิริยารีดักชันด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรนได้สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอล (4, 98%) ที่ถูกรีดิวซ์ที่ตำแหน่ง 16 จากหมู่ฟังก์ชันคีโตนเป็นแอลกอฮอล์ สารที่สังเคราะห์ได้มีสภาพความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้นและมีการพิสูจน์โครงสร้างพบว่าสอดคล้องกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

5.2.2 การสังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเตอร์

สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอล (4) ที่ได้จากปฏิกิริยารีดักชันนำมาทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันด้วยเมทิลไอโอไดด์และสารโพแทสเซียมคาร์บอเนตในตัวทำละลายอะซีโตน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร สารที่สังเคราะห์ได้มีสภาพความมีขั้วต่ำกว่าสารตั้งต้นจากการพิสูจน์โครงสร้างสารโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบว่ามีการเมทิลเลตเข้าที่ตำแหน่ง 19 ได้สารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเตอร์ (18, 82%) และสอดคล้องกับสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

5.2.3 การสังเคราะห์สารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19

นำสาร 18 มาทำปฏิกิริยารีดักชันด้วยลิเทียมอะลูมิเนียมไฮไดรด์ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรน แล้วนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวชะเป็นสารละลาย

ผสมของเฮกเซนและเอทิลอะซีเตต สารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีสภาพความมีขี้วมมากกว่าสารตั้งต้น จากการพิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีพบว่าที่ตำแหน่ง 19 ถูกรีดิวส์จากเอสเทอร์เป็นแอลกอฮอล์ได้สารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19, 81%)

5.3 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการปรับเปลี่ยนทางชีวภาพคือ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ที่ได้จากแหล่งเก็บเชื้อ Northern Regional Research Laboratory (NRRL) มลรัฐอินดีแอนา ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารตั้งต้นสองชนิดที่ถูกนำมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพคือ ไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์ (18) และสารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19)

5.3.1 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์

นำสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์ (18) มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดย *Bacillus megaterium* NRRL B-938 พบว่าเกิดเมแทบอลไลท์ 20 (2.8%) ที่เกิดไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ที่ตำแหน่งที่ 7 จากการพิสูจน์โครงสร้างทางเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือ ไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเทอร์ (18) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 7 มีการเลื่อนของสัญญาณโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.29 ppm และแสดงค่าสัญญาณเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียง (coupling) เป็นลักษณะ doublet of doublet มีค่าการคู่ควบ (coupling constant) เท่ากับ 11.9 และ 4.0 Hz ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงการขึ้นของโปรตอนตำแหน่งที่ 7 จากข้อมูลความสัมพันธ์ (correlation) ของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 7 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนตำแหน่งที่ C-5 C-6 C-9 C-14 และ C-15 จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมตรีสามารถยืนยันโครงสร้างของสารเมแทบอลไลท์ 20 ได้ คือ 7 α -dihydroisosteviol methyl ester

5.3.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยสารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19

สารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19) นำมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดย *Bacillus megaterium* NRRL B-938 พบว่าเกิดเมแทบอลไลท์ 21 (1.1%) เมแทบอลไลท์ 22

(2.8%) และเมแทบอลิท์ 23 (1.3%) ตามลำดับความถี่จากน้อยไปมาก สารหลักที่มีปริมาณมากที่สุดคือ เมแทบอลิท์ 22

5.3.2.1 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารเมแทบอลิท์ 21

สารเมแทบอลิท์ 21 ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร 19 นั้นเป็นสารเมแทบอลิท์ที่มีความถี่ต่ำที่สุด จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีพบว่าสารเมแทบอลิท์ 21 เกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือสารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 6 มีการเลื่อนของสัญญาณโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.51 ppm และแสดงค่าสัญญาณเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียงเป็นลักษณะ broad singlet มีค่า $W_{1/2}$ (Band width at half height) เท่ากับ 8.5 Hz แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งการขึ้นของโปรตอนตรงตำแหน่งที่ 6 (แบบเบต้า) จากข้อมูลความสอดคล้องกันของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 6 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-5 และ C-7 จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมทรี สามารถยืนยันโครงสร้างของสารเมแทบอลิท์ 21 ได้

5.3.2.2 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารเมแทบอลิท์ 22

สารเมแทบอลิท์ 22 ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร 19 นั้นเป็นสารเมแทบอลิท์ที่มีปริมาณมากที่สุด ซึ่งมากกว่าสารเมแทบอลิท์ที่ 21 และ 23 จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีพบว่าสารเมแทบอลิท์ 22 เกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือสารแอลกอฮอล์แอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 7 มีการเลื่อนของสัญญาณโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.12 ppm และแสดงค่าสัญญาณเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียง (coupling) เป็นลักษณะ broad singlet โดยมีลักษณะของสัญญาณต่างจาก สารเมแทบอลิท์ 20 ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 7 เช่นกัน ดังนั้นแสดงให้เห็นถึงการขึ้นของโปรตอนตำแหน่งที่ 7 จากข้อมูลความสอดคล้องกันของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 7 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-5 C-8 และ C-9 จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมทรี สามารถยืนยันโครงสร้างของสารเมแทบอลิท์ 22 ได้

5.3.2.3 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารเมแทบอลิท์ 23

สารเมแทบอลิท์ 23 เป็นสารเมแทบอลิท์ที่มีความซับซ้อนมากที่สุด จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าสารเมแทบอลิท์ 23 เกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือสารแอลกอฮอล์แอนาล็อกที่ตำแหน่ง 19 (19) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 1 มีการเลื่อนของสัญญาณโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.25 ppm และแสดงค่าสัญญาณเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียงเป็นลักษณะ broad doublet มีค่าการคู่ควบเท่ากับ 5.5 Hz จากข้อมูลความสัมพันธ์ของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 1 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนตำแหน่งที่ C-2 C-3 C-9 และ C-20 จากค่าของแรงคู่ควบแสดงถึงการชี้ขึ้นของโปรตอนตำแหน่งที่ 1 (แบบอัลฟา) และเกิดไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 7 พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 7 มีการเลื่อนของสัญญาณโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.31 ppm และแสดงค่าสัญญาณเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียงเป็นลักษณะ broad singlet มีค่า $W_{1/2}$ (Band width at half height) เท่ากับ 6.8 Hz แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งการชี้ลงของโปรตอนตรงตำแหน่งที่ 7 (แบบแอลฟา) จากข้อมูลความสัมพันธ์ของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนตำแหน่งที่ 7 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนตำแหน่งที่ C-5 C-6 C-9 C-14 และ C-15 จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี และแมสสเปกโตรเมตรี สามารถยืนยันโครงสร้างของสารเมแทบอลิท์ 23 ได้

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถสังเคราะห์สารตั้งต้นในการนำมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพได้เป็นสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเตอร์ (18) และสารแอลกอฮอล์แอนาล็อกที่ตำแหน่ง 19 (19)
2. สามารถทำการปรับเปลี่ยนสารไดไฮโดรไอโซสตีวียอลเมทิลเอสเตอร์ (18) โดยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ได้สารเมแทบอลิท์ 20 ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 7 และได้มีการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเรียบร้อยแล้ว
3. สามารถทำการปรับเปลี่ยนสารแอลกอฮอล์แอนาล็อกที่ตำแหน่ง 19 (19) โดยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้เชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ได้สารเมแทบอลิท์ 21 - 23 ที่เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งต่างๆ โดยสารเมแทบอลิท์ 21 มีการไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 6 สารเมแทบอลิท์ 22

มีการไฮดรอกซิเลตที่ตำแหน่งที่ 7 และสารเมแทบอลิท์ 23 มีการไฮดรอกซิเลต 2 ตำแหน่งคือตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 7 ซึ่งสารเมแทบอลิท์ที่ได้ทั้งสามชนิดได้มีการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีเรียบร้อยแล้ว สารเมแทบอลิท์ทั้งสามชนิดเป็นสารที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

4. ได้ทราบข้อมูลว่าเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารในตำแหน่งที่เกิดได้ยากหรือไม่สามารถเกิดได้โดยวิธีการทางเคมีคือการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งของเมทิลลีนคาร์บอน (CH_2) ของโครงสร้างสารประกอบ
5. ได้สารเมแทบอลิท์แอนาล็อกใหม่เกิดขึ้นเพื่อนำไปสู่การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นเดิมหรือทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ ต่อไป