

รายงานการวิจัย

การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์โดยวิธีทางชีวภาพ
Functional Group Modification of Steroid by Biotransformation

ผู้วิจัย

นางสาวพัชณี เจริญยิ่ง

ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณปี 2554 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการวิจัย และให้ความรู้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย คุณณัฐกร อ่อนแสง คุณพละวัฒน์ อุ่นเรือน และคุณวิริยะพงศ์ ช้างอินทร์ ที่อดทนต่อการทำงานนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเพื่อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้

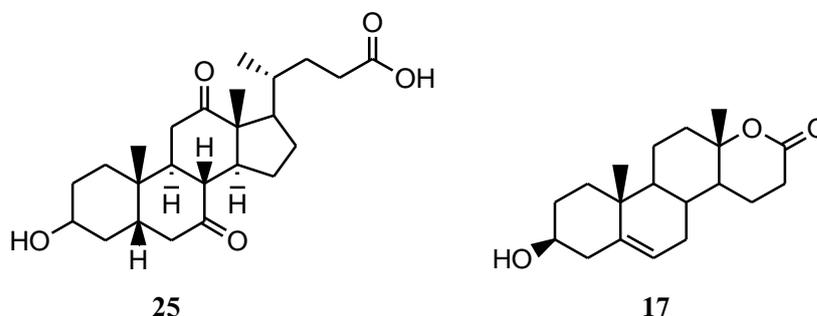
พัชณี เจริญยิ่ง

ชื่อโครงการ การปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์โดยวิธีทางชีวภาพ
Functional Group Modification of Steroid by Biotransformation

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ		
ประจำปีงบประมาณ	2554	จำนวนเงิน	300,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี	ตั้งแต่	ตุลาคม 2553-กันยายน 2554
ผู้ดำเนินการวิจัย	ผศ.ดร. พชณี เจริญยิ่ง		
หน่วยงาน	สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โทรศัพท์ 0 2329 8400-11 ต่อ 6241		

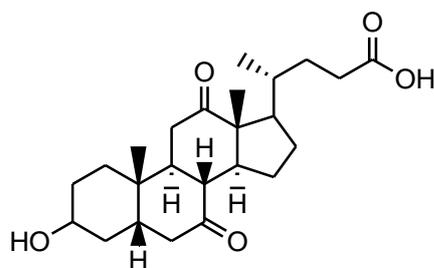
บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ เพรกนินโนโลน **1** และ กรดดีไฮโดรโคลิค **14** ด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biotransformation) โดยใช้เชื้อรา *Fusarium solani* TISTR 3436 และ *Chaetomium globosum* TISTR 3039 เป็นตัวเร่งชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า กรดดีไฮโดรโคลิค **14** เกิดปฏิกิริยารีดักชันแบบเฉพาะเจาะจงที่หมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ถูกเปลี่ยนเป็น 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** โดยเอนไซม์จากเชื้อรา *Fusarium solani* TISTR 3436 ส่วนเพรกนินโนโลน **1** ถูกเปลี่ยนเป็น 3 β -hydroxy-17 α -oxa-D-homo-androst-5-en-17-one **17** โดยเอนไซม์จากเชื้อรา *Chaetomium globosum* TISTR 3039 ในปริมาณที่ต่ำ

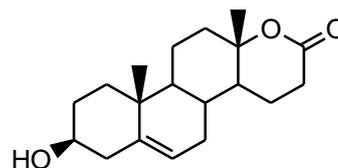


Abstract

The objective of this research was to investigate the functional group modification of steroid compounds: pregnenolone **1** and dehydrocholic acid **14** by biotransformation using *Fusarium solani* TISTR 3436 and *Chaetomium globosum* TISTR 3039 strain as biocatalysts. The results found that dehydrocholic acid **14** was converted to 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** by enzyme from *Fusarium solani* TISTR 3436. This mold showed different affinities for the substrate and selectivities of attack in particular regio- and stereoselectively reduced the 3- keto group. The pregnenolone **1** was transformed by enzyme from *Chaetomium globosum* TISTR 3039 to 3 β -hydroxy-17 α -oxa-D-homo-androst-5-en-17-one **17** in low yield.



25



17

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อภาษาไทย.....	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญรูป.....	VII
รายการคำย่อ.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 ตัวเร่งชีวภาพ (Biocatalyst).....	4
1.3 ชนิดของกระบวนการเปลี่ยนแปลงโดยใช้จุลินทรีย์.....	4
1.4 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยใช้จุลินทรีย์ของสตีเวีย.....	4
1.5 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	11
1.6 ขอบเขตของงานวิจัย.....	11
1.7 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	11
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	13
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	14
2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	14
2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	14
2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	14
2.4 เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง.....	15
2.5 การทดลองทั่วไป.....	17
2.6 ขั้นตอนการวิจัย.....	17
2.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method.....	22
2.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์โดยวิธี MTT assay.....	22
บทที่ 3 อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	24
3.1 การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเพรกนิน โนโลน 1 และกรดดีไฮโดร โคลิก 14 ด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biotransformation).....	24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.1 ผลของอาหารเหลว PDB ต่อเพรกนิน โนโลน 1 และกรดดีไฮโดรโคลิค 14.....	28
3.1.2 ผลของอาหารเหลวสูตร 3% Glucose : 1% Peptone ต่อเพรกนิน โนโลน 1 และกรดดีไฮโดรโคลิค 14.....	30
3.1.3 ปฏิกริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคลิค 14 และเอนไซม์จากเชื้อรา <i>F. solani</i> TISTR 3436.....	31
3.1.4 ปฏิกริยาระหว่างเพรกนิน โนโลน 1 และเอนไซม์จากเชื้อรา <i>F. solani</i> TISTR 3436.....	37
3.1.5 ปฏิกริยาระหว่างกรดไฮโดรโคลิค 14 และเอนไซม์จากเชื้อรา <i>C. globosum</i> TISTR 3093.....	39
3.1.6 ปฏิกริยาระหว่างเพรกนิน โนโลน 1 และเอนไซม์จากเชื้อรา <i>C. globosum</i> TISTR 3093.....	39
3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	44
3.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโต ของต้นกล้าพืชทดสอบ.....	44
3.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์.....	45
3.2.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	46
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	47
4.1 ผลของการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเพรกนิน โนโลน 1 และกรดดีไฮโดรโคลิค 14 ด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biotransformation).....	47
4.2 ผลการทดสอบทางชีวภาพ	
4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโต ของต้นกล้าพืชทดสอบ.....	48
4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์.....	48
4.2.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	48
4.3 ข้อเสนอแนะ.....	49
บรรณานุกรม.....	50
ภาคผนวก.....	53

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 แสดงเอนไซม์บางชนิดที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์.....	5
3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสาร 25	
เปรียบเทียบกับกรดดีไฮโดร โคลิก 14.....	46

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงตำแหน่งคาร์บอนของสเตียรอยด์ที่เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยใช้จุลินทรีย์.....	8
2.1 เชื้อรา <i>Chaetomium globosum</i> TISTR 3093.....	16
2.2 เชื้อรา <i>Fusarium solani</i> TISTR 3436.....	16
2.3 การนับจำนวนสปอร์แขวนลอยด้วยเครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์.....	19
3.1 สเปกตรัม ^1H NMR ของเพรกนิน โนโลน 1.....	25
3.2 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของเพรกนิน โนโลน 1.....	26
3.3 สเปกตรัม ^1H NMR ของกรดดีไฮโดรโคคลิก 14.....	27
3.4 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของกรดดีไฮโดรโคคลิก 14.....	28
3.5 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของเพรกนิน โนโลน 1 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ.....	29
3.6 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ.....	30
3.7 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 และเชื้อรา <i>F. solani</i> TISTR 3436 ในอาหารเหลวสูตร 3% glucose : 1% peptone วันที่ 7.....	31
3.8 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 และเชื้อรา <i>F. solani</i> TISTR 3436 ในอาหารเหลว PDB วันที่ 7.....	31
3.9 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ.....	32
3.10 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 3-Hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid 25.....	34
3.11 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ 3-Hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid 25.....	34
3.12 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 3 β -Hydroxypregn-5-en-20-ol 27.....	38
3.13 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ 3 β -Hydroxypregn-5-en-20-ol 27.....	38
3.14 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ.....	39
3.15 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของเพรกนิน โนโลน 1 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ.....	40
3.16 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างเพรกนิน โนโลน 1 กับ <i>C. globosum</i> TISTR 3093.....	42
3.17 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างเพรกนิน โนโลน 1 กับ <i>C. globosum</i> TISTR 3093.....	42

รายการคำย่อ

^{13}C NMR	^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
DMRT	Duncan's Multiple Rang Test
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
^1H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
IC ₅₀	Inhibition Concentration at 50%
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen phosphate
ppm	part per million
R _f	Retention factor
rt	room temperature
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TLC	Thin Layer Chromatography
TMS	Tetramethylsilane

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

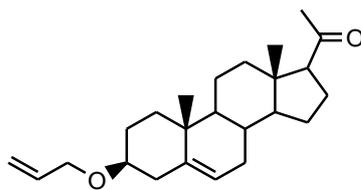
สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำนวนมากถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และมนุษย์ ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน เพราะว่าสารเหล่านี้มีสมบัติที่ดีทั้งทางเคมีและชีวภาพและปลอดภัยมากกว่าสารสังเคราะห์ ต่อมานักวิทยาศาสตร์สนใจนำสารเหล่านี้มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยปฏิกิริยาเคมี ซึ่งการปรับเปลี่ยนในที่นี้หมายถึง การปรับเปลี่ยน โครงสร้างทางเคมีซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและชีวภาพของสารที่ดีมากยิ่งขึ้น ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษเกี่ยวกับสมบัติทางชีวภาพของสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์ รวมทั้งอนุพันธ์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านั้น

สเตียรอยด์เป็นกลุ่มของสารประกอบที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ มีกระบวนการชีวสังเคราะห์ที่คล้ายคลึงกัน สารเหล่านี้มีความสำคัญทางชีวภาพส่วนใหญ่มักจะกล่าวถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ปัจจุบันจึงนิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์โดยการพัฒนาในรูปของสารสังเคราะห์ เช่น ได้มีการนำยาในกลุ่ม Antiandrogen มาใช้รักษาภาวะ Hyperandrogenism สเตียรอยด์ในกลุ่ม Cardiac steroid สามารถใช้ในการรักษาโรค congestive heart failure สเตียรอยด์ ออกซิมี อิเทอร์ มีฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์เนื้องอกของมนุษย์[1] Thioxosteroids, Mercaptospirothiones และ Thiaphosphole steroid มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัส[2] สเตียรอยด์ยังมีฤทธิ์ที่สำคัญอื่นๆ ในร่างกายของคนอีกเช่น เป็น vitamin D precursor, emulsifying agent เช่น Cholesterol มี diuretic activity เช่น Spironolactone, fat emulsifier เช่น Dehydrocholic acid และเป็นยาปฏิชีวนะ เช่น fusidic acid[3] สเตียรอยด์ที่ได้จากพืชที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค เช่น G-strophanthin ได้จากเมล็ด *Strophanthus qratius* Baillon ใช้รักษาโรคหัวใจวายเฉียบพลัน Ruscogenin ได้จากต้น *Ruscus aculeatus* วงศ์ Liliaceae ใช้รักษาโรคโรคตีดวงทวารและ Scillaren A ได้จากส่วนใบบนหัวใต้ดินของ *Urginea maritima* Baker วงศ์ Liliaceae ใช้เป็นยาขับเสมหะ [2] สเตียรอยด์ที่พบในสัตว์มีปริมาณค่อนข้างน้อยจึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งสำคัญของสารดังกล่าวได้ สารกลุ่มสเตียรอยด์ยังเป็นฮอร์โมนในสัตว์และพืช ฮอร์โมนในสัตว์ เช่น กลุ่มฮอร์โมนเพศหญิง (Female sex hormones) เช่น Estrogen (estradiol, estrone และ estriol) กลุ่ม Progestational hormones เช่น Progesterone และกลุ่มฮอร์โมนเพศชาย (Male sex hormones) หรือ androgen เช่น Testosterone และ Androsterone นอกจากนี้สารกลุ่มสเตียรอยด์ยังมีฤทธิ์ในการเร่งการเจริญเติบโตของพืช เช่น Brassinosteroids เป็นฮอร์โมนพืชที่สามารถเร่งการเจริญเติบโตของพืช สเตียรอยด์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น Brassinolide และ Castasterone [4] หรือในแง่การยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืช

Chung และคณะ[5] ได้แยก Stigmastane ชนิดใหม่จากเปลือกข้าว เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สามารถยับยั้งการงอกของ เมล็ด Radish ได้ Macias และคณะ[6] ได้สกัดแยก peroxide และ 7-oxo stigmasterol พบว่าสเตียรอยด์ทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการงอกของหญ้าข้าวนกได้ ข้อจำกัดของสเตียรอยด์ที่พบในธรรมชาติที่พืชและสัตว์สังเคราะห์ขึ้นมา นั่นคือมีปริมาณน้อยแต่ถ้ามีการนำมาใช้ในทางการแพทย์ หรือใช้เป็นตัวยามากขึ้น การสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันและหรือการเพิ่มหมู่แทนที่บนโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ทำให้คุณสมบัติและการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสิ่งมีชีวิตเปลี่ยนแปลงสารกลุ่มนี้จึงเป็นที่สนใจกับนักวิจัยเป็นอย่างมาก นอกจากนี้พบว่าสเตียรอยด์เป็นสารที่มีอยู่ในธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารเคมีที่ใช้ในปัจจุบัน เพื่อเป็นการต่อยอดงานวิจัยให้ดีและมีคุณภาพ จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีความสนใจที่จะปรับปรุงโครงสร้างของสเตียรอยด์ โดยจะมีการนำเทคนิคเฉพาะในการสังเคราะห์ เพื่อให้เกิดความหลากหลายของชนิดสเตียรอยด์สังเคราะห์มากยิ่งขึ้น และนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยสนใจทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อศึกษาถึง Structure-activity relationship (SAR) และนำมาเปรียบเทียบผลของถึงฤทธิ์ทางชีวภาพว่ามีคุณสมบัติดีขึ้นหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง จากงานวิจัยเบื้องต้นของผู้วิจัยได้ทำการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์โดยวิธีทางเคมีของ Pregnenolone **1** ที่คาร์บอนตำแหน่ง C-20 เป็นอนุพันธ์ออกซิมีน **2** เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติพบว่า สาร **2** สามารถยับยั้งเซลล์พิษ (Cytotoxic) และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 12.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

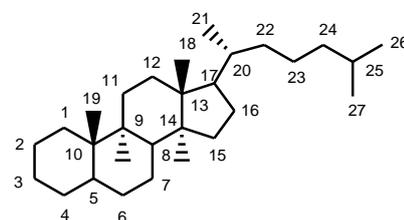
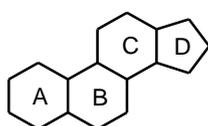


เมื่อทำการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 ให้เป็นหมู่แอลลิล อีเทอร์ และนำสเตียรอยด์ **3** ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของผักกวางตุ้ง พบว่าสเตียรอยด์ **3** ที่ระดับความเข้มข้น 400 ppm สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกวางตุ้ง 22 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกสาเหตุของโรคคอติบ *Corynebacterium diphtheriae* มีค่า MIC เท่ากับ 3.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร[7]



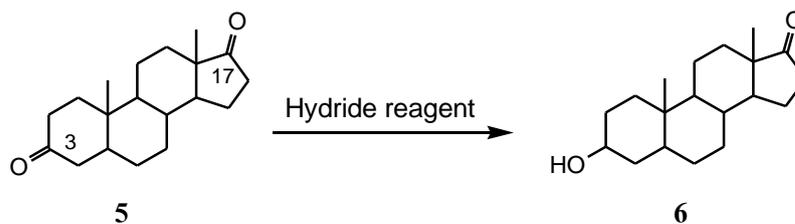
3

สเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่เป็นของแข็งจัดเป็นอนุพันธ์ของสารที่มีโครงสร้างเป็นวงที่เรียกว่า Perhydrocyclopentanephenanthrene ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยม 3 วง คือ วง A วง B วง C และมีวงห้าเหลี่ยม 1 วง คือ วง D ที่เชื่อมต่อกัน ซึ่งในระบบ IUPAC กำหนดการนับตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมของสเตียรอยด์ ดังตัวอย่างเช่น Cholestane 4

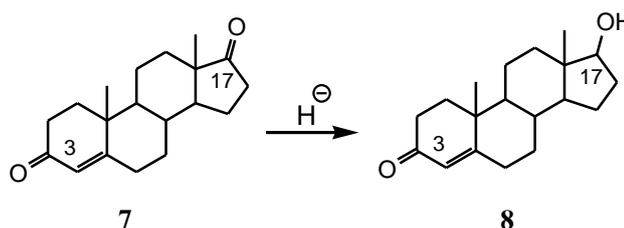


4

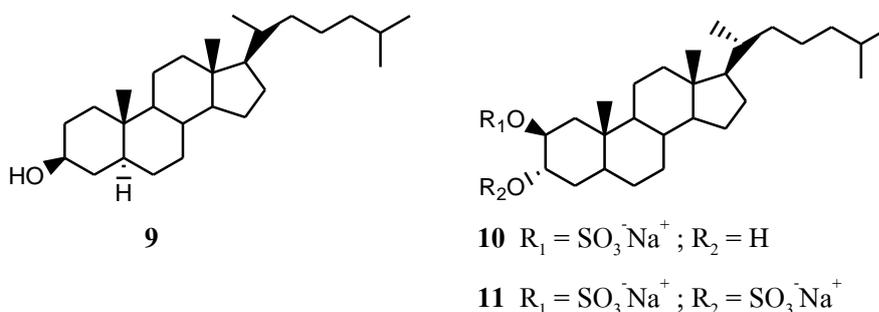
จากโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมและห้าเหลี่ยมมาเชื่อมต่อกัน หมู่แทนที่ต่างๆ ที่มาเกาะหรือหมู่ฟังก์ชันจะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน นักเคมีได้ใช้ปฏิกิริยาเฉพาะทางเคมีอินทรีย์ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและ/หรือหมู่ฟังก์ชันซึ่งจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะเป็นการนำไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ได้ โดยการเลือกใช้สารที่เข้าทำปฏิกิริยา (reagent) และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม รวมทั้งชนิด จำนวน ตำแหน่งและสเตอริโอเคมีของหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้างก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการสังเคราะห์ซึ่งจะเป็นผลคืออย่างมาก ถ้าพบว่าสเตียรอยด์สังเคราะห์นั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไปด้วย จากรายงานการวิจัยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างมักมุ่งเน้นไปที่หมู่ฟังก์ชันเป็นส่วนใหญ่ ที่ ring A และ ring B หรือหมู่ฟังก์ชันที่สายโซ่ด้านข้าง การเกิดปฏิกิริยาของหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างของสเตียรอยด์จะขึ้นกับตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน เรียงลำดับความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา คือ 3 11 17 และ 20 ตัวอย่างเช่น การเข้าทำปฏิกิริยาของนิวคลีโอไฟล์ที่หมู่คาร์บอนิล การเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยไฮโดรไรด์ไอออน การเกิดคีทาล (ketal formation) และปฏิกิริยาการเพิ่มโดยกรีนยาร์ดรีเอเจนต์ สามารถเรียงลำดับตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาได้คือ $3 > 17 \geq 20 > 11$ [3] ตัวอย่างความเฉพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 5 α -androstane-3,17-dione 5 เป็น 3-hydroxy-5 α -androstane-17-one 6 แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งที่ C-3 สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าตำแหน่งที่ C-17



ถ้ามีความไม่อิ่มตัวของโครงสร้างในลักษณะ α,β -unsaturation จะลดความสามารถในการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน แต่ไม่รวมถึงการเกิดคีทาล (ketal) เช่นการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ androst-4-ene-3, 17-dione 7 ที่ตำแหน่งที่ C-17 ให้ Testosterone 8



Santos และคณะ[8] ได้ศึกษาการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและฤทธิ์ทางชีวภาพของสเตียรอยด์ โดยทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์ซัลเฟตจาก 3β -hydroxy-5 α -cholestane 9 พบว่า sodium $2\beta,3\alpha$ -dihydroxy-5 α -cholestane-2-sulfate 10 และ disodium $2\beta,3\alpha$ -dihydroxy-5 α -cholestane disulfate 11 มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ herpes simplex virus type 2 (HSV-2) และสาร 11 ยังมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อไวรัสชนิด Dengue virus type (DEN-2) และ Junin virus (JV)



1.2 ตัวเร่งชีวภาพ (Biocatalyst)[9]

การใช้ตัวเร่งทางชีวภาพในการเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ได้มาจากธรรมชาติ ไม่ได้เป็นวิธีการใหม่ เพราะได้มีการใช้กันมามากกว่าร้อยปีแล้ว โดยได้มีการใช้ทั้งเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์อยู่ข้างใน (Whole cells หรือ Microbes) หรือเอนไซม์ที่ทำการแยกออกมา (Isolated enzymes) โดยตัวเร่งชีวภาพแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. เอนไซม์ (Isolated enzyme)
2. เซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์อยู่ข้างใน (Whole cells หรือ Microbes)

3. แอปไซม์ (Abzymes หรือ Catalytic antibodies)

การเลือกใช้ตัวเร่งชีวภาพ (Biocatalyst) ชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง โดยปกติเอนไซม์ที่ถูกแยกออกมา (Isolated enzymes) จะมีราคาแพง แต่ให้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่สูง ในขณะที่เซลล์ของจุลินทรีย์ (Whole cells) มีราคาถูกและจัดการควบคุมง่าย แต่ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้น ส่วนใหญ่แล้วจะถูกนำมาใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ตารางที่ 2.1 สรุปชนิดของเอนไซม์ที่สำคัญและชนิดของปฏิกิริยาที่เอนไซม์เหล่านั้นทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ตารางที่ 1.1 แสดงเอนไซม์บางชนิดที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์

Enzyme Class	Number Classified	Number Available	Reaction Type	%Used in Research
Oxidoreductases	~ 650	90	Oxidation/Reduction(redox)	25
Transferases	~720	90	Functional Group Transfer (Me, Phosphoryl, Ac, etc)	5
Hydrolases	~640	125	Hydrolysis/Synthesis (esters, amides, nitriles, epoxide, etc)	65
Lyases	~260	35	Addition/Elimination	5
Isomerases	~120	6	Racemization/Epimerization	1
Ligases	~80	5	Bond formation/Cleavage (C-O, C-S, C-N, C-C bonds)	1

1.3 ชนิดของกระบวนการเปลี่ยนแปลงโดยใช้จุลินทรีย์

กระบวนการเปลี่ยนแปลงโดยใช้จุลินทรีย์ของสารประกอบทางเคมี สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท

1. การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยใช้การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยตรง

(Biosynthetically directed biotransformations)

2. การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพแบบซีโนไบโอติก (Xenobiotic biotransformation) การสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยใช้การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยตรง จะเกิดขึ้นตอนการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นที่ต่อเนื่องกันซึ่งทำให้เกิดโครงสร้างโมเลกุลที่มีความคล้ายคลึงกับอินเทอร์มีเดียตที่ได้จากการสังเคราะห์ทางชีวภาพของสารที่จุลินทรีย์สร้าง ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพแบบซีโนไบโอติก เกิดจากการใช้สารตั้งต้นซึ่งจุลินทรีย์ทำให้เกิดการเปลี่ยนไปอย่างสมบูรณ์ จากนั้นจะเกิดการขจัดพิษออกของเชื้อราซึ่งเป็นระบบการป้องกันตัวของมัน โดยปกติแล้วการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพแบบซีโนไบโอติกจะมีขั้นตอนการใช้เอนไซม์เพียงหนึ่งหรือสองขั้นตอน

เท่านั้น ในขณะที่การสังเคราะห์ทางชีวภาพจะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันไปและด้วยเหตุนี้เองจะทำให้ประสิทธิภาพทั้งหมดของกระบวนการในเวลาถัดมาลดน้อยลง อย่างไรก็ตามในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทั้งสองชนิดนี้จะถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้เป็นผลสำเร็จเพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้หลากหลายชนิด เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) รีดักชัน (Reduction) และฮาโลจีเนชัน (Halogenation) ดีฮาโลจีเนชัน (Dehalogenation) แอลคิลเลชัน (Alkylation) ดีแอลคิลเลชัน (Dealkylation) ไอโซเมอไรเซชัน (Isomerization) แอลดอล คอนเดนเซชัน (Aldol condensation) ไมเคิล รีแอคชัน (Michael reaction) และการเตรียมเอสเทอร์ (Esters) เอไมด์ (Amides) แลคโตน (Lactones) แอซิดแอนไฮไดรด์ (Acid anhydrides) อีพอกไซด์ (Epoxide) และไนไตรล์ (Nitriles) การสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยใช้การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยตรง พบว่าเป็นวิธีที่ช่วยทำให้เกิดความเข้าใจในโครงสร้างและกลไกหลักของรูปแบบการสังเคราะห์ทางชีวภาพ เมื่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยใช้จุลินทรีย์ (Microbial transformation) ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับยาและกระบวนการซีโนไบโอติก (Xenobiotic) อื่นๆ เมทาโบไลต์ (metabolite) ที่ได้ มักจะเหมือนกับที่สังเกตุพบในระบบทางชีวภาพของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเป็นเพราะระบบของไซโตโครม พี-450 โมโนออกซิจีเนส (Cytochrome P-450 monooxygenase systems) ของจุลินทรีย์บางตัวที่เหมือนกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยใช้จุลินทรีย์ ถือว่าเป็น “แบบจำลองที่สมบูรณ์ (complementary *in vitro* model)” สำหรับกระบวนการเมทาบอลิซึมในยาของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงมีความสนใจค่อนข้างมากที่จะทำการพัฒนาระบบของจุลินทรีย์เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์สารต่างๆ ไปที่ให้ความเฉพาะเจาะจงในรูปแบบการทำปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาที่เหมือนกันนี้มักเกิดได้โดยการสังเคราะห์ทางเคมี อย่างไรก็ตาม มีข้อดีและข้อจำกัดบางประการในการนำไปปรับใช้กับวิธีการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ

ข้อดี

1. ตัวเร่งปฏิกิริยามีประสิทธิภาพ (ให้ความเร็วของปฏิกิริยาเร็วกว่าไม่ได้ใช้เอนไซม์ 10^8 - 10^{10} เท่าและใช้ในปริมาณที่น้อยมาก คือ 10^{-3} - 10^{-4} โมลเปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นการจำกัดการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง)
2. สภาวะปฏิกิริยาไม่รุนแรง (pH 5-8 ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการสลายตัวต่ำ)
3. เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (จะเกิดการสลายตัวอย่างสมบูรณ์หลังจากการใช้งาน)
4. สามารถนำไปใช้เป็นตัวเร่งได้กับปฏิกิริยาที่หลากหลาย
5. มีความเฉพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยา

Chemoselectivity: เป็นการทำให้ปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันเพียงหมู่เดียวแม้ว่าจะมีหมู่ฟังก์ชันที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาอื่นๆ อยู่ด้วย

Regioselectivity: เป็นการทำให้ปฏิกิริยาแค่เพียงหนึ่งในหลายๆ บริเวณภายในโมเลกุล

Enantioselectivity: เป็นการเข้าทำปฏิกิริยา หรือผลิตอินแอนทิโอเมอร์เพียงตัวเดียว เพราะ เอนไซม์นั้นเป็นตัวเร่งแบบไครัล (Chiral catalysts)

เนื่องจากยังมีปฏิกิริยาเคมีอินทรีย์ที่สำคัญมากมายที่ต้องใช้สารเคมีที่แพงในการทำปฏิกิริยา หรือมีขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาที่ยุ่งยาก แต่ก็สามารถจัดการได้โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประโยชน์ในการสังเคราะห์หลักแบบนี้ คือ การมีความเฉพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาเนื่องจาก เอนไซม์เป็นโปรตีนไครัลโมเลกุลขนาดใหญ่ (Proteinous chiral molecules) มีส่วนของโครงสร้างสามมิติ (Stereostructure) ที่มีลักษณะเฉพาะในตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาซึ่งมันจะมีความสามารถในการเลือกเข้าไปยังส่วน โครงสร้างของสารตั้งต้น หรือการเข้าไปทำปฏิกิริยาสูง ซึ่งที่ได้กล่าวมาทั้งหมดก็เป็นข้อดีของวิธีการนี้ สำหรับข้อเสียมีดังนี้ คือ

ข้อเสีย

1. การควบคุม หรือปรับเปลี่ยนตัวแปรต่างๆ ทำได้จำกัดเนื่องจากมีความยากในการเปลี่ยนแปลงสถานะเพื่อที่จะทำให้ปฏิกิริยาช้าลง

2. เอนไซม์ที่มีรูปแบบเป็นอินแอนทิโอเมอร์สามารถหาได้จากธรรมชาติเท่านั้น

3. มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาสูงสุดในน้ำทำให้เป็นการลดความสามารถในการนำไปใช้งานในสารอินทรีย์

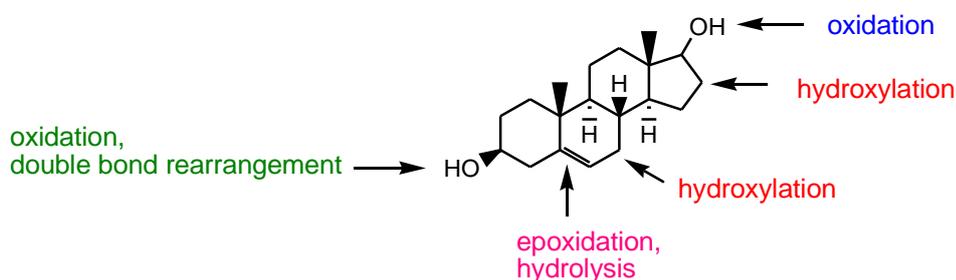
4. บางกรณีมีราคาแพง

ข้อเสียเหล่านี้สามารถกำจัดได้ในบางกรณี ตัวอย่างเช่น การปรับเปลี่ยนสถานะของปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น การปรับเปลี่ยนค่า pH หรือความเข้มข้นของตัวทำละลาย เป็นต้น ส่วนตัวเร่งชีวภาพสามารถนำมาใช้ได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เอนไซม์นั้นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และมีหลายชนิดที่หาได้ง่าย ราคาถูก โดยสามารถจะนำมาใช้ใน รูปแบบที่มีความบริสุทธิ์บางส่วน ส่วนเซลล์ (Whole cells) อย่างเช่น จุลินทรีย์ ฟีซ และเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะขึ้นนั้นก็สามารนำมาใช้ได้เช่นเดียวกัน

1.4 กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยใช้จุลินทรีย์ของสเตียรอยด์[9]

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยใช้จุลินทรีย์ของสเตียรอยด์เป็นวิธีการสำคัญที่ทำให้ได้ออนุพันธ์ของสเตียรอยด์ตัวใหม่ซึ่งนำไปใช้ได้ทั้งในทางเภสัชกรรม และเป็นวิธีการทางเคมีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Green chemistry) โดยเอนไซม์โมโนออกซิจีเนส (Monooxygenases) และรีดักเทส (Reductases) ที่มีอยู่ในจุลินทรีย์และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ตัวอย่างจุลินทรีย์ในการติดตามและทำนายผลของกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารที่สนใจทดสอบในสิ่งมีชีวิต จากงานวิจัยต่างๆ พบว่าได้มีการเสนอให้นำสเตียรอยด์ อาทิ เช่น เพรกนินโนโลน โปรเจสเทอโรน และสเตียรอยด์ที่เป็นอนุพันธ์ของซัลเฟต เช่น แอลโลเพรกน

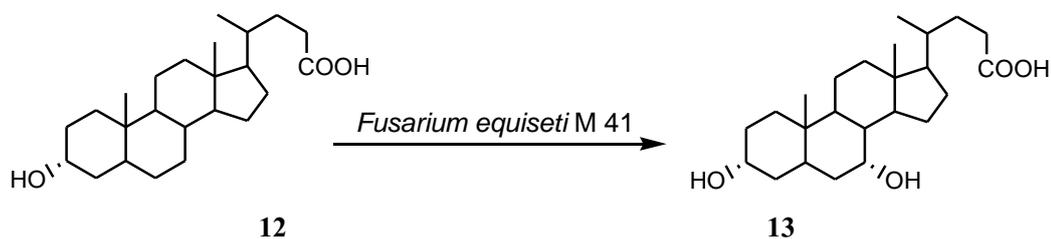
โนโลน (Allopregnenolone) ทำหน้าที่เป็นแอลโลสเตอริก โมดูเลเตอร์ (Allosteric modulators) ของตัวรับสัญญาณในระบบประสาท และที่มากกว่านั้นคือพวกสารประกอบเหล่านี้มีความสามารถในการจำกัดความรุนแรงเมื่อเกิดการทำลายเส้นประสาทที่ไขสันหลังขึ้น โดยโปรเจสเทอโรนจะทำหน้าที่สำคัญในการซ่อมแซมเยื่อหุ้มไมอีลิน (Myelin sheath) ที่เกิดความเสียหายที่ระบบประสาท และนอกจากนี้อนุพันธ์ของไฮดรอกซีก็มีลักษณะเฉพาะ คือ มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาทางชีวภาพสูงกว่าสารตั้งต้นที่มีขั้วน้อย ดังตัวอย่างเช่น อนุพันธ์ของ 7-ไฮดรอกซีของดีไฮโดรอีพีแอนโดรสเตอโรน (Dehydroepiandrosterone, DHEA) ที่พบได้ในร่างกายมนุษย์มีความไวต่อปฏิกิริยามากกว่าสาร DHEA ในด้านลักษณะของระบบภูมิคุ้มกัน การเกิดไฮดรอกซิลเลชัน (Hydroxylation) ที่ตำแหน่งของคาร์บอนตติยภูมิทำให้ได้สารที่มีสมบัติในการต้านการเกิดสารก่อมะเร็งที่มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง โดยเฉพาะการต้านการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งมดลูกซึ่งสารที่มีสมบัติเหล่านี้จะเป็นสารอนุพันธ์ของแอนโดรสเตนไดโอน (Androstenedione) เช่น $6\beta,14\alpha$ -dihydroxyandrost-4-en-3, 17-dione และ 14α -hydroxyandrost-4-en-3,6,17-trione โดยหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 7α ของแอนโดรสเตนไดโอน (Androstenedione) จะเกิดเป็น 7α -hydroxyandrost-4-en-3, 17-dione ซึ่งสารเหล่านี้พบว่านำไปใช้งานในด้านของอุตสาหกรรมการสังเคราะห์สารที่เป็นยาขับปัสสาวะ



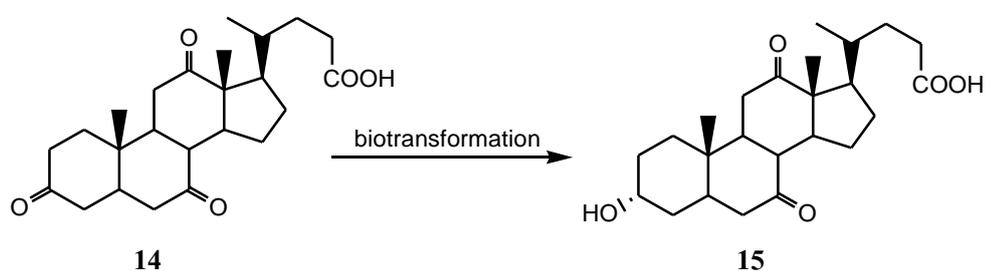
รูปที่ 1.1 แสดงตำแหน่งคาร์บอนของสเตียรอยด์ที่เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยใช้จุลินทรีย์

การปรับเปลี่ยนโครงสร้าง โดยเฉพาะที่หมู่ฟังก์ชัน โดยการใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์หรือเรียกว่า Biotransformation (Microbial transformation) เป็นแนวทางการสังเคราะห์สารอินทรีย์ แนวทางใหม่ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารอินทรีย์โดยเฉพาะสารธรรมชาติ โดยเป็นวิธีที่มีความสำคัญในแง่ความเฉพาะเจาะจงและมีสเตอริโอเคมีที่แน่นอน นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่การสังเคราะห์แบบเคมีสะอาด (Green Chemistry) เนื่องจากมีการใช้สารเคมีที่เป็นพิษ เช่น ตัวทำละลายหรือสารเข้าทำปฏิกิริยา (รีเอเจนต์) น้อยมากจนถึงไม่ใช้เลย[10,11] การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสเตียรอยด์โดยวิธี Biotransformation โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และรวมถึงการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอนุพันธ์ว่ามีฤทธิ์ที่คล้ายคลึงหรือแตกต่างกันอย่างไร มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

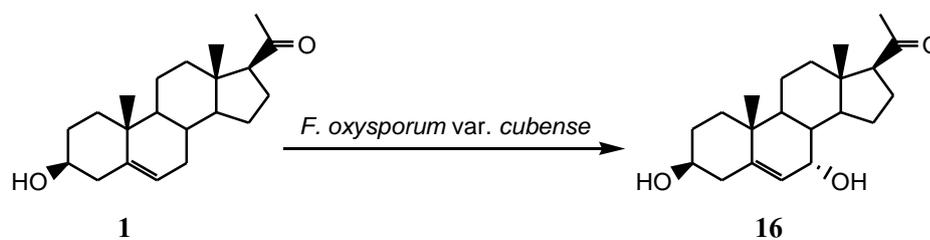
ตัวอย่างเช่น Bortolini และคณะ[12] รายงานถึงปฏิกิริยา hydroxylation ของไบลด์แอซิด โดยใช้ *Fusarium equiseti* M 41 โดยการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-7



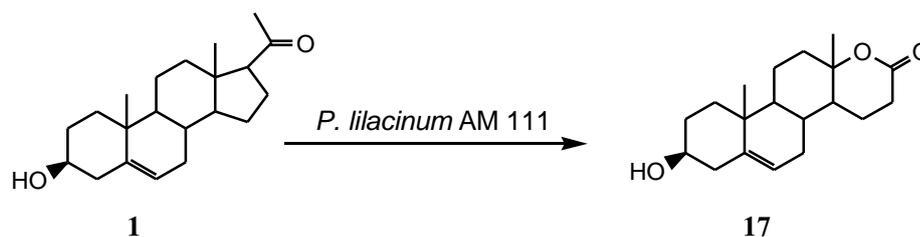
Cravotto และคณะ[13] รายงานการทำปฏิกิริยา regio และ stereoselective reductions ของ dehydrocholic acid ด้วยวิธี Biotransformation โดยใช้ *Trametes hirsute* และ *Collybia velutipes*



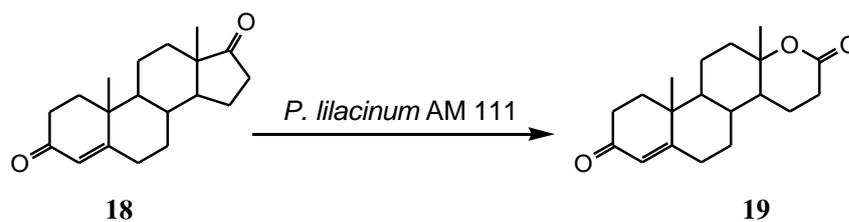
Wilson และคณะ[14] ใช้ *Fusarium oxysporum* var. *cubense* ในการเกิด steroid transformation ของ 3 β -hydroxypregn-5-en-20-one 16 โดยมี การเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-7 และมีสเตอริโอเคมีที่แน่นอน



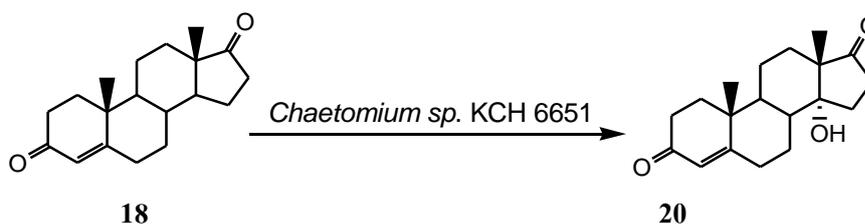
Kolek และคณะ[15] ใช้ *Penicillium lilacinum* AM 111 ในการเกิดปฏิกิริยา Baeyer-Villiger oxidation ของ pregnenolone 1 เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์คือ 3 β -hydroxy-17 α -oxa-D-homo-androst-5-en-17-one 17



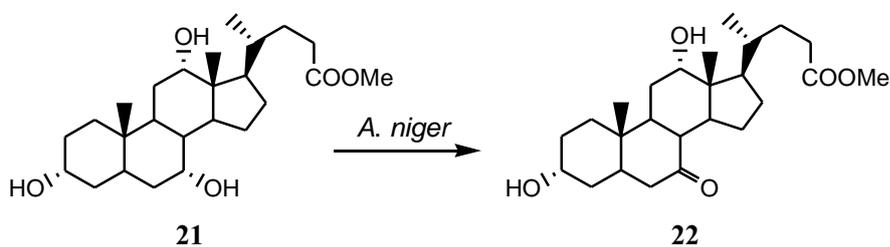
และ androstenedione **18** เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์คือ testololactone **19**



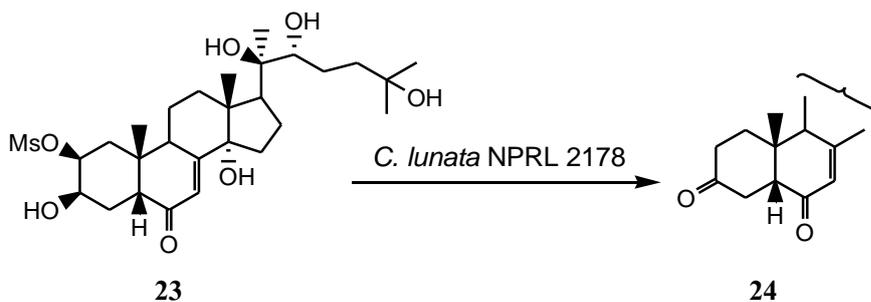
Janeczko และคณะ[16] ใช้ *Chaetomium* sp. KCH 6651 ในการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลของ androstenedione **18**



Al-Aboudi และคณะ[17] ได้เปลี่ยนหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-7 ให้เป็นหมู่ keto ของ methyl cholate **21** โดยใช้ *Aspergillus niger* และพบว่าเวลาในการทำปฏิกิริยามีส่วนเกี่ยวข้องโดยเมื่อทำปฏิกิริยา 104 ชั่วโมง เกิดสารผลิตภัณฑ์ **22** และที่ 32 ชั่วโมง จะมีเพียงสารตั้งต้น **21**



Changtam และคณะ[18] ได้สังเคราะห์ 3-dehydro-2-deoxy-ecdysteroids **24** จาก 3-hydroxy-2-mesyloxy analogues **23** โดยการทำให้ Functional group-mediated biotransformation โดยใช้ *Curvularia lunata* NRRL 2178



จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างนี้จะได้สเตียรอยด์สังเคราะห์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่หลากหลายชนิดมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นการดีอย่างมากถ้าผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นสามารถให้ผลผลิตขึ้นมาได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงเพียงพอที่จะนำไปใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการผลิตสเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดใหม่ได้อีก และจุดเด่นของปฏิกิริยาปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันโดยใช้วิธี Biotransformation มีความเฉพาะเจาะจงต่อตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาที่วงของนิวเคลียสของสเตียรอยด์และผลที่อาจจะตามมาคือ เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสเตียรอยด์สังเคราะห์เหล่านี้ อาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใหม่ ๆ แตกต่างกันไปและสเตียรอยด์สังเคราะห์บางชนิดถูกพัฒนาขึ้นมาเป็นตัวยาหรือเป็นตัวส่งผ่านยาเข้าสู่เซลล์ได้

1.5 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สเตียรอยด์ชนิดใหม่ โดยการเลือกใช้เทคนิค Biotransformation ในการสังเคราะห์และสารที่เข้าทำปฏิกิริยา
2. เพื่อทราบถึงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาเฉพาะกับสเตียรอยด์
3. เพื่อศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารอนุพันธ์ของสเตียรอยด์โดยทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการยับยั้งและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ
4. เพื่อศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารอนุพันธ์ของสเตียรอยด์โดยทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์
5. เพื่อศึกษาผลของอนุพันธ์ของสเตียรอยด์ต่อการเป็นพิษของเซลล์

1.6 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์โดยการตัดแปลงหมู่ฟังก์ชันหรือการเพิ่มหมู่แทนที่ของนิวเคลียส จากการทำปฏิกิริยาระหว่างสเตียรอยด์และจุลินทรีย์ที่เหมาะสม
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ
3. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ Gram positive และ negative bacteria
4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์

1.7 วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน กล่าวโดยสรุปดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ทำการสังเคราะห์สเตียรอยด์เป้าหมายโดยใช้วิธีทางชีวภาพ

(Biotransformation)

กำหนดสเตียรอยด์ตั้งต้นคือ เพรกนิน โนโลน 1 และกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 จากโครงสร้างของสเตียรอยด์ทั้งสามชนิดนี้พบว่า มีส่วนที่แตกต่างกันโดยเพรกนิน โนโลน 1 เป็นโมเลกุลที่มีขั้วต่ำกว่ากรดดีไฮโดรโคคลิก 14 ซึ่งแต่ละวงประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่มีขั้วสูงคือ หมู่ไฮดรอกซิล และหมู่คาร์บอกซิล แนวความคิดคือ จะเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันและหรือเพิ่มหมู่ฟังก์ชันโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยการปลดปล่อยเอนไซม์จากจุลินทรีย์สร้างขึ้น เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้จะเลือกใช้เป็นเชื้อราโรคฟิช เช่น *Fusarium solani* TISTR 3436 และ *Chaetomium globosum* TISTR 3093 วิธีการทดลองจะดำเนินการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ liquid medium กับอาหารเลี้ยง 2 ชนิด ได้แก่ อาหาร PDB[19] และอาหารเหลวสูตร 3% glucose : 1% peptone[20] พร้อมกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการนำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น ในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารตั้งต้นที่ละลายใน DMSO หรือ อะซิโตน และ Tween 80 จากนั้นทำการเขย่าตามเวลาที่กำหนดเป็นเวลา 1 3 5 7 9 และ 11 วัน ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์โดยพิจารณาการลดลงของปริมาณสารตั้งต้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการสกัดล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม นำอนุพันธ์ของสเตียรอยด์ที่ได้จากปฏิกิริยา (Crude product) มาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ศึกษาหาโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืช

ทดสอบ

ทำการทดสอบโดยวิธี Vial Test ทำการเจือจางอนุพันธ์ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1,000 500 250 และ 125 ppm โดยใช้น้ำกลั่นเป็นวิธีการเปรียบเทียบ เพื่อทดสอบผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ 2 ชนิด นำเมล็ดพืชทดสอบวางในขวด (vial) ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นใช้พาราฟิล์มปิดปากหลอด วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การวางแผนการทดลอง การวัดผลและการเก็บข้อมูล ในการทดลองนี้แต่ละพืชทดสอบใช้แผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design จำนวน 4 ซ้ำ ทำการนับเมล็ดที่งอกหลังจากเพาะเมล็ด 7 วัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

พืชทดสอบจะเลือกใช้พืชจำนวน 2 ชนิดคือ

หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus.galli* L. Beauv)

ผักโขมจีน (*Aramanthus tricolor*)

การวัดผล ทำการบันทึกผลการทดลองโดยวัดความยาวรากและความยาวลำต้นในวันที่ 7 ของการทดลองถ่ายรูปเปรียบเทียบผลการทดลองในวันที่ 7 หลังจากวันเพาะเมล็ด

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบอนุพันธ์ของสเตรปโตค็อกคัสต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์จะนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย Gram positive และ negative โดยทำการทดสอบแบบ Disc Method ทำการบันทึกผลการทดลองโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone และคำนวณหาค่า MIC

ขั้นตอนที่ 4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ของสเตรปโตค็อกคัสทดสอบ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และหน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของสเตรปโตค็อกคัสโดยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันด้วยวิธี Biotransformation ได้
2. สามารถทราบถึงชนิดของจุลินทรีย์ในการเกิด Biotransformation ของสเตรปโตค็อกคัส
3. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอนุพันธ์ของสเตรปโตค็อกคัสในการยับยั้งการงอกและการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบและการต้านเชื้อจุลินทรีย์
4. สามารถนำอนุพันธ์ของสเตรปโตค็อกคัสที่ออกฤทธิ์ไปใช้ได้โดยตรงหรือเป็นส่วนผสม เพื่อให้การออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการงอกและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ
5. สามารถทราบถึงฤทธิ์ของอนุพันธ์สเตรปโตค็อกคัสต่อความเป็นพิษของเซลล์
6. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเพื่อผลิตส่วนผสมของยาที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

	เกรด	ยี่ห้อ
1. กรดดีไฮโดรคลอริก	วิเคราะห์	Fluka
2. เพรกนิน โนโลน	วิเคราะห์	Fluka
3. เฮกเซน	การค้า	Zen point
4. เอทิล แอซิเตต	การค้า	Zen point
5. ไดคลอโรมีเทน	การค้า	Zen point
6. เมทานอล	การค้า	Zen point
7. แอนไฮดรัส โซเดียมซัลเฟต	วิเคราะห์	Fisher
8. อนิซาลดีไฮด์	วิเคราะห์	Panreac
9. แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (Absolute alcohol)	วิเคราะห์	Carlo Erba
10. กรดซัลฟูริก	วิเคราะห์	Lab-scan
11. สารละลายอิมัลชันโซเดียมคลอไรด์		
12. Silica gel 60 0.04-0.06 mm		Scharlau GE0048

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)	Biomark
2. อาหาร PDB (Potato Dextrose Broth)	Scharlau
3. Glucose	Ajax finechem
4. Peptone	Himedia

2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ผลิตภัณฑ์เครื่องแก้วใช้สำหรับการทดลองทางเคมีอินทรีย์
2. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 16 × 160 มิลลิเมตร
3. ขวดแก้วขนาดเล็ก (Vial) ขนาด 1.8 × 4.1 มิลลิเมตร
4. หลอดหยด (Dropper)
5. ขวดแบน (Flat bottle)
6. คอลัมน์แก้ว (Glass column) สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี
7. หลอดแคปิลลารี (Capillary tube)

8. สำลี (Cotton)
9. ผ้าก๊อซ (Gauze)
10. กระดาษฟรอยด์ (Aluminium froid sheet)
11. ช้อนตักสาร (Spatula)
12. เข็มเย็บเยื่อปลายงอ (Stainless steel needle-curved end)
13. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
14. แผ่นทินเลเซอร์โครมาโทกราฟี (TLC aluminium sheet, silica gel F₂₅₄ Merck)
15. Stand and Clamp
16. ไมโครปิเปต (Micropipette)
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol bunner)
18. ตู้อบ (Hot air oven)
19. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) MEMMERT
20. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flowcabinet) ISSCO Laminar Flow Model
21. แผ่นให้ความร้อน (Hot plate)
22. เครื่องปั่นกวนสารละลาย (Stirrer)
23. เครื่องเขย่า (Orbital shaker) GALLENKAMP
24. เครื่องชั่งสาร Denver Instrument Company รุ่น TC-254 (Max 250 g , d 0.1 mg)
25. หม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) TOMY รุ่น High Pressure Steam sterilizer ES - 315
26. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) OLYMPUS OPTICAL รุ่น MODEL CH30RF200
27. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Evaporator) BÜCHI รุ่น Rotavap R-114
28. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum filtration)
29. เครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer) HBG 0.0025 mm², 0.100 mm Tiefe Depth Profondur
30. เครื่องอัลตราโซนิก ULTR Asonik รุ่น 136H
31. เครื่องหาจุดหลอมเหลว GALLEKAMP SANYO
32. เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟาเรดPerkin Elmer รุ่น Spectrum GX 60237
33. เครื่องฟูเรียทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ต

2.4 เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัยได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จะทำการศึกษาดังแต่การเพาะเลี้ยงเชื้อจนถึงการนำไปทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น คือ เพรกนิน โนโลน

1 และกรดดีไฮโดรโคลิค 14 ในที่นี้จะกล่าวถึงลักษณะทั่วไปของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ เชื้อราทั้งสอง ชนิดได้แก่

1. *Chaetomium globosum* TISTR 3093



รูปที่ 2.1 เชื้อรา *Chaetomium globosum* TISTR 3093

ลักษณะทั่วไปของ *Chaetomium* spp. เป็นเชื้อราพวก saprophytes ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes เชื้อราพวกนี้จะมีโครงสร้างสีดำ จึงเห็นเป็นจุดดำง่าบนผิวหน้าวัสดุ สามารถเจริญได้ดีในเศษซากพืชและสัตว์ที่เน่าเปื่อยผุพัง และอินทรีย์วัตถุต่างๆ มีการขยายพันธุ์โดยใช้เพศและทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี โดยพบว่ามี *C. globosum* และ *C. cupreum* สายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจงสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช ได้แก่ *Fusarium* spp. *Rhizoctonia* spp. และ *Pythium* spp. โดยได้มีการทดลองการควบคุมโรคทั้งในพืชผักและไม้ผล พบว่า สามารถควบคุมโรคได้เท่าเทียมกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา และช่วยให้การเจริญเติบโตของพืชและผลผลิตดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและ ยังมีคุณสมบัติป้องกันโรคในลักษณะ broad spectrum mycofungicide ได้ด้วย

2. *Fusarium solani* TISTR 3436



รูปที่ 2.2 เชื้อรา *Fusarium solani* TISTR 3436

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. ก่อให้เกิดโรคชัตเตนเดท (Sudden death syndrome, SDS) อาการเริ่มจากใบมีสีซีดลงตรงแผ่นใบระหว่างเส้นใบเป็นแถบขนานไปกับเส้นใบ ในขณะที่เส้นใบยังเขียวอยู่ทำให้ใบแห้งตายและร่วงก่อนกำหนดแต่ก้านใบยังคงติดอยู่กับลำต้น ต้นยืนแห้งตา เนื่องจากเชื้อโรคเข้าทำลายท่อน้ำท่ออาหาร ถ้าโรคระบาดในระยะก่อนออกดอก อาจทำความเสียหายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์

2.5 การทดลองทั่วไป

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้แก่ เฮกเซน ไคลอโรฟอร์ม (DCM) เอทิล แอซิเตต และ เมทานอล ที่ใช้สำหรับการทำคลอแลมน์โครมาโทกราฟีเป็นเกรดทางการค้าถูกนำมาผ่านกระบวนการกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง ส่วนสารเคมีที่ได้จากการซื้อจะนำมาใช้โดยปราศจากการทำสารให้บริสุทธิ์

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography (TLC) ทำให้ปรากฏบนแผ่น aluminium sheet silica gel F₂₅₄ Merck ตรวจสอบจุดของสารผลิตภัณฑ์ด้วยการดูคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ/หรือโดยการย้อมด้วย anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนแผ่น TLC บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

สเปกตรัม ¹H NMR และ ¹³C NMR บันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ต การเตรียมสารตัวอย่าง จะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl₃ และ CD₃OD จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CHCl₃ ที่ δ 7.25 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹H NMR และที่ δ 77.5 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹³C NMR และ CD₃OH ที่ δ 4.80 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹H NMR และที่ δ 49.0 ppm สำหรับสเปกตรัม ¹³C NMR

2.6 ขั้นตอนการวิจัย[19,20]

งานวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 7 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

- 1.1 ชั่งอาหารสำเร็จรูป PDA 39 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร
- 1.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปให้ความร้อนในเตาอบไมโครเวฟ เพื่อให้อาหารสำเร็จรูป PDA ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- 1.3 แบ่งใส่ขวดแบนขวดละ 25 มิลลิลิตรต่อขวดปิดจุกด้วยสำลีและหุ้มด้วยถุงพลาสติก
- 1.4 นำเข้าไปอบในหม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำออกจากหม้อนึ่งไอน้ำ
- 1.5 นำขวดอาหารที่ผ่านการอบแล้วมาวางเอียงทำมุมประมาณ 170 องศา กับแนวแกนโลก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อาหารแข็งตัว จะได้อาหารที่มีลักษณะผิวเอียง (Agar slant)
- 1.6 วางอาหารเหลว PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน ก่อนนำไปใช้ ทั้งนี้เพื่อเป็นการตรวจสอบว่ามีเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียปะปนอยู่หรือไม่ถ้าไม่พบก็สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. อาหารเหลวสูตร 3 % glucose : 1 % peptone

- 2.1 ชั่ง glucose 30 กรัม และ peptone 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร
- 2.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 960 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
- 2.3 เทอาหารเหลวใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตรต่อขวด ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยด้วยสำลี หุ้มปากขวดรูปชมพู่ที่ปิดสำลีด้วยถุงพลาสติกหรือกระดาษ
- 2.4 นำเข้าไปอบในหม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำออกจากหม้อนึ่งไอน้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 2.5 วางอาหารเหลวสูตร 3 % glucose : 1 % peptone ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน ก่อนนำไปใช้ ทั้งนี้เพื่อเป็นการตรวจสอบว่ามีเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรียปะปนอยู่หรือไม่ ถ้าไม่พบก็สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3. อาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB)

- 3.1 ชั่งอาหารสำเร็จรูป PDB 48 กรัม ลงในบีกเกอร์ จากนั้นปรับปริมาตรอาหารด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3.2 เทอาหารเหลวใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตรต่อขวด แล้วปิดจุกสำลี หุ้มกระดาษ จากนั้นนำเข้าหม้อนึ่งไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ขั้นตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 และ *C. globosum* TISTR 3093

เชื้อราทั้งสองชนิดถูกนำมาเพาะเลี้ยงให้มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นและเป็นการขยายพันธุ์ ทำโดยนำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรามัดขนาดประมาณ 2 ตารางมิลลิเมตร แล้วนำไปวางบนผิวหน้าของอาหารที่เตรียมไว้ในขวดแบนแล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันสำหรับ *F. solani* TISTR 3436 และ 28 วันสำหรับ *C. globosum* TISTR 3093 เพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโตและสร้างสปอร์เต็มที่ จากนั้นนำเชื้อรามาดเตรียมสปอร์แขวนลอย (Spore suspension)

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา (Spore suspension)

- 3.1 เตรียมขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร 1 ขวด ปิดขนาด 10 มิลลิลิตร 10 อัน กรวยกรองอูดปลายด้วยสำลี 1 อัน
- 3.2 เตรียมทวิน 80 เข้มข้น 0.05 % ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยกระดาษฟรอยด์

3.3 เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ปิดปากขวด รูปชมพู่ด้วยกระดาษฟรอยด์

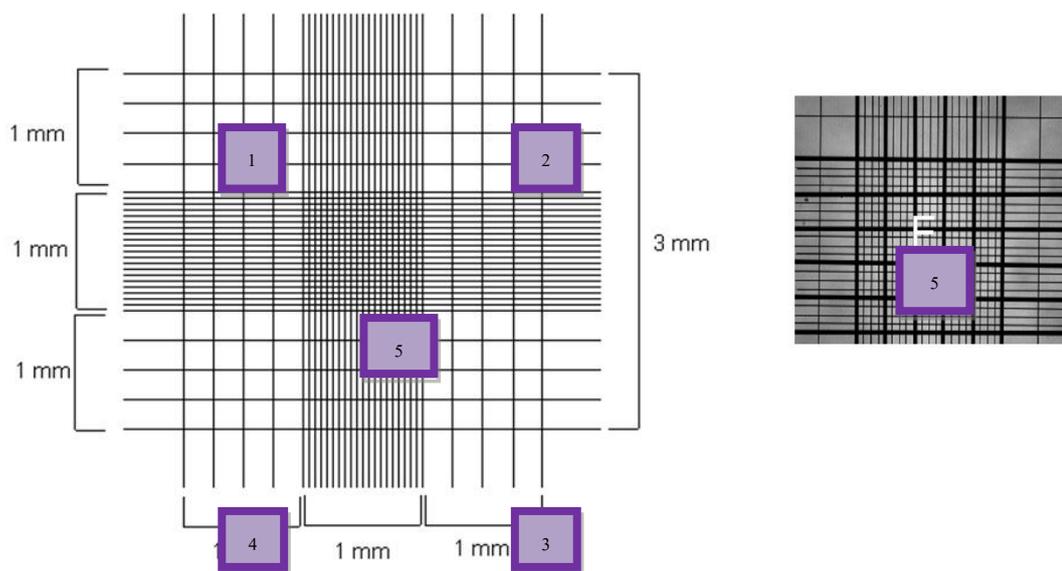
3.4 นำสิ่งที่เตรียมในข้อ 3.1 3.2 และ 3.3 อบในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.5 หลังจากนั้นนำสิ่งที่เตรียมในข้อ 3.1 อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6 นำทวีน 80 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในขวดแบนที่มีเส้นใยของเชื้อรา จากขั้นตอนที่ 2 ขวดละ 25 มิลลิลิตร

3.7 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อชุดสปอร์ออกจากเส้นใยที่ผสมอยู่ในของเหลว และกรองเส้นใยออกโดยกรองผ่านกรวยกรองอูดส์าลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

3.8 นำของเหลวที่ผ่านการกรองซึ่งมีสปอร์แขวนลอยอยู่ด้วยมานับสปอร์โดยเครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีสปอร์เชื้อราเริ่มต้นที่ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 2.3 การนับจำนวนสปอร์แขวนลอยด้วยเครื่องฮีมาไซโตมิเตอร์

ขั้นตอนที่ 4 การเติมสารตั้งต้นลงในเชื้อรา

เตรียมอาหารเหลว PDB บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 90 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ให้เย็น เติมสารแขวนลอยของเชื้อราที่เตรียมได้จากข้อ 2.6.3 ร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหาร (10 มิลลิลิตรต่อขวด) เติบบนเครื่องเขย่า (Rotary shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสารตั้งต้นที่ต้องการศึกษาคือ กรดดีไฮโดรคลอริก 14 และเพรกนิน โนโลน 1 โดยชั่งสารตั้งต้นอย่างละ 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดแก้ว

ขนาดเล็ก (vial) ละลายด้วยเอซีโตน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Tween 80 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารตั้งต้นละลายให้เข้ากัน แล้วเติมลงในขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อ ดังนี้

1. กรดดีไฮโดรคลอริก 14+ขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อ *fusarium* 4 ขวด
2. กรดดีไฮโดรคลอริก 14+ขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อ *chaetomium* 4 ขวด
3. เพรกนิน โนโลน 1+ขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อ *fusarium* 4 ขวด
4. เพรกนิน โนโลน 1+ขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อ *chaetomium* 4 ขวด
5. กรดดีไฮโดรคลอริก 14+อาหาร PDB 4 ขวด
6. เพรกนิน โนโลน 1+อาหาร PDB 4 ขวด
7. ขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อ *fusarium* 1 ขวด
8. ขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อ *chaetomium* 1 ขวด

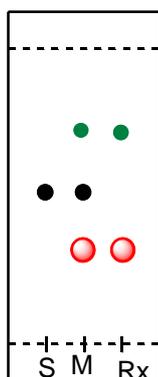
เขย่าขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 150-200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บตัวอย่างของสารละลายเพื่อศึกษาการดำเนินไปของปฏิกิริยาในวันที่ 1 3 5 และ 7 เพื่อทำการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ต่อไปด้วยเอทิล แอซีเตต ทำการทดลองซ้ำ แต่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเหลว สูตร 3% glucose : 1% peptone

ขั้นตอนที่ 5 การสกัดและแยกสารผลิตภัณฑ์

1. เมื่อครบวันที่กำหนด นำขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อมาแยกส่วนของกากเส้นใยและน้ำ ออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
2. เติมเอทิล แอซีเตต ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการสกัดสารผลิตภัณฑ์โดยใช้ เครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำมาเทใส่กรวยแยก ตั้งทิ้งไว้จนเห็นการแยกชั้นของ เอทิล แอซีเตตกับน้ำ
3. ไขเอาสารละลายในชั้นน้ำทิ้ง แล้วทำตามข้อ 2 อีก 1 ครั้ง
4. เติมสารละลายอิมตัวของโซเดียมคลอไรด์ ลงในกรวยแยกเพื่อล้างอิมัลชันที่เกิดขึ้น จากนั้นตั้งกรวยแยกทิ้งไว้จนเห็นการแยกชั้นของเอทิล แอซีเตตกับน้ำ ไขชั้นน้ำทิ้ง
5. ทำซ้ำข้อ 4 อีก 1 ครั้ง ไขชั้นเอทิล แอซีเตตเก็บในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมโซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำเพื่อดูดเอาน้ำออก จากนั้นกรองแยกชั้นเอทิล แอซีเตตและ โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ
6. ระเหยเอทิล แอซีเตตออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ (สารผลิตภัณฑ์) ที่ได้
7. ทำตามขั้นตอนที่ 1-6 สำหรับการสกัดหยาบจากขวดรูปชมพู่เลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 3 5 และ 7

ขั้นตอนที่ 6 การแยกสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

1. เตรียมตัวทำละลายสำหรับการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ใช้ตัวทำละลายเฮกเซน : เอทิล แอซิเตต ใส่ในขวดแก้วที่มีกระดาษกรองวางไว้ด้านในของขวดแก้ว
2. ตัดแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ขนาด 2×5 เซนติเมตร จากนั้นขีดเส้นจากปลายขอบบนและขอบล่างของแผ่นเพื่อใช้ในการหาค่า R_f
3. ทำการจุดเครื่องหมายไว้ที่แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี จำนวน 3 จุด โดยใช้สัญลักษณ์ ดังนี้



จุด S คือ สารตั้งต้น

จุด M คือ สารตั้งต้น + ขวดยุโรปวมฟูที่เติมสารตั้งต้นกับเชื้อรา

จุด RX คือ ขวดยุโรปวมฟูที่เติมสารตั้งต้นกับเชื้อรา

4. ใช้หลอดแคปพิลารีจุ่มสารแล้วจุดลงบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่ทำเครื่องหมายไว้จุดละ 5 ครั้ง
5. นำแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีแช่ในตัวทำละลายที่เตรียมไว้ สังเกตการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายไปยังขอบบน จากนั้นนำออกมาวางไว้ข้างนอกขวดให้แผ่นทินเลเยอร์แห้ง
6. นำแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แล้วทำเครื่องหมายการเคลื่อนที่จุดของสาร
7. ย้อมแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ด้วย anisaldehyde reagent แล้วนำไปให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
8. จดบันทึกการเปลี่ยนแปลงสีของจุดสารที่เกิดขึ้น

ขั้นตอนที่ 7 การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

การศึกษาปฏิกิริยาของสารตั้งต้นเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ จะทำการศึกษาจากสารสกัดหยาบโดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) สเปกตรัมของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR ถูกบันทึกโดยเครื่องฟูเรียรทรานส์ฟอร์มนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ BRUKER รุ่น Avance DPX 300 ความถี่ 300 เมกกะเฮิร์ต ในหน่วย ppm การเตรียมตัวอย่าง (สารสกัดหยาบ) จะทำการละลายโดยใช้ตัวทำละลาย CDCl_3 สำหรับสเปกตรัมของ ^1H NMR จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ

CHCl_3 ที่ δ 7.25 ppm และสำหรับสเปกตรัมของ ^{13}C NMR จะปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ CDCl_3 ที่ δ 77.5 ppm

2.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Disc diffusion method จากหน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1. นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้บน Trypticase Soy Agar (TSA) เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar (MHA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. หลังจากนั้นทำการเชยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูก activated แล้วลงมาใน 0.85 % โซเดียมคลอไรด์ ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 Mcfarland

3. นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้มาเพาะลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Mueller Hinton Agar อยู่ โดยการขีดลงบนหน้าวุ้นให้ทั่วจำนวน 3 ครั้ง ทำให้ได้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ อยู่บนหน้าวุ้น

4. หลังจากนั้นนำแผ่นดิสก์ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ที่มีสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งละลายด้วยไดคลอโรมีเทน วางบนผิววุ้นที่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จากนั้นทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. อาหารสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ใช้เป็นชนิด Sabouraud Agar และทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิและเวลาขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

6. ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้น

2.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์โดยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์โดยวิธี MTT assay จากหน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1. เตรียมเซลล์ไลน์ของมะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7) ในอาหาร Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ FBS โดยเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร

2. เตรียม Stock สารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร ทำการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.2 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปิดสนิท หุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันแสง จากนั้นเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. เตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 โดยเจือจางเป็นสองเท่า (two-fold dilution) ได้แก่ความเข้มข้น 1,000 500 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. ปลูกเซลล์ไลน์ MCF-7 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทดสอบ 3 ซ้ำ นำงานเพาะเลี้ยงที่ปลูกเซลล์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. นำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้บ่ม คุณอาหารออกจากหลุมให้หมด แล้วเติมสารตัวอย่างความเข้มข้นที่กำหนด (กลุ่มควบคุมเป็น 2 กลุ่ม คือ ความเข้มข้นของ DMSO 1 แฉวที่เจือจางกับอาหาร DMEM และอีก 1 แฉวเป็นเซลล์ปกติซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. เมื่อบ่มเซลล์ในสารตัวอย่างครบ 24 ชั่วโมง คุณสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ความเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในแต่ละหลุมที่ทดสอบ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

7. จากนั้นคุณสารละลาย MTT ที่จี้ แล้วเติมสารละลาย DMSO : 10 % SDS อัตราส่วน 9 : 1 ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายผลึกฟออร์มาซานจะได้สารละลายสีม่วง

8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครโตะเตอร์ เพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร

9. คำนวณหาค่า % Cytotoxicity ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้ คือ

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น

หมายเหตุ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) ปลูกเซลล์ปริมาตร 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร DMEM

บทที่ 3

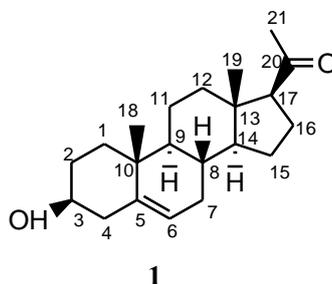
อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์โดยวิธีทางชีวภาพ จะพิจารณาจากการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันหรือการเปลี่ยนโครงสร้างของสเตียรอยด์ตั้งต้นได้แก่ เพรกนินโนโลน **1** และ กรดดีไฮโดรโคลิค **14** เพื่อให้ได้สเตียรอยด์ชนิดใหม่ และเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งในการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์โดยใช้สารเคมีทางชีวภาพทดแทนสารเคมี และจัดเป็นเคมีสะอาด (Green Chemistry) เนื่องจากปล่อยสารพิษเข้าสู่สิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้สารเคมี จึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

3.1 การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเพรกนินโนโลน **1** และกรดดีไฮโดรโคลิค **14** ด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biotransformation)

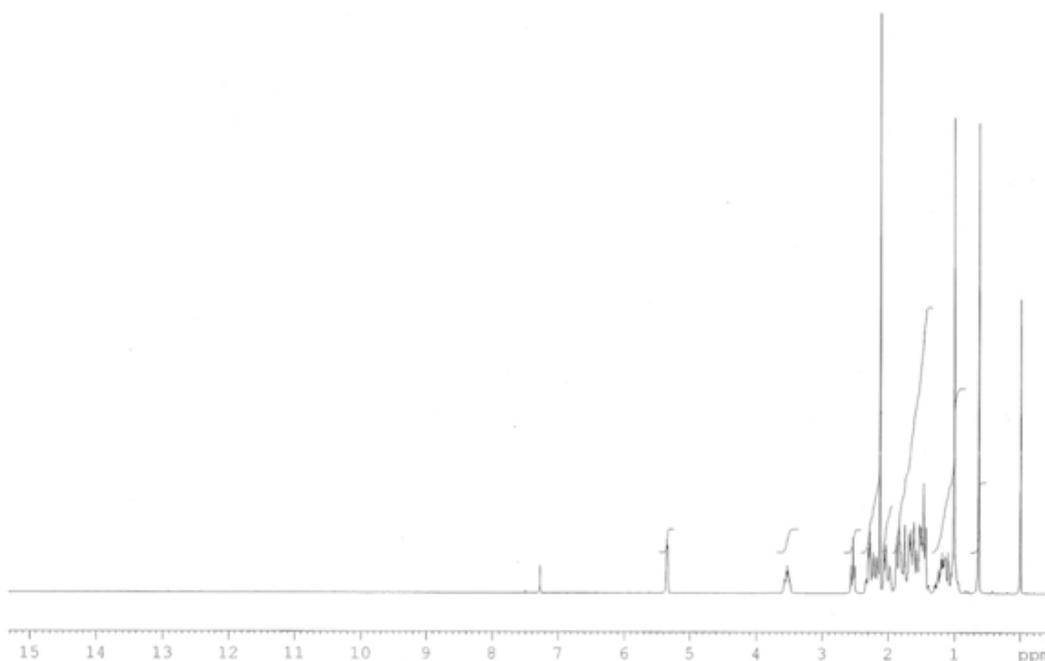
การพิสูจน์โครงสร้างของสเตียรอยด์ทั้งสองด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR ได้ผลดังต่อไปนี้

เพรกนินโนโลน **1**



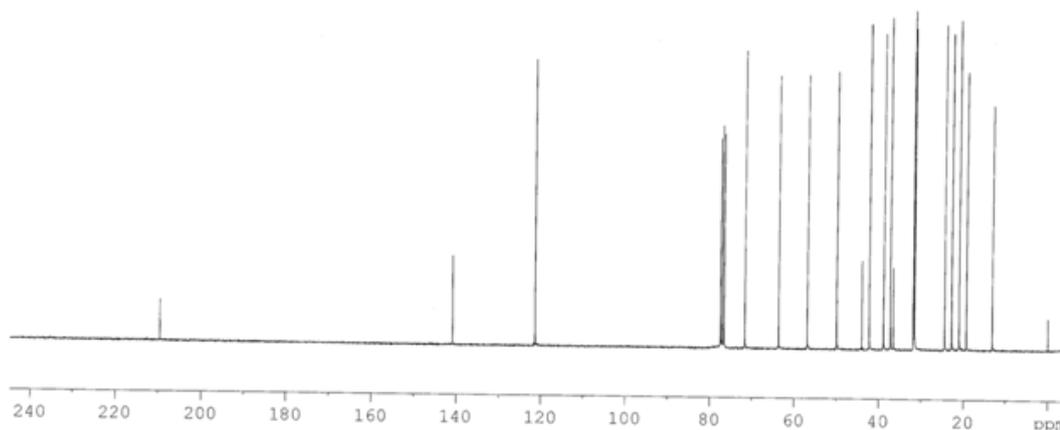
จากงานวิจัยของ Szendi และคณะ[21] ทำการพิสูจน์โครงสร้างของเพรกนินโนโลน **1** โดยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR พบว่า ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.84 และ 1.08 (2H, H-1), 1.84 และ 1.48 (2H, H-2), 3.54 (1H, H-3), 2.27 (2H, H-4), 5.34 (1H, H-6), 1.97 และ 1.57 (2H, H-7), 1.46 (1H, H-8), 0.98 (1H, H-9), 1.62 และ 1.47 (2H, H-11), 2.04 และ 1.43 (2H, H-12), 1.17 (1H, H-14), 1.68 และ 1.23 (2H, H-15), 2.19 และ 1.66 (2H, H-16), 2.55 (1H, H-17), 0.63 (3H, H-18), 1.00 (2H, H-19) และ 2.11 (3H, H-21) ^{13}C NMR (75.5 MHz) δ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 31.8 (C-7), 31.9 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 21.1 (C-11), 38.9 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.5 (C-15), 22.9 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.4 (C-19), 209.4 (C-20), 31.5 (C-21) เมื่อตรวจสอบเปรียบเทียบกับ ^1H

NMR และ ^{13}C NMR กับเพรกนินโนโลน 1 จากบริษัท Fluka ได้ผล ^1H NMR และ ^{13}C NMR สอดคล้องกับข้อมูลของ Szendi และคณะ[21] ได้เสนอไว้



รูปที่ 3.1 สเปกตรัม ^1H NMR ของเพรกนินโนโลน 1

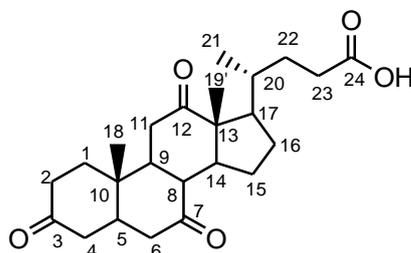
รูปที่ 3.1 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของเพรกนินโนโลน ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ; δ 1.20 และ 1.14 (2H, t, H-1), 1.84 และ 1.81 (2H, m, H-2), 3.52 (1H, m, H-3), 2.29 (2H, d, H-4), 5.35 (1H, d, H-6), 1.85 (2H, m, H-7), 1.49 (1H, d, H-8), 1.19-1.10 (1H, m, H-9), 1.66-1.58 (2H, m, H-11), 1.69 (2H, t, H-12), 1.24-1.14 (1H, m, H-14), 1.53-1.44 (2H, m, H-15), 2.05 (2H, m, H-16), 2.54 (1H, t, H-17, $J_{\text{H-17, H-16}} = 8.0$ Hz), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19) และ 2.13 (3H, s, H-21)



รูปที่ 3.2 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของเพรกนินโนโลน 1

และรูปที่ 3.2 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR ของเพรกนินโนโลน 1 ^{13}C NMR (75.5 MHz); δ 37.3 (C-1), 31.6 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.3 (C-6), 31.7 (C-7), 31.8 (C-8), 49.9 (C-9), 36.5 (C-10), 21.0 (C-11), 38.8 (C-12), 44.0 (C-13), 56.9 (C-14), 24.4 (C-15), 22.8 (C-16), 63.7 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 209.6 (C-20) และ 31.5 (C-21)

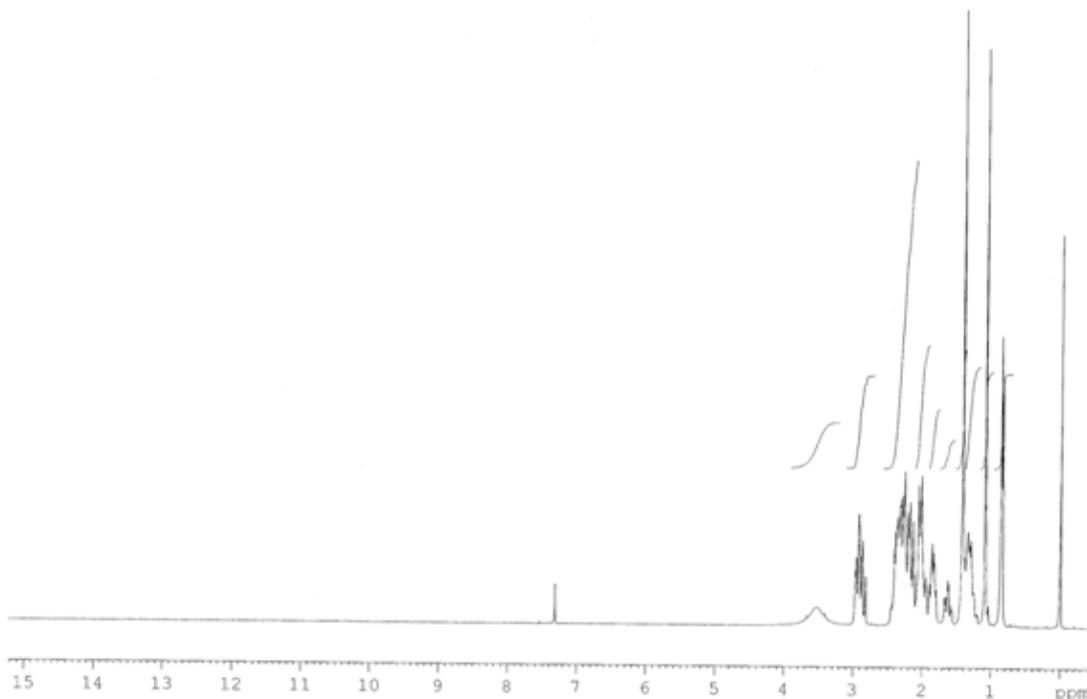
กรดดีไฮโดรโคลิค 14



14

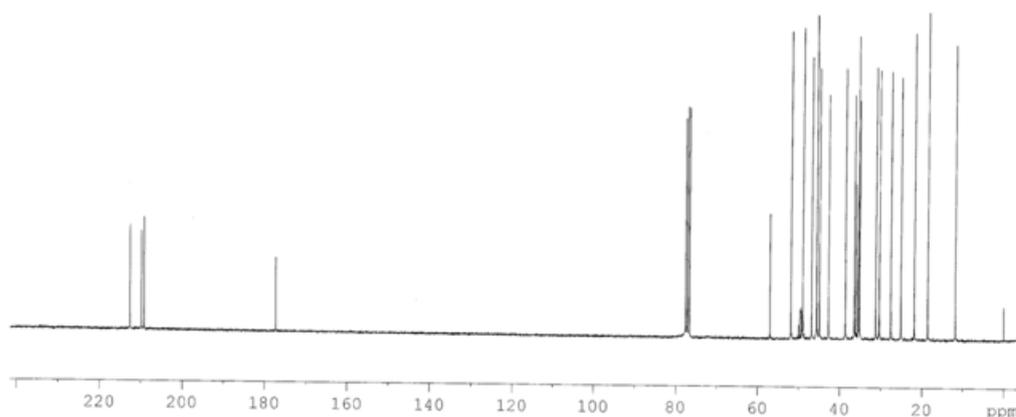
Cravotto และคณะ[13] รายงาน ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของกรดดีไฮโดรโคลิค 14 ดังนี้ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.00 (d, H-1), 2.29 (m, H-2), 2.23 และ 2.16 (d, H-4), 2.37 (d, H-5), 2.96 และ 2.07 (d, H-6), 0.93 (s, H-8), 2.39 (d, H-9), 2.88 และ 2.18 (d, H-11), 1.88 (d, H-14), 2.34 และ 1.29 (d, H-15), 2.08 และ 1.38 (d, H-16), 2.08 (s, H-17), 1.11 (s, H-18), 1.43 (s, H-19), 1.34 (s, H-20), 0.89 (d, H-21), 1.90 และ 1.46 (s, H-22), 2.48 และ 2.34 (s, H-23); ^{13}C NMR (75.5 MHz): δ 35.54 (C-1), 36.46 (C-2), 209.80 (C-3), 42.77 (C-4), 46.86 (C-5), 44.98 (C-6), 208.14 (C-7), 48.90 (C-8), 49.03 (C-9), 36.05 (C-10), 38.65 (C-11), 212.60 (C-12), 57.00 (C-13), 51.87 (C-14), 25.16 (C-15), 27.63 (C-16), 45.66 (C-17), 11.87 (C-18), 21.88 (C-19), 35.26 (C-20),

18.62 (C-21), 30.42 (C-22), 31.26 (C-23) และ 177.30 (C-24) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Cravotto และคณะ[13] พบว่า ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของกรดดีไฮโดรโคลิค **14** จากบริษัท Fluka สอดคล้องกับข้อมูลที่ Cravotto และคณะ[13] ได้เสนอไว้



รูปที่ 3.3 สเปกตรัม ^1H NMR ของกรดดีไฮโดรโคลิค **14**

จากรูปที่ 3.3 และ 3.4 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของกรดดีไฮโดรโคลิค **14** ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ 2.28 (2H, t, H-2), 2.23 และ 2.16 (2H, m, H-4), 2.94 (2H, m, H-6), 2.90 (1H, m, H-8), 2.87 และ 2.73 (2H, m, H-11), 1.08 (3H, s, H-1), 1.41 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, d, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ 2.44 ถึง 1.20 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และ ^{13}C NMR (75.5 MHz) : δ 209.8 (C-3), 209.1 (C-7), 212.6 (C-12), 57.0 (C-13), 51.8 (C-14) 25.1 (C-1), 27.6 (C-16), 11.8 (C-18), 21.8 (C-19), 18.6 (C-21), 30.4 (C-22), 31.2 (C-23) และ 177.3 (C-24) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ 49.8 ถึง 35.3 ppm เป็นของหมู่ methylene และ methyne

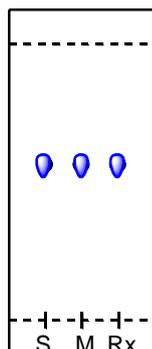


รูปที่ 3.4 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของกรดคีไฮโดรโคลิค 14

ข้อมูลจากการวิเคราะห์โครงสร้างของเพรกนินโนโลน 1 และกรดคีไฮโดรโคลิค 14 ด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการปฏิกิริยาระหว่างสเตียรอยด์ตั้งต้นกับเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 และ *C. globosum* TISTR 3093 เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่กำหนดและวิเคราะห์โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์

3.1.1 ผลของอาหารเหลว PDB ต่อเพรกนินโนโลน 1 และกรดคีไฮโดรโคลิค 14

เมื่อนำของผสมจากการเขย่าระหว่างเพรกนินโนโลน 1 กับอาหารเหลว PDB มาทำการสกัดแยกสารที่เกิดขึ้นด้วยเอทิล แอซิเตต และทำการทดสอบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของการทดลองวันที่ 1 3 5 และ 7 โดยใช้เฮกเซน : เอทิล แอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 1 : 1 เมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ของจุดบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี กำหนดให้จุด S คือสารตั้งต้น (เพรกนินโนโลน 1) M คือจุดผสมระหว่างสารตั้งต้นและสารสกัดหยาบ และ Rx คือ สารสกัดหยาบจากของผสมระหว่างสารตั้งต้นและอาหารเหลว PDB ผลการทดลองปรากฏจุด M และ Rx มีค่า R_f เท่ากับจุด S (รูปที่ 3.5) และข้อมูลจากเทคนิค ^1H NMR ของสารสกัดหยาบพบว่า สเปกตรัมที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารตั้งต้น สัญญาณ ^1H NMR ของสารสกัดหยาบระหว่างเพรกนินโนโลน 1 และอาหารเหลว PDB ปรากฏสัญญาณดังนี้: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : δ 1.84 และ 1.08 (H-1, t), 1.84 และ 1.48 (H-2, m), 3.34 (H-3, m), 2.27 (H-4, d), 5.34 (H-6, t), 1.84 (H-7, t), 1.46 (H-8, m), 0.98 (H-9, t), 1.62-1.47 (H-11, m), 1.69 (H-12, t), 1.17 (H-14, m), 1.53-1.44 (H-15, m), 2.19 (H-16, m), 2.55 (H-17, t), 0.63 (H-18, s), 1.00 (H-19, s) และ 2.11 (H-21, s) และ 3.69 (H จาก dextrose ของอาหารเหลว PDB) ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าอาหารเหลว PDB ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาและไม่ทำปฏิกิริยากับเพรกนินโนโลน 1

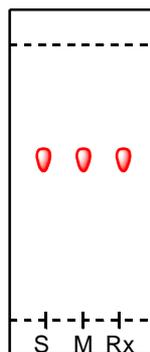


รูปที่ 3.5 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของเพรกนินโนโลน 1 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ

S หมายถึงสารตั้งต้น; M หมายถึง จุดผสมระหว่างสารตั้งต้นและสารสกัดหยาบ;

Rx หมายถึง สารสกัดหยาบจากของผสมระหว่างเพรกนินโนโลน 1 กับอาหารเหลว PDB

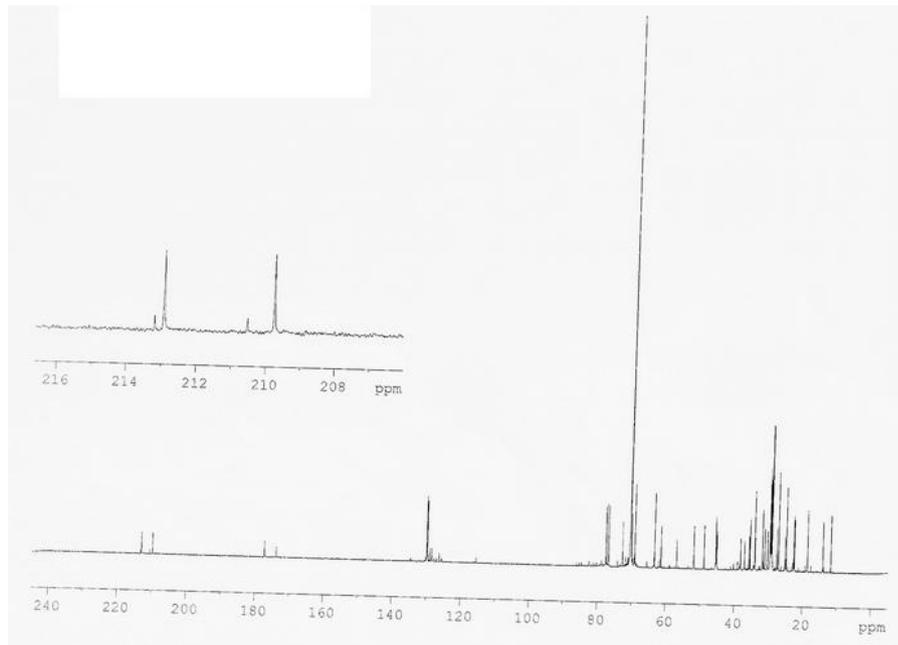
ในการทำนองเดียวกันเมื่อนำกรดดีไฮโดรโคลิค 14 เขย่ารวมกับอาหารเหลว PDB พบว่าหลังจากทำการสกัดแยกของผสมในขวดเล็กซึ่งเชื่อมด้วยเอทิล แอซิเตต และทำการทดสอบสารสกัดหยาบด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของการทดลองวันที่ 1 3 5 และ 7 โดยใช้เฮกเซน : เอทิล แอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 8 เมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ของจุดบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีกำหนดให้จุด S คือสารตั้งต้น (กรดดีไฮโดรโคลิค 14) M คือจุดผสมระหว่างสารตั้งต้นและสารสกัดหยาบ และ Rx คือ สารสกัดหยาบจากของผสมระหว่างสารตั้งต้นและอาหารเหลว PDB ปรากฏจุด M และ Rx มีค่า R_f เท่ากับจุด S (รูปที่ 3.6) และข้อมูลจากเทคนิค $^1\text{H NMR}$ ของสารสกัดหยาบพบว่าสเปกตรัมที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารตั้งต้น สัญญาณ $^1\text{H NMR}$ ของสารสกัดหยาบระหว่างกรดดีไฮโดรโคลิค 14 และอาหารเหลว PDB ปรากฏสัญญาณดังนี้: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : δ 2.00 (H-1, d), 2.29 (H-2, m), 2.23 2.16 (H-4, d), 2.37 (H-5, d), 2.96 2.07 (H-6, d), 2.93 (H-8, s), 2.39 (H-9, d), 2.88 2.18 (H-11, d), 1.88 (H-14, d), 2.34 1.29 (H-15, d), 2.08 และ 1.38 (H-16, d), 2.08 (H-17, s), 1.11 (H-18, s), 1.43 (H-19, s), 1.34 (H-20, s), 0.89 (H-21, d), 1.90 และ 1.46 (H-22, s), 2.48 และ 2.34 (H-23, s) และ 3.69 (H จาก dextrose ของอาหารเหลว PDB) ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าอาหารเหลว PDB ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาและไม่ทำปฏิกิริยากับกรดดีไฮโดรโคลิค 14



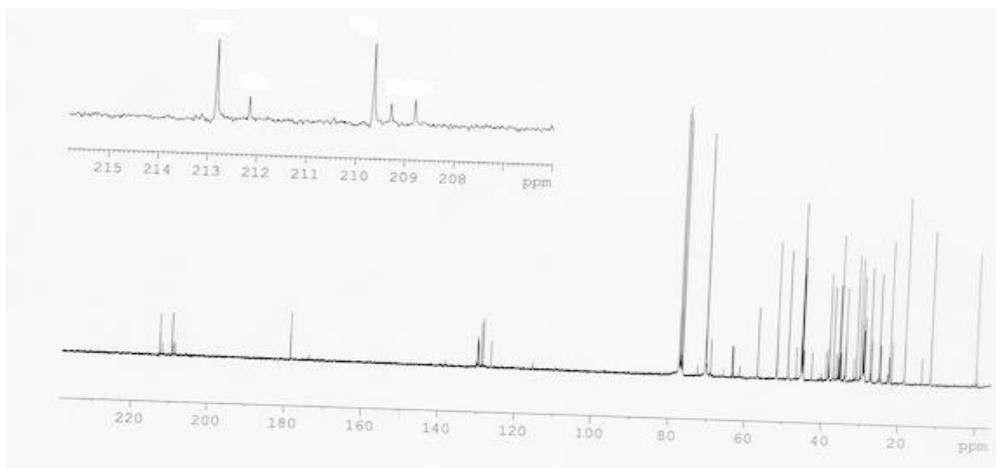
รูปที่ 3.6 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของกรดดีไฮโดรโคลิค **14** เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ S หมายถึงสารตั้งต้น; M หมายถึง จุดผสมระหว่างสารตั้งต้นและสารสกัดหยาบ; Rx หมายถึง สารสกัดหยาบจากของผสมระหว่างกรดดีไฮโดรโคลิค **14** กับอาหารเหลว PDB

3.1.2 ผลของอาหารเหลวสูตร 3% Glucose : 1% Peptone ต่อเพรกนินโนโลน 1 และกรดดีไฮโดรโคลิค 14

เมื่อเปลี่ยนอาหารเหลวเป็นสูตร 3% glucose : 1% peptone และดำเนินการทดลองดังที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อ 3.1.1 พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับอาหารเหลว PDB กล่าวคืออาหารเหลวสูตร 3% glucose : 1% peptone ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับเพรกนินโนโลน 1 และกรดดีไฮโดรโคลิค **14** แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองโดยพิจารณาจาก ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคลิค **14** และเอนไซม์จากเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 เปรียบเทียบการทดลองในระยะเวลา 7 วัน พบว่าอาหารเหลวสูตร 3% glucose : 1% peptone (รูปที่ 3.7) จะเกิดสารผลิตภัณฑ์ในปริมาณมากกว่าอาหารเหลว PDB (รูปที่ 3.8) ซึ่งเหลือปริมาณสารตั้งต้นน้อยกว่าหรือไม่มีสารตั้งต้นเหลืออยู่เลย นอกจากนั้นเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงน้อยกว่า งานวิจัยนี้จะเลือกใช้อาหารเหลวสูตร 3% glucose : 1% peptone ในการเลี้ยงเชื้อราทั้งสองชนิด



รูปที่ 3.7 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดร โคลิก 14 และเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 ในอาหารเหลวสูตร 3% glucose : 1% peptone วันที่ 7

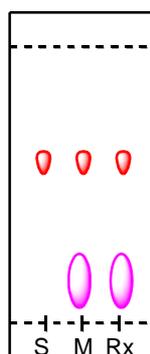


รูปที่ 3.8 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดร โคลิก 14 และเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 ในอาหารเหลว PDB วันที่ 7

3.1.3 ปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคลิก14 และเอนไซม์จากเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436

เมื่อนำกรดดีไฮโดร โคลิก 14 ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 โดยทำการเขย่าขวดรูปหมฟู่เลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 150-200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่าง

ของผสมในขวดเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการดำเนิน ไปของปฏิกิริยาในวันที่ 1 3 5 และ 7 เมื่อครบจำนวนวันที่กำหนดจะทำการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยด้วยเอทิล แอซิเตต และศึกษาข้อมูลเบื้องต้นจากการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นและสีของจุดสารผลิตภัณฑ์ ทำการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล อัตราส่วนเท่ากับ 9 : 1 และการทำปฏิกิริยาของจุดสารกับ anisaldehyde reagent บนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ในวันที่ 5 และ 7 พบว่า วันที่ 5 จุด Rx ปรากฏลักษณะของจุดแตกต่างจากจุด S ซึ่งเป็นจุดของสารตั้งต้น แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ ตำแหน่งของจุดที่เกิดขึ้นใหม่นี้อยู่ต่ำกว่าจุดของสารตั้งต้น และสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีขั้วสูงกว่าสารตั้งต้น

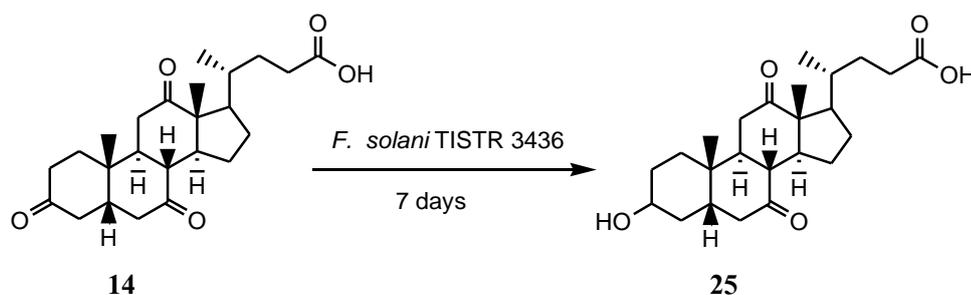


รูปที่ 3.9 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของกรดดีไฮโดรโคคลิก **14** เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ S หมายถึงสารตั้งต้น; M หมายถึง จุดผสมระหว่างสารตั้งต้นและสารสกัดหยาบ; Rx หมายถึง สารสกัดหยาบที่ได้จากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคคลิก **14** กับเชื้อรา

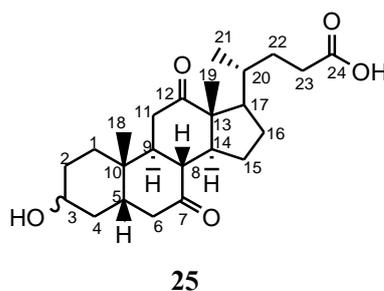
และเมื่อนำสารสกัดหยาบของวันที่ 7 มาทำการทดสอบด้วยแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพบว่า ที่จุด Rx ปรากฏลักษณะของจุดแตกต่างกับจุด S ซึ่งเป็นจุดของสารตั้งต้น แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นเปลี่ยนไปเป็นสารผลิตภัณฑ์ จากการเปรียบเทียบกับแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และเทคนิค ^{13}C NMR ของวันที่ 5 และ 7 พบว่าในวันที่ 7 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดดีไฮโดรโคคลิก **14** เป็นสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นมากกว่าในวันที่ 5 และจากการตรวจสอบการเกิดสารผลิตภัณฑ์ด้วยผลด้วยเทคนิค ^1H และ ^{13}C NMR สเปกโทรสโกปีพบว่า ในวันที่ 5 หลังจากนำกรดดีไฮโดรโคคลิก **14** ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จากเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 จะเกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนหมู่คีโตที่ตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่ไฮดรอกซิล เมื่อเปรียบเทียบกับ ^1H และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบกับสารตั้งต้นพิกที่เกิดขึ้นใหม่ซึ่งอาจจะบ่งชี้ได้ว่าเป็นสาร **25** ดังนี้: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 4.12 (H-3, m) และ ^{13}C NMR (75.5 MHz): δ 211.6 (C-7), 65.3 (C-3) และ 214.5 (C-12) โดยพบสัญญาณที่ δ 209.8 (C-3), 209.1 (C-7) และ 212.6 (C-12) จะมีความเข้มของพีคลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น ส่วนสเปกตรัมของสารสกัดหยาบของวันที่ 7 พบว่า สเปกตรัมของ ^1H และ ^{13}C NMR เหมือนกับสเปกตรัมของวันที่ 5 แต่สัญญาณของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ที่ δ 209.8

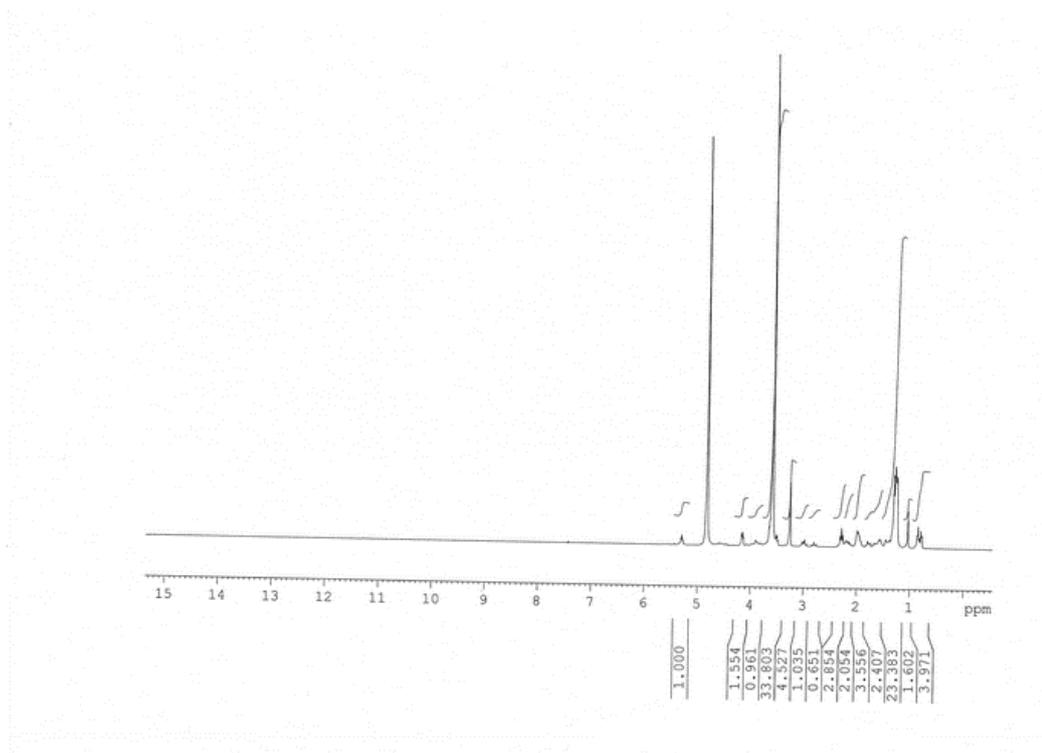
(C-3) จะไม่ปรากฏพีก (รูปที่ 3.7) โดยอาจกล่าวได้ว่ามีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นในปริมาณเพิ่มมากขึ้น เมื่อนำสารสกัดหยาบมาแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวชะสารเป็นตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล อัตราส่วนเท่ากับ 9 : 1 ได้สารผลิตภัณฑ์ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** คิดเป็นอัตราร้อยละ 68.5 เปอร์เซ็นต์

แผนภาพที่ 3.1



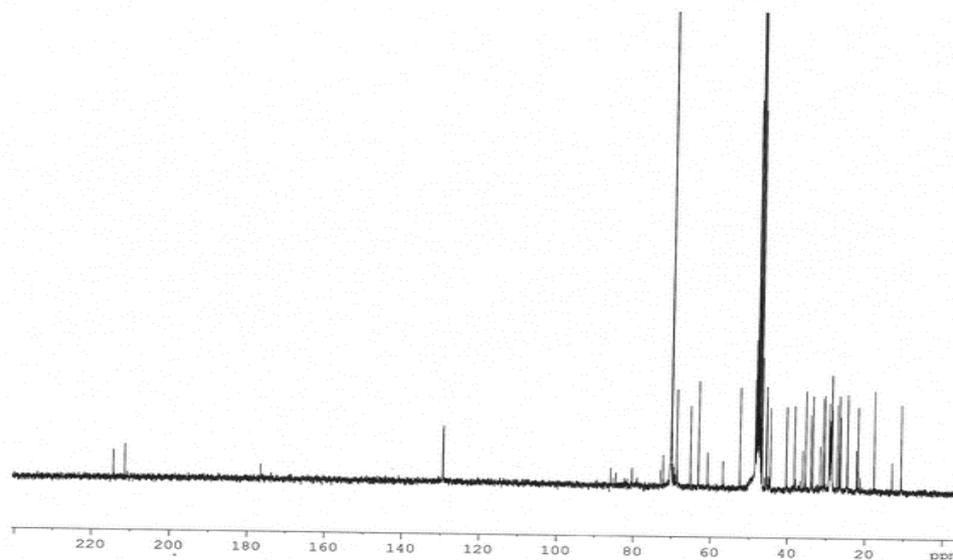
และเมื่อนำสารผลิตภัณฑ์ไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีพบว่า เมื่อหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ C-3 ของกรดคีไฮโดรโคคลิก **14** ถูกเปลี่ยนเป็นหมู่ไฮดรอกซิลเกิดเป็นสาร **25** จะพบตำแหน่งสัญญาณของ ^1H NMR ของคาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 (H-3, m) ปรากฏที่ δ 4.12 ppm และตำแหน่งสัญญาณของ ^{13}C NMR ของคาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 ที่ δ 209.8 ppm หายไปแต่จะพบสัญญาณเกิดขึ้นใหม่ที่สนามแม่เหล็กสูงกว่าที่ δ 65.3 ppm ข้อมูลของ ^1H และ ^{13}C NMR สรุปได้ดังนี้





รูปที่ 3.10 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 3-Hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25**

จากรูปที่ 3.10 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) ของสาร **25** ปรากฏสัญญาณที่ δ 4.12 (1H, m, H-3), 1.05 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, d, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 3.60 ถึง 1.27 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene methyl และ methyne

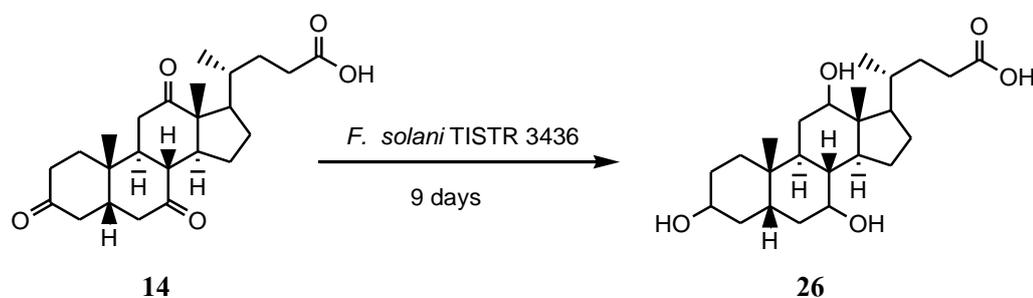


รูปที่ 3.11 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ 3-Hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25**

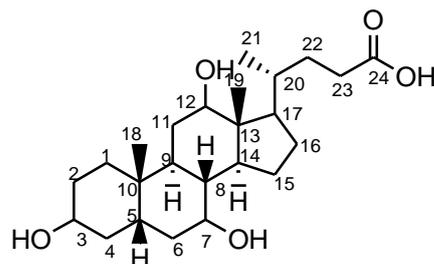
และรูปที่ 3.11 แสดงสเปกตรัม ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร **25** ปรากฏสัญญาณที่ δ 65.3 (C-3), 211.3(C-7), 213.9 (C-12), 11.8 (C-18), 18.6 (C-21), 177.0 (C-24) คาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 84.8 ถึง 22.5 ppm เป็นของหมู่ methylene methyl และ methyne

Cravotto และคณะ[13]ได้รายงานผลของการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของกรดดีไฮโดรโคลิคด้วยวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดได้แก่ *Trametes hirsuta* และ *Collybiavelutipes* จากการทดลองพบว่า เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันขึ้นที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 โดยเปลี่ยนจากหมู่คาร์บอนิลเป็นหมู่ไฮดรอกซิลได้สารผลิตภัณฑ์คือ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** และเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสาร **25** จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างเฉพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาโดยที่หมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่ง C-7 และ C-12 จะไม่ถูกรีดิวส์ยังคงเป็นหมู่คาร์บอนิลเหมือนเดิม กล่าวได้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีทั้งความเป็น chemoselectivity และ regioselectivity ซึ่งข้อมูลทางนิวเคลียแมกเนติกเรโซแนนซ์ที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับรายงานผลงานวิจัยของ Cravotto และคณะ[13] และเมื่อดำเนินปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคลิค **14** กับ *F. solani* TISTR 3436 เป็นเวลา 9 วันพบว่า หมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-7 และ C-12 ถูกเอนไซม์จาก *F. solani* TISTR 3436 รีดิวส์เป็นหมู่ไฮดรอกซิล เมื่อทำการทดสอบสารผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า สารผลิตภัณฑ์ที่ได้คือกรดโคลิค **26**

แผนภาพที่ 3.2



เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณของ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) ของโปรตอนตำแหน่งที่ 3 (H-3), 7 (H-7) และ 12 (H-12) ปรากฏสัญญาณที่ δ 3.25 3.69 และ 3.85 ppm และตำแหน่งสัญญาณของ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 C-7 และ C-12 ไม่ปรากฏสัญญาณที่ δ 209.8, 209.2 และ 212.6 ppm แต่ปรากฏสัญญาณที่ความเข้มสนามแม่เหล็กสูงกว่า (δ 73.4 และ 70.0 ppm) ข้อมูลทางนิวเคลียแมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรดโคลิค **26** สรุปได้ดังนี้



26

ข้อมูลจากสเปกตรัม ^1H NMR ของสาร 26 พบว่า ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.69 (1H, m, H-3), 1.05 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, d, H-21) โปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 3.60 ถึง 1.27 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene methyl และ methyne และ ^{13}C NMR (75.5 MHz) ของสาร 26 ปรากฏสัญญาณที่ δ 13.3 (C-18), 173.7 (C-24) คาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 85.9 ถึง 22.4 ppm เป็นของหมู่ methylene methyl และ methyne ซึ่งสอดคล้องกับผลทางนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ตามทฤษฎีของกรดโคลิก 26 จากการรายงานผลงานวิจัยของ Waterhous และคณะ [22]

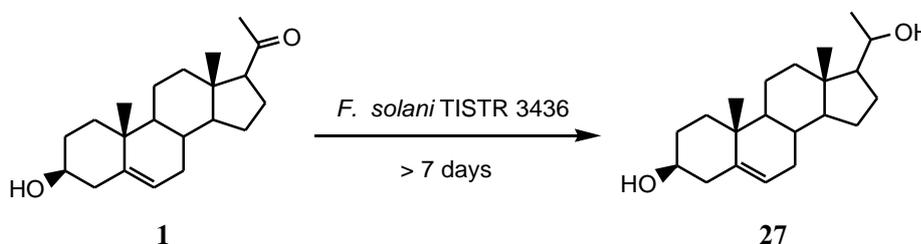
จากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่า *F. solani* TISTR 3436 สามารถปล่อยเอนไซม์ reductases ออกมาในปริมาณที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับกรดดีไฮโดรโคลิก เมื่อใช้เวลากการทดลอง 7 วัน โดยการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 เท่านั้น ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา[3] ได้สารผลิตภัณฑ์ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid 25 เพียงตัวเดียว แสดงถึงลักษณะการเกิดปฏิกิริยาที่มีทั้งความเป็น chemoselectivity และ regioselectivity เมื่อพิจารณาจาก ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร 25 ที่ได้จากการทดลองพบว่า สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีสองไอโซเมอร์ เมื่อพิจารณาถึงสเตอริโอเคมีของสาร 25 สามารถอธิบายโครงสร้างของสาร 25 ได้คือที่ตำแหน่งคาร์บอน C-3 หมู่ไฮดรอกซิลของสารผลิตภัณฑ์จะชี้ขึ้นเหนือระนาบและชี้ลงใต้ระนาบ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า δ กับผลทางทฤษฎีสรุปได้ว่าเอนไซม์จากเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันได้สารผลิตภัณฑ์หลักคือ 3 β -hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid และผลิตภัณฑ์รองคือ 3 α -hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid ในที่นี้ผู้วิจัยไม่ได้ทำการแยกแต่ละไอโซเมอร์เป็นสารบริสุทธิ์ ข้อมูลในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นสารผสมของสองไอโซเมอร์ และเมื่อใช้เวลากการทดลองมากกว่า 7 วัน ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 C-7 และ C-12 ไปเป็นหมู่ไฮดรอกซิล

3.1.4 ปฏิกิริยาระหว่างเพรกนินโนโลน 1 และเอนไซม์จากเชื้อรา *F. solani*

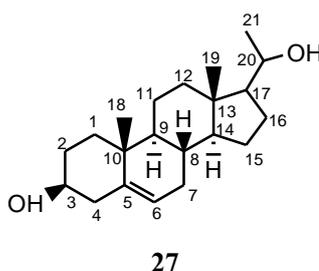
TISTR 3436

วิธีการทดลองและสภาวะที่ใช้ในการทดลองจะดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการทดลองเมื่อเวลาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 7 วัน จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น แต่เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปที่เวลามากกว่า 7 วันพบว่า *F. solani* TISTR 3436 จะปล่อยเอนไซม์ reductases ออกมาในปริมาณที่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับเพรกนินโนโลน 1 ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 เป็นหมู่ไฮดรอกซิล ได้สารผลิตภัณฑ์คือ 3 β -hydroxypregn-5-en-20-ol 27

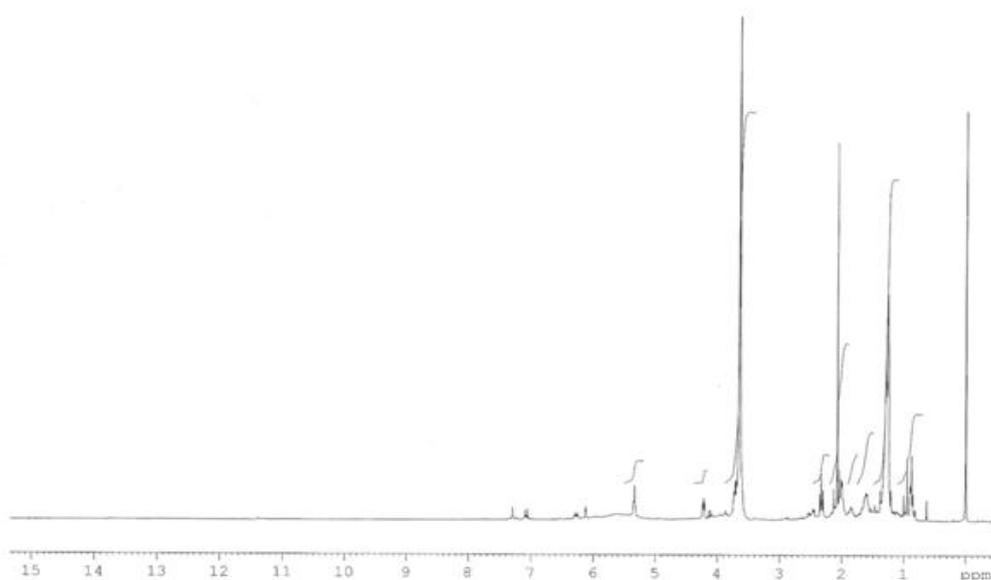
แผนภาพที่ 3.3



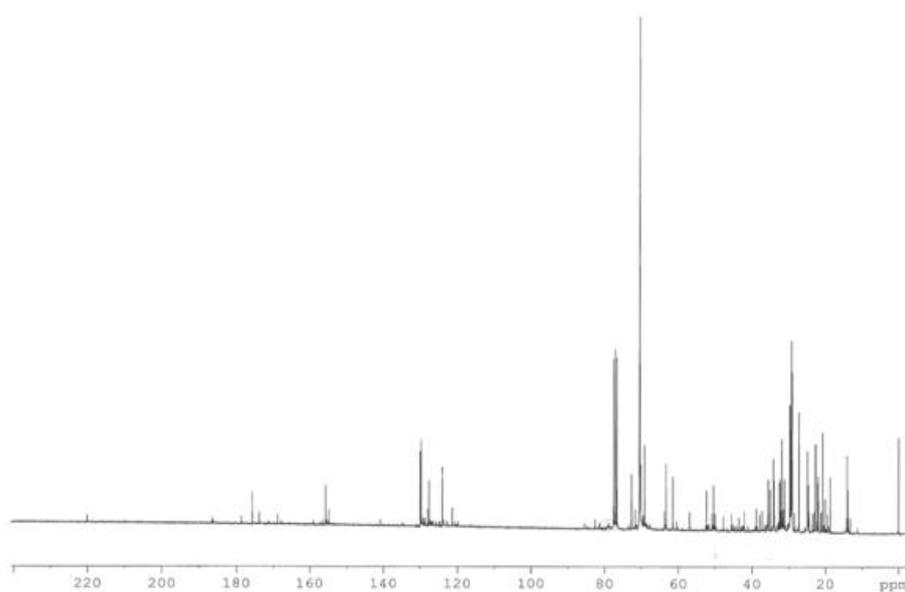
เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคThin Layer Chromatography โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็นเฮกเซน : เอทิล แอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 7 : 3 และทดสอบด้วย anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีม่วงเทาของสารผลิตภัณฑ์ปรากฏต่ำกว่าสารตั้งต้น ซึ่งแสดงว่าสารผลิตภัณฑ์มีขั้วสูงกว่าสารตั้งต้นเมื่อนำสารสกัดหยาบไปตรวจสอบด้วยเทคนิคนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่ามีการเปลี่ยนหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่ 20 ของเพรกนินโนโลน 1 เป็นหมู่ไฮดรอกซิล ปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ ^1H NMR ของโปรตอนตำแหน่งที่ 20 (H-20) ที่ δ 3.71 ppm และไม่ปรากฏตำแหน่งสัญญาณของ ^{13}C NMR ของคาร์บอนตำแหน่งที่ C-20 ที่ δ 209.6 ppm แต่ปรากฏสัญญาณที่ไปทางสนามแม่เหล็กสูงกว่าที่ δ 70.4 ppm ซึ่งแสดงถึงการที่คาร์บอนอะตอมนั้นอยู่ในย่านมีอะตอมคิงอิเล็กตรอนเกาะอยู่ ข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของ 3 β -hydroxypregn-5-en-20-ol 27 สรุปได้ดังนี้



จากรูปที่ 3.12 และ 3.13 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสาร 27 ปรากฏสัญญาณที่ δ 5.34 (1H, t, H-6), 2.11 และ 2.02 (1H, m, H-16), 2.33 (1H, t, H-17), 0.63 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 3.71 (3H, m, H-20), 1.23 (3H, d, H-21) และโปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 3.64 ถึง 0.86 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methylene และ methyne และ ^{13}C NMR ปรากฏสัญญาณที่ δ 72.7 (C-3) 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 13.8 (C-18), 71.7 (C-20) และคาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 70.2 ถึง 18.6 ppm เป็นของหมู่ methylene methyl และ methyne



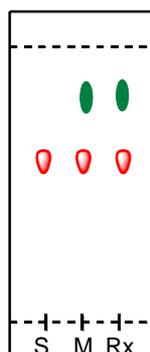
รูปที่ 3.12 สเปกตรัม ^1H NMR ของ 3 β -Hydroxypregn-5-en-20-ol 27



รูปที่ 3.13 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของ 3 β -Hydroxypregn-5-en-20-ol 27

3.1.5 ปฏิกริยาระหว่างกรดไฮโดรโคลิก 14 และเอนไซม์จากเชื้อรา *C. globosum* TISTR 3093

วิธีการทดลอง และสภาวะที่ใช้ในการทดลองจะดำเนินการเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.1.3 และ 3.1.4 นำกรดคลีไฮโดรโคลิก 14 ทำปฏิกริยากับเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา *C. globosum* TISTR 3093 และทำการเก็บตัวอย่างของผสมเพื่อศึกษาการดำเนินไปของปฏิกริยาในวันที่ 1 3 5 และ 7 เมื่อทำการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเอทิล แอซิเตต และทำการทดสอบการเกิดปฏิกริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีในวันที่ 1 3 5 และ 7 โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน : เอทิล แอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 2 : 8 พบว่า ที่จุด Rx ซึ่งเป็นจุดปฏิกริยาของสารตั้งต้นกับเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา *C. globosum* TISTR 3093 มีค่า R_f เดียวกับจุด S หรือจุดของสารตั้งต้นแสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น เมื่อนำสารสกัดหยาบไปตรวจสอบการเกิดสารผลิตภัณฑ์ด้วยผลด้วยเทคนิค ^1H NMR และ ^{13}C NMR สเปกโทรสโกปีพบว่า เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดหยาบกับสารตั้งต้นจะปรากฏสัญญาณที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าไม่มีปฏิกริยาเกิดขึ้น

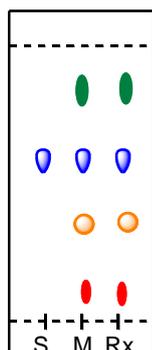


รูปที่ 3.14 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของกรดคลีไฮโดรโคลิก 14 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ
S หมายถึงสารตั้งต้น; M หมายถึง จุดผสมระหว่างสารตั้งต้นและสารสกัดหยาบ;
Rx หมายถึง สารสกัดหยาบจากปฏิกริยาระหว่างกรดคลีไฮโดรโคลิก 14 กับเชื้อรา

3.1.6 ปฏิกริยาระหว่างเพรกนินโนโลน 1 และเอนไซม์จากเชื้อรา *C. globosum* TISTR 3093

วิธีการทดลอง และสภาวะที่ใช้ในการทดลองจะดำเนินการเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.1.3 และ 3.1.4 นำกรดคลีไฮโดรโคลิก 1 ทำปฏิกริยากับเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อรา *C. globosum* TISTR 3093 และทำการเก็บตัวอย่างของผสมเพื่อศึกษาการดำเนินไปของปฏิกริยาในวันที่ 1 3 5 และ 7 เมื่อทำการสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ด้วยเอทิล แอซิเตต และทำการทดสอบการเกิดปฏิกริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีในวันที่ 1 3 5 และ 7 โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน : เอทิล แอซิเตต อัตราส่วน

เท่ากับ 2 : 8 พบว่า ที่จุด Rx ซึ่งเป็นจุดปฏิกิริยาของสารตั้งต้นกับเชื้อรา *C. globosum* TISTR 3093 มีลักษณะเช่นเดียวกับจุด S หรือจุดของสารตั้งต้นแสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น และเมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินมากกว่า 7 วัน โดยตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีในวันที่ 11 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น โดยเกิดจุดของสารที่มีตำแหน่งที่ต่ำกว่าเล็กน้อย ซึ่งแสดงว่าสารผลิตภัณฑ์มีขั้วสูงกว่าเล็กน้อย และมีจุดของสารผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นเกิดขึ้นอีกหลายชนิดที่มีขั้วต่ำกว่าสารตั้งต้น

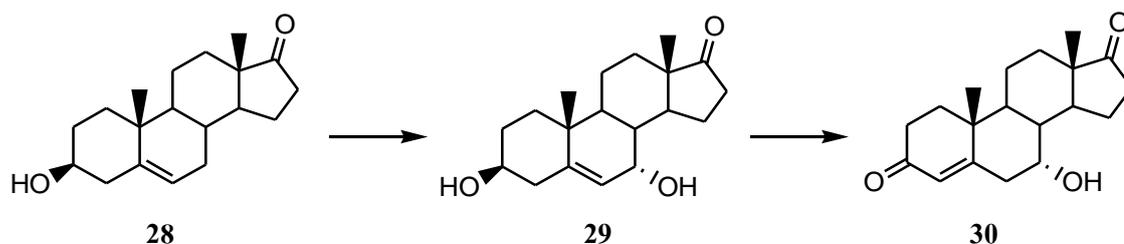


รูปที่ 3.15 แผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของเพรกนิน โน โลน 1 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ S หมายถึงสารตั้งต้น; M หมายถึง จุดผสมระหว่างสารตั้งต้นและสารสกัดหยาบ; Rx หมายถึง สารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างเพรกนิน โน โลน 1 กับเชื้อรา

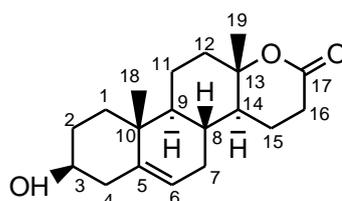
แต่ในการทดลองนี้ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 มีความยากในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราให้ได้ในระยะที่เหมาะสมต่อการนำไปทำการทดลองในขั้นตอนการเติมสารตั้งต้นเพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยา ในการเลี้ยงเชื้อรา *C. globosum* TISTR 3093 บางชุดการทดลองพบว่า เม็ดเซลล์ของเชื้อมีขนาดเล็กไม่สมบูรณ์ และมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมได้ง่าย ทำให้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลการทดลองในแต่ละชุดจะเกิดขึ้นแตกต่างกันด้วย แต่สิ่งที่สังเกตได้ว่าการทดลองแต่ละชุดนั้นมีสิ่งที่คล้ายคลึงกันคือจุดของสารบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent จะปรากฏจุดสีของสารหลายชนิดเกิดขึ้น และมีสารตั้งต้นเหลือปนอยู่ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Janeczko และคณะ[16] ได้รายงานผลการทดลองจากการนำเพรกนิน โน โลน 1 ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ได้จาก *Chaetomium* sp. KCH 6651 พบว่าเกิดสารผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันหลายชนิด และมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่น้อยมาก กล่าวได้ว่าจากการที่เพรกนิน โน โลน 1 เปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์หลายชนิดนั้นอาจเนื่องจากโครงสร้างของเพรกนิน โน โลน 1 ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันหลายหมู่ เช่นหมู่ไฮดรอกซิล (C-3) พันธะคู่ที่ตำแหน่ง C-5 และหมู่เมทิลคีโตนที่ตำแหน่ง C-20 ของวง D อย่างไรก็ตาม Janeczko และคณะ[16] ได้เสนอแนวทางการเกิดปฏิกิริยาของเพรกนิน โน โลน 1 เหมือนกับการเกิดปฏิกิริยาของ progesterone และ dehydroepiandrosterone (DHEA) 28 ซึ่งจัดเป็นกลุ่มสเตียรอยด์ชนิดเดียวกับเพรกนิน โน โลน 1 คือ

การมีพันธะคู่อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (a 5-en steroid compound) โดยจะมีการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลหรือเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันขึ้นที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-7 กลายเป็นตำแหน่งของแอลดีแอลกอฮอล์ และตามด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 เป็นหมู่คีโต ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.4

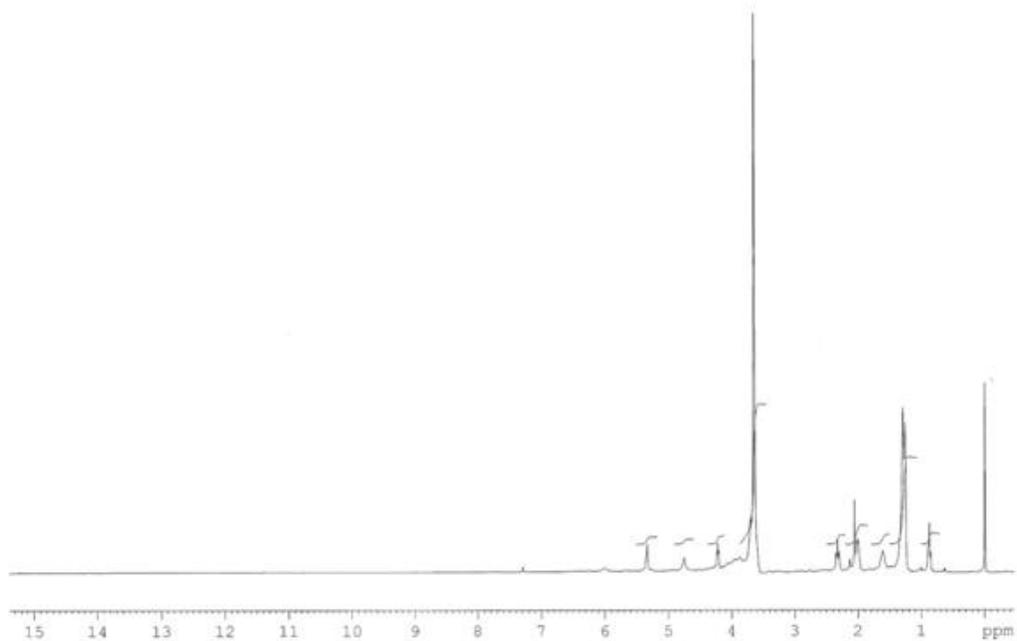
แผนภาพที่ 3.4



ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาของเพรกนินโนโลน **1** กับ *C. globosum* TISTR 3093 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่ามีจุดสารเกิดขึ้นหลายจุด แสดงในรูปที่ 3.15 และเมื่อทำการแยกเป็นสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารออกมาในปริมาณที่น้อยมากและยากต่อการแยกด้วยเทคนิคนี้ การศึกษาของผู้วิจัยจะทำได้โดยการพิจารณาจากผลของ ^1H NMR และ ^{13}C NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับผลทางทฤษฎี จากการข้อมูล ^1H NMR และ ^{13}C NMR พบว่าค่า δ นั้นแตกต่างจากข้อมูลที่ Janeczko และคณะ [16] ได้นำเสนอไว้จากการทดลองเพรกนินโนโลน **1** ไม่ได้เปลี่ยนเป็นสาร **29** แต่ข้อมูลที่ได้จะมีโครงสร้างใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลงของหมู่คีโตที่คาร์บอนตำแหน่ง C-20 ที่วง D ของเพรกนินโนโลน **1** เป็นหมู่เอสเทอร์เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์คือ 3β -hydroxy- 17α -oxa-D-homo-androst-5-en-17-one **17** พิจารณาจากสเปกตรัมของ ^{13}C NMR ไม่ปรากฏสัญญาณตำแหน่งสัญญาณของคาร์บอนตำแหน่งที่ C-20 ของเพรกนินโนโลน **1** ที่ δ 209.6 ppm แต่ปรากฏสัญญาณที่ δ 174.6 ppm ซึ่งเป็นค่า δ ของคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ ข้อมูลทางนิวเคลียสมกเนติกเรโซแนนซ์ของสาร **17** จากรูปที่ 3.16 แสดงสเปกตรัม ^1H NMR ของสารสกัดหยาบที่มีสาร **17** ปนอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก พบว่า ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.70 (1H, m, H-3), 5.34 (1H, s, H-6), 0.65 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-19) โปรตอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 2.77 ถึง 0.88 ppm เป็น multiplet ของหมู่ methyl methylene และ methyne

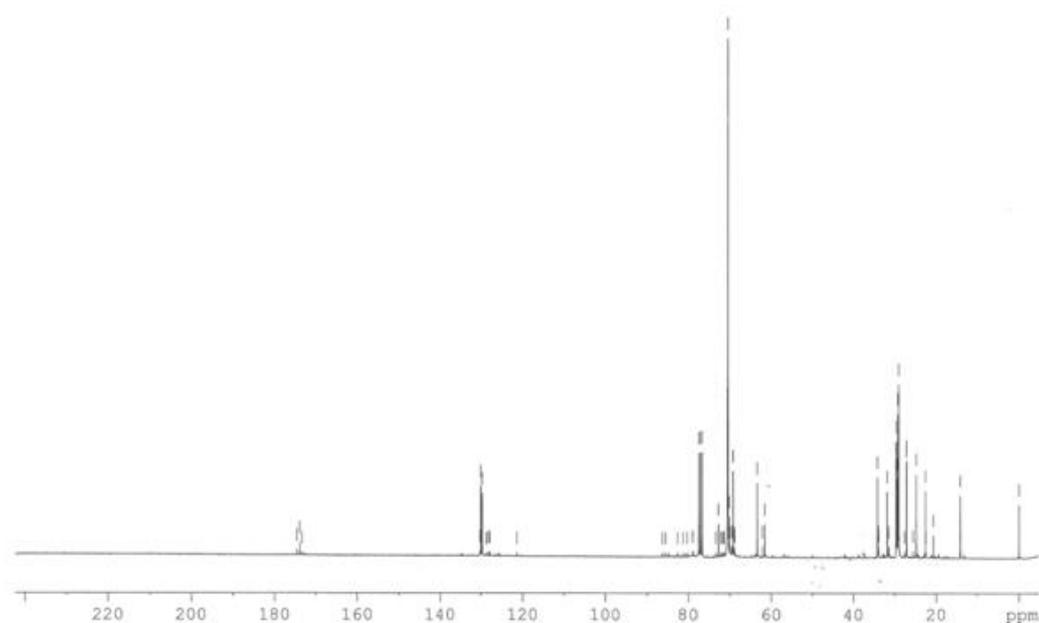


17



รูปที่ 3.16 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างเพรกนิน โนโลน 1 กับ
C. globosum TISTR 3093

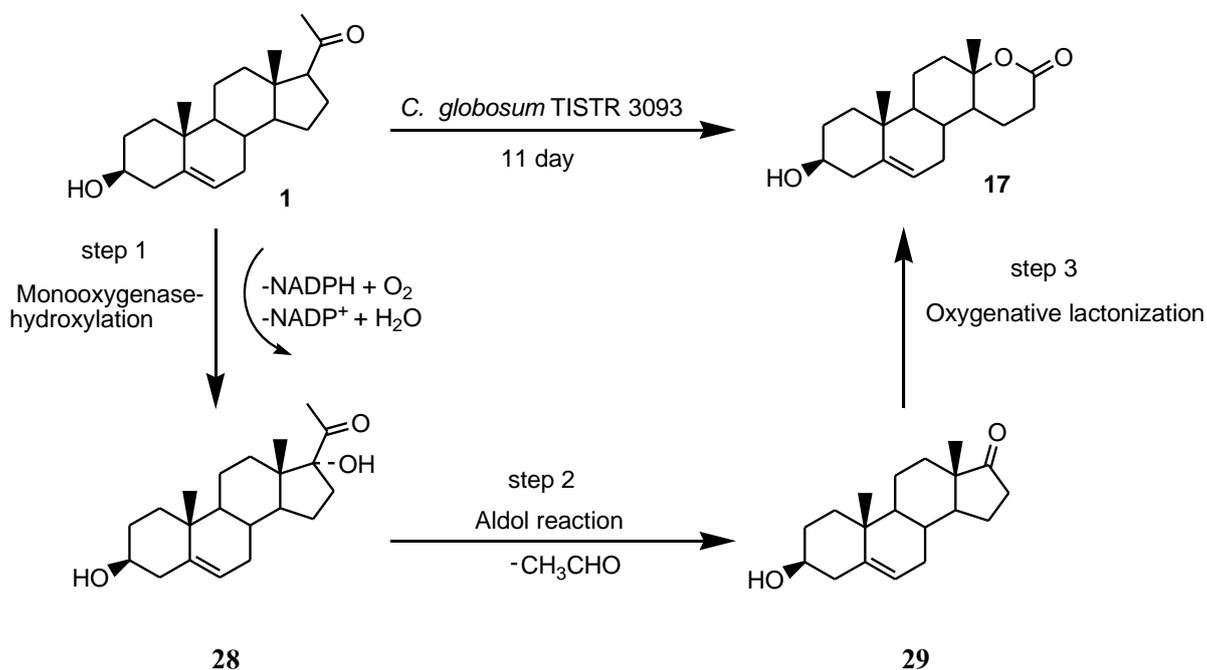
และรูปที่ 3.17 แสดงสเปกตรัม ^{13}C -NMR ของสาร 17 พบว่า ^{13}C NMR (75.5 MHz): δ 174.5 (C-17), 14.0 (C-18), 21.0 (C-19) คาร์บอนที่อยู่ในช่วงค่า δ เท่ากับ 130.22 ถึง 29.77 ppm เป็นของหมู่ methyl methylene และ methyne



รูปที่ 3.17 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างเพรกนิน โนโลน 1 กับ
C. globosum TISTR 3093

Kolek และคณะ[15, 23] ได้อธิบายการเกิดปฏิกิริยา Biotransformation ของเพรกนินโนโลน 1 ด้วยเชื้อ *Penicillium camemberti* AM 83 และได้เสนอกลไกของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแบบ Baeyer–Villigerbiooxidation (BV biooxidation) โดยการใช้เอนไซม์ที่มีชื่อเรียกทั่วไปว่า Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเฉพาะที่เกิดขึ้นที่วง D ของสเตียรอยด์ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.5 เริ่มจากขั้นตอนที่ 1 เกิด monooxygenase hydroxylation ขั้นตอนที่ 2 มีการขจัด acetaldehyde และเกิด oxygenative lactonization ในขั้นตอนสุดท้าย จากการทดลองพบว่าได้ต้องใช้ เวลา 11 วันจะได้สารผลิตภัณฑ์ปริมาณมากที่สุดดังแผนภาพที่ 3.5 ข้อเสนอแนะผลการทดลองที่ อาจจะกล่าวได้ว่า *C. globosum* TISTR 3093 สามารถปล่อยเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ขึ้นที่วง D เปลี่ยนเป็นวงแลคโตน คือสังเกตุได้จากขณะทำการสกัดแยกคือมีกลิ่นของกรดแอซิดิก เกิดขึ้น และผลจาก ^1H NMR ปรากฏโปรตอนของกรด (acidic proton) เห็นพีกเป็น br. singlet ปน อยู่ การเกิดกรดแอซิดิกอาจเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาขั้นตอนที่สองคือการเกิด Aldol reaction ที่มีการ กำจัดหมู่เมทิลคีโตนออกในรูปของแอเซตทาลดีไฮด์ (CH_3CHO) และแอเซตทาลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจะถูก ออกซิไดส์ต่อเป็นกรดแอซิดิก (CH_3COOH) ด้วยเอนไซม์ที่เกิดจากเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093

แผนภาพที่ 3.5



3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะทำการทดสอบเฉพาะกรดดีไฮโดรโคลิค **14** กับ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** เท่านั้น เนื่องจากไม่สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาของเพรกนินโนโลน **1** กับเอนไซม์จากเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 ได้ในรูปของสารบริสุทธิ์

3.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืช

ทดสอบ

ในการทดสอบผลของกรดดีไฮโดรโคลิค **14** และ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** ต่อพืชทดสอบ 2 ชนิด คือ ผักโขมจีน และหญ้าข่าวนก โดยวิธี Vial Test ผลการทดสอบแสดงได้ดังนี้

ผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของผักโขมจีน

ผลต่อการงอกของผักโขมจีน

กรดดีไฮโดรโคลิค **14** มีผลต่อการยับยั้งการงอกได้ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm โดยสามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่สาร **25** ไม่มีผลต่อการงอกของผักโขมจีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลต่อการเจริญเติบโตของผักโขมจีน

ในด้านความยาวต้นพบว่า กรดดีไฮโดรโคลิค **14** ที่ระดับความเข้มข้น 125 250 500 และ 1,000 ppm มีผลต่อการยับยั้งความยาวต้นได้ 33.93 3.37 27.78 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่สาร **25** ไม่มีผลต่อความยาวต้นของผักโขมจีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในด้านความยาวรากพบว่า กรดดีไฮโดรโคลิค **14** ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1,000 ppm มีผลต่อการยับยั้งความยาวต้นได้ 64.63 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่สาร **25** ไม่มีผลต่อความยาวรากของผักโขมจีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าข่าวนก

ผลต่อการงอกของหญ้าข่าวนก

กรดดีไฮโดรโคลิค **14** และสาร **25** ไม่มีผลต่อการงอกของผักโขมจีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ทุกระดับความเข้มข้น

ผลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าข้าวนก

ในด้านความยาวต้นพบว่า กรดดีไฮโดรโคลิค **14** ที่ระดับความเข้มข้น 125 ppm มีผลต่อการยับยั้งความยาวต้นได้ 10.44 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สาร **25** ไม่มีผลต่อความยาวต้นของหญ้าข้าวนกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในด้านความยาวรากพบว่า กรดดีไฮโดรโคลิค **14** มีผลต่อการส่งเสริมความยาวรากที่ระดับความเข้มข้น 250-500 ppm โดยที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 ppm สามารถส่งเสริมได้ 35.36 และ 20.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีผลต่อการยับยั้งความยาวรากได้ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm โดยสามารถยับยั้งได้ 9.82 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สาร **25** ไม่มีผลต่อความยาวรากของหญ้าข้าวนกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

นำ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นเปรียบเทียบกับกรดดีไฮโดรโคลิค **14** ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) พบว่าสาร **25** ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1 เนื่องจากไม่ได้มีการแยกสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างเพรกนินโนโลน 1 กับเอนไซม์ของ *C. globosum* TISTR 3093 จึงไม่ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสาร 25 เปรียบเทียบกับ
กับกรดดีไฮโดร โคลิก 14

ลำดับ	สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/ml)	บริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)						comment
			<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	
1	14	10	0	0	0	0	0	0	Inactive
		1	0	0	0	0	0	0	
		0.5	0	0	0	0	0	0	
2	25	10	0	0	0	0	0	0	Inactive
		1	0	0	0	0	0	0	
		0.5	0	0	0	0	0	0	

3.2.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบนี้ทำการทดสอบเฉพาะสเต็มเซลล์ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7) และเซลล์ปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero) ด้วยวิธี MTT assay (Primary screening) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเพรกนิน โนโลน 1 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ค่าความเป็นพิษมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (40.65%) ส่วนกรดดีไฮโดร โคลิก 14 ทดสอบด้วยวิธี REMA (Resazurin Microplate assay) กับเซลล์ MCF7-Breast cancer เปรียบเทียบกับตัวยาค ellipticine และ doxorubicine พบว่ากรดดีไฮโดร โคลิก 14 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม

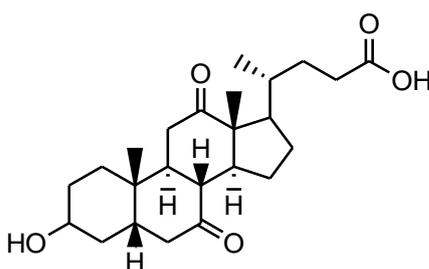
บทที่ 4

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

4.1 ผลของการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเพรกนินโนโลน 1 และกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 ด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biotransformation)

จากการศึกษาการเปลี่ยนรูปด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biotransformation) พบว่าอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 และ *C. globosum* TISTR 3093 คือ 3% glucose : 1% peptone ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้งสองชนิดพบว่า *F. solani* TISTR 3436 จะเลี้ยงได้ง่ายและจำนวนวันในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า ทำให้สามารถควบคุมสภาวะได้ดีกว่า *C. globosum* TISTR 3093 ที่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานกว่า ซึ่งจะเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากสภาวะแวดล้อม

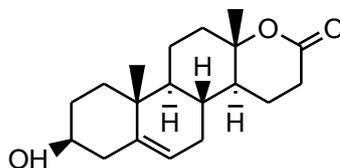
เมื่อนำเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 ทำปฏิกิริยากับกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน *F. solani* TISTR 3436 จะปลดปล่อยเอนไซม์ reductase เข้าทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงที่หมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-3 ได้สารผลิตภัณฑ์คือ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid 25 และเมื่อปฏิกิริยาดำเนินต่อไปมากกว่า 7 วัน พบว่าหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่ง C-3 C-7 และ C-12 ของกรดดีไฮโดรโคคลิก 14 ถูกรีดิวส์เป็นหมู่ไฮดรอกซิลเกิดเป็นกรดโคคลิก 26 และเมื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นเพรกนินโนโลน 1 ทำปฏิกิริยาที่สภาวะเดียวกันพบว่า เอนไซม์จาก *F. solani* TISTR 3436 จะรีดิวส์หมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ C-20 เปลี่ยนเป็นหมู่ไฮดรอกซิลเพียงตัวเดียวเท่านั้น ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อรา *F. solani* TISTR 3436 จะผลิตเอนไซม์ reductase ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันขึ้นได้



25

เมื่อเปลี่ยนใช้เชื้อรา *C. globosum* TISTR 3093 ทำปฏิกิริยากับเพรกนินโนโลน 1 พบว่า *C. globosum* TISTR 3093 จะปลดปล่อยเอนไซม์ oxidase ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบ Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาเฉพาะที่เกิดขึ้นที่วง D ของสเตียรอยด์ โดยปฏิกิริยาเกิดผ่านการแตกพันธะระหว่างคาร์บอนที่ตำแหน่ง 17 กับหมู่เมทิลคีโตนเกิดเป็นวงแลคโตนขึ้น ได้สารผลิตภัณฑ์ที่ชัดเจนและใกล้เคียงกับโครงสร้างของ 3 β -Hydroxy-17 α -oxa-D -

homo-androst-5-en-17-one **17** แต่เนื่องจากมีสารผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นหลายชนิดและในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันมากจึงไม่ได้ทำการแยกสารผลิตภัณฑ์



17

4.2 ผลการทดสอบทางชีวภาพ

4.2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าพืชทดสอบ

ในการทดสอบผลของกรดดีไฮโดรโคลิค **14** และ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** ของพืชทดสอบ 2 ชนิด คือ ผักโขมจีน และหญ้าข้าวนก โดยวิธี Vial Test พบว่า กรดดีไฮโดรโคลิค **14** มีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตต่อผักโขมจีนที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 1,000 ppm โดยสามารถยับยั้งการงอกได้อย่างสมบูรณ์ แต่ไม่มีผลต่อการงอกของหญ้าข้าวนก ในด้านการเจริญเติบโตกรดดีไฮโดรโคลิคสามารถส่งเสริมความยาวรากที่ระดับความเข้มข้น 250-500 ppm สามารถส่งเสริมได้ 35.36 และ 20.71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีผลต่อการยับยั้งความยาวรากได้ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm โดยสามารถยับยั้งได้ 9.82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสาร **25** ไม่มีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชทดสอบทั้งสองชนิด

4.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

เมื่อนำ 3-hydroxy-7,12-diketo-5 β -cholan-24-oic acid **25** มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นเปรียบเทียบกับกรดดีไฮโดรโคลิค **14** ซึ่งประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยใช้วิธีทดสอบแบบ Disc diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ากรดดีไฮโดรโคลิค **14** และ สาร **25** ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว

4.2.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อนำเพรกนินโนโลน **1** และกรดดีไฮโดรโคลิค **14** ถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7) และเซลล์ปกติ (African green

monkey kidney fibroblast, Vero) ด้วยวิธี MTT assay (Primary screening) ที่ระดับความเข้มข้นในการทดสอบเบื้องต้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเพรกนินโนโลน 1 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ค่าความเป็นพิษมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (40.65%) ส่วนกรดไฮโดรคลอริก 14 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเต้านม เมื่อเปรียบเทียบกับตัวยา ellipticine และ doxorubicine

4.3 ข้อเสนอแนะ

การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของสเตียรอยด์โดยวิธีทางชีวภาพ เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการสังเคราะห์ทางเคมีอินทรีย์ ข้อดีของวิธีนี้คือเป็นการลดการใช้สารเคมี ที่อันตรายและเป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม มีต้นทุนที่ต่ำกว่า และสามารถประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารปริมาณมากได้ ซึ่งเหมาะกับการสังเคราะห์สารในขั้นอุตสาหกรรม จากงานวิจัยนี้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ยังไม่ถูกรายงานในเรื่องของการทำหน้าที่เป็นตัวเร่งชีวภาพ (Biocatalyst) เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *F. solani* TISTR 3436 จัดเป็นเอนไซม์ reductase ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันและที่น่าสนใจคือสามารถทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับหมู่คาร์บอนิล (หมู่คีโต) โดยสามารถกำหนดการเข้าทำปฏิกิริยาในแต่ละหมู่ได้จากวันที่ทำปฏิกิริยา สารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสเตอริโอเคมีที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งเหมาะสมกับการนำไปพัฒนาในการเตรียมเป็นสเตียรอยด์ตั้งต้น เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ด้วยชนิดอื่นต่อไป ส่วนเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 จัดเป็นเอนไซม์ oxidase ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากการวิเคราะห์ด้วย ^1H NMR และ ^{13}C NMR สารสกัดหยาบของปฏิกิริยาของปฏิกิริยาระหว่างเพรกนินโนโลน 1 และเอนไซม์จากเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 พบว่าเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบ Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) เฉพาะที่วง D ของเพรกนินโนโลน 1 ซึ่งเป็นแนวทางการเตรียมสเตียรอยด์แลคโตนอีกวิธีหนึ่ง แต่เนื่องจากการควบคุมสถานะในการเลี้ยงเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 ทำได้ยากกว่าของเชื้อ *F. solani* TISTR 3436 จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์หลายชนิดและปริมาณที่น้อย ซึ่งทำให้ยากต่อการแยกในรูปสารบริสุทธิ์ สิ่งที่ต้องระวังคือ อาจจะต้องมีการเปลี่ยนอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมมากกว่านี้ ค่า pH ของอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึง และการใช้เทคนิคในการแยกสารควรใช้เครื่องมือที่ทันสมัยอย่างเช่น เครื่อง HPLC หรือ เครื่อง GC-MS มาใช้ในการแยกสารเพื่อให้ทราบถึงชนิดของสารผลิตภัณฑ์เบื้องต้นก่อน

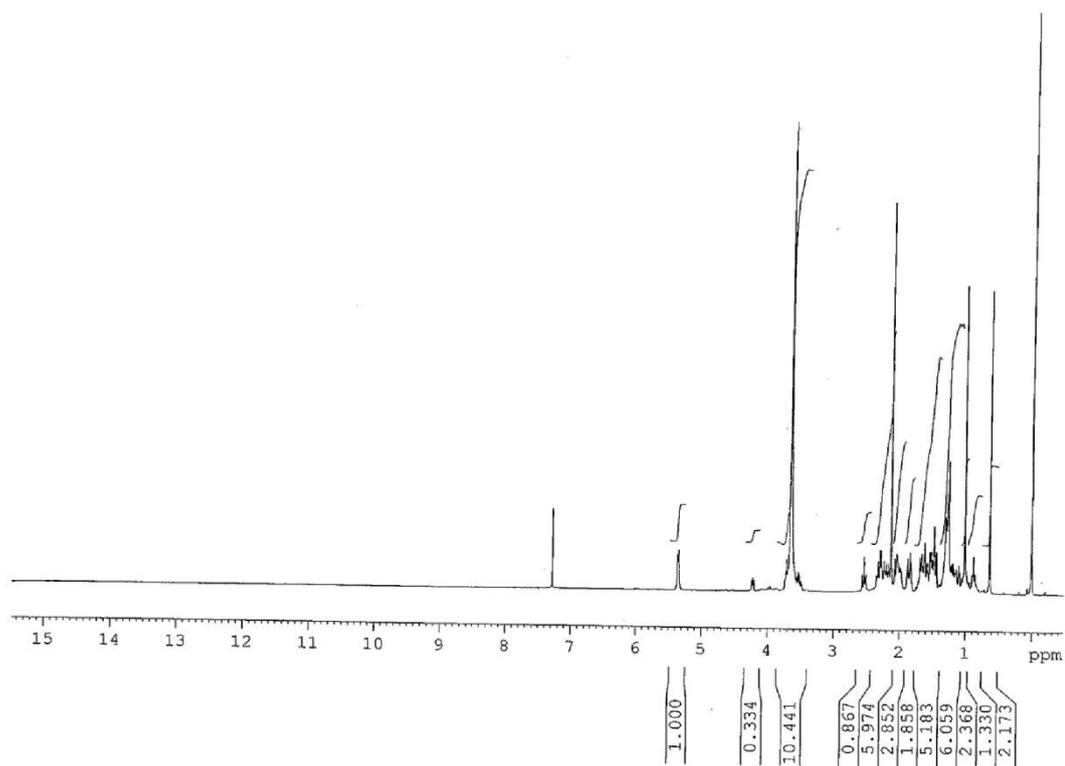
บรรณานุกรม

- [1] D. P Judal., R Chattopadhaya., S.Guleria, and R. Gupta. 2003. Synthesis and antineoplastic activity of 2-alkylaminoethyl derivatives of various steroidal oxime, **European Journal of Medicinal Chemistry**, **38**, pp. 1025-1034.
- [2] ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1 กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล 2563.
- [3] R. J. Simmonds, **Chemistry of Biomolecules: An Introduction**, Billing & Sons Ltd., Worcester, 1997.
- [4] A. P. Antonckick., B. Schneider, V. N. Zhabinski, O. V. Konstantinova and V. A. Khripach. 2003 Biosynthesis of 2,3-epoxybrassinosteroids in seedling of *Secale cereale*, **Phytochemistry**, **63**, pp. 771-776.
- [5] I. M. Chung, M. Ali, T. D. Khanh, M. G. Choung, H. Park and A. Ahmad. 2006. New Stigmastane Steroids Constituents from Rice Hulls of *Oryza sativa* and Inhibitory Activity on Radish Seed, **Bull. Korean Chem. Soc.** Vol. 27, No. 1, pp. 93-98.
- [6] F. A. Macias, N. Chinchilla, R. M. Varela and J. M. G. Molinillo. 2006. Bioactive Steroids from *Oryza sativa* L., **Steroids**, **71**, pp. 603-608.
- [7] W. Prabpayak, P. Charoenying, C. Laosinwattana and Nuntana Aroonrerk. 2006. Antibacterial of Pregnenolone Derivatives, **KMITL Sci.**, Vol. 6, No 2b: 466-470.
- [8] G. Santos, A. G. Murray, C. A. Pujol, E. B. Damonte and M. S. Maier. 2003. Synthesis and antiviral activity of sulfate and acetylated derivatives of 2 β , 3 α -dihydroxy-5 α -cholestane, **Steroids**, **68**, pp. 125-132.
- [9] พยีส สายหล้า, พรชนัน ปราบมาก และศิรินภา สิทธิโชติ. 2553. การเปลี่ยนรูปของสเตียรอยด์ โดยจุลินทรีย์ *Chaetomium globosum* TISTR 3039 และ *Fusarium solani* TISTR 3436. โครงการงานพิเศษ สาขาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [10] S. Hu, G. Genain and R. Azerad. 1995., Microbial Transformation of Steroids Contribution to 14 α -hydroxylations, **Steroids**, **60**, pp. 337-352.
- [11] S. B. Mahato, S Garai. 1997. Advances in Microbial Steroid. Biotransformation Steroids, **Steroids**, **62**, 332-345.

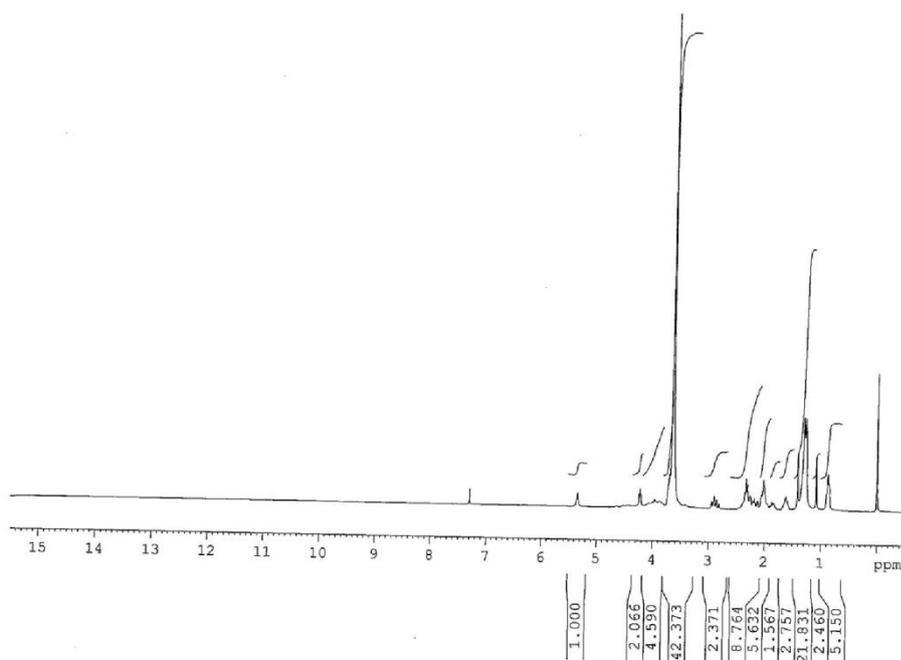
- [12] O. Bortolini, A. Medici, and S. Poli. 1997. Biotransformations on Steroid nucleus of Bile Acids, **Steroid**, 2, pp. 564-577.
- [13] G. Cravotto, A. Binello, L. Boffa, O. Rosati, M. Boccalini and S. Chimichi. 2008. Regio- and Stereoselective Reductions of Dehydrocholic Acid, **Steroids**, 71, pp.469-475.
- [14] M. R. Wilson, W. A. Gallimore and P. B. Reese. 1999. Steroid Transformation with *Fusarium oxysporum* var. *cubense* and *Colletotrichum musae*, **Steroids**, 64, pp. 834-843.
- [15] T. Kolek, A. Szpineter and A. Swizdor. 2008. Baeyer-Villiger Oxidation of DHEA, Pregnenolone, and Androstenedione by *Penicillium lilacinum* AM 111, **Steroids**, 73, pp. 1441-1445.
- [16] T. Janeczko, J. Dmochowska-Gtadysz, E. Kostrzewa-Suslow, A. Bialonka and Z. Ciunik. 2009. Biotransformation of Steroid Compounds by *Chaetomium* sp. KCH 6651, **Steroids**, 74, pp. 657-661.
- [17] A. Al-Aboudi, M Y. Mohammad, S. Haddad, R. Al-Far, M. Iqbal Choudhary and A. Raiman. 2009. Biotransformation of Methyl Chloate by *Aspergillus niger*, **Steroids**, 74, pp. 483-486.
- [18] C. Changtam, O. Sukcharoen, B. Yingyongnaronkul, N. Chimnoi, and A. Suksamrarn. 2008. Functional Group-Mediated Biotransformation by *Curvularia lunata* NRRL 2178: Synthesis of 3-Dehydro-2-Deoxy-Ecdysteroids from the 3-Hydroxy-2-Mesyloxy Analogues, **Tetrahedron**, 64, pp. 2626-2633.
- [19] ภาควิชาจุลชีววิทยา. 2536. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยา**. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- [20] G. F. Eshrat and C. Aroona. 2011. Biotransformation of Progesterone by *Penicillium aurantiogriseum*, **Research Journal of Microbiology**, 6:1, pp. 98-104.
- [21] Z. Szendi, P. Forgo and F. Sweet. 1995. Complete ¹H and ¹³C NMR Spectra of Pregnenolone. **Steroids**, 60, pp. 442-446.
- [22] D. V. Waterhous, S. Barnes and D. D. Muccio. 1985. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Bile Acids. Development of Two-Dimensional NMR Methods for The Elucidation of Proton Resonance Assignments for Five Common Hydroxylated Bile Acids, and Their Parent bile Acid, SP-Cholanoic Acid. **Journal of Lipid Research**, 26, pp. 1068-1078.

- [23] T. Kolek, A. Szpineter and A. Swizdor. 2009. Studies on Baeyer–Villiger Oxidation of Steroids: DHEA and Pregnenolone D-Lactonization Pathways in *Penicillium camemberti* AM 83. *Steroids*, 74, pp. 859-862.

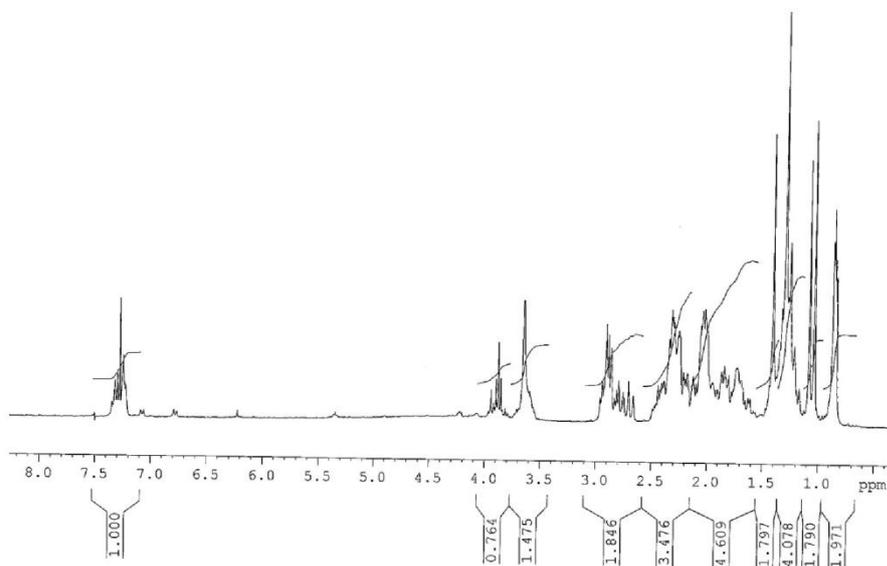
ภาคผนวก



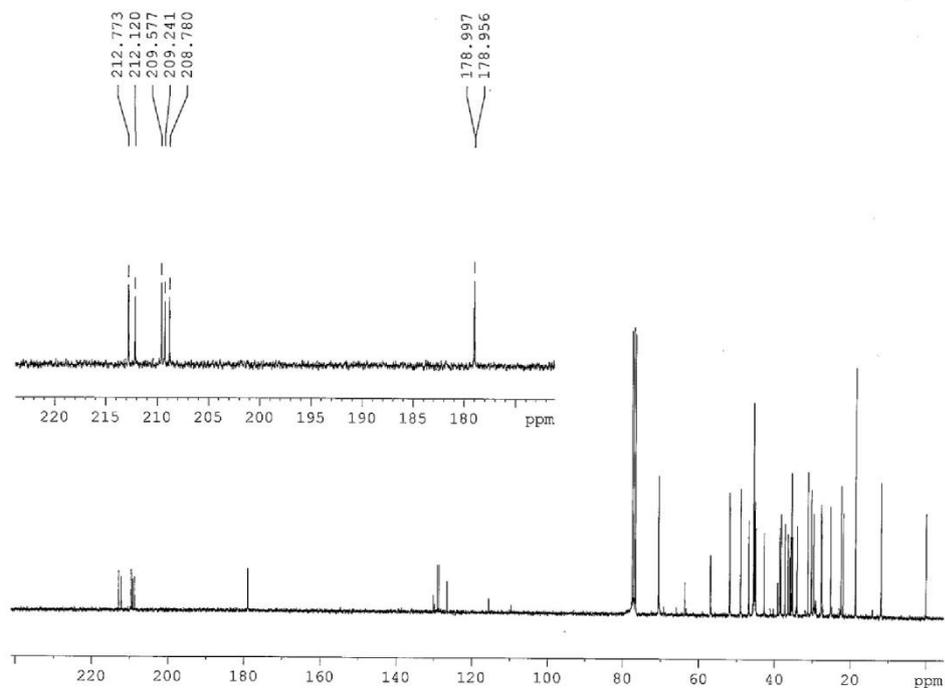
รูปที่ ผ.1 ^1H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหายาจากเพรกนิน โน โลน 1 และอาหารเหลว PDB



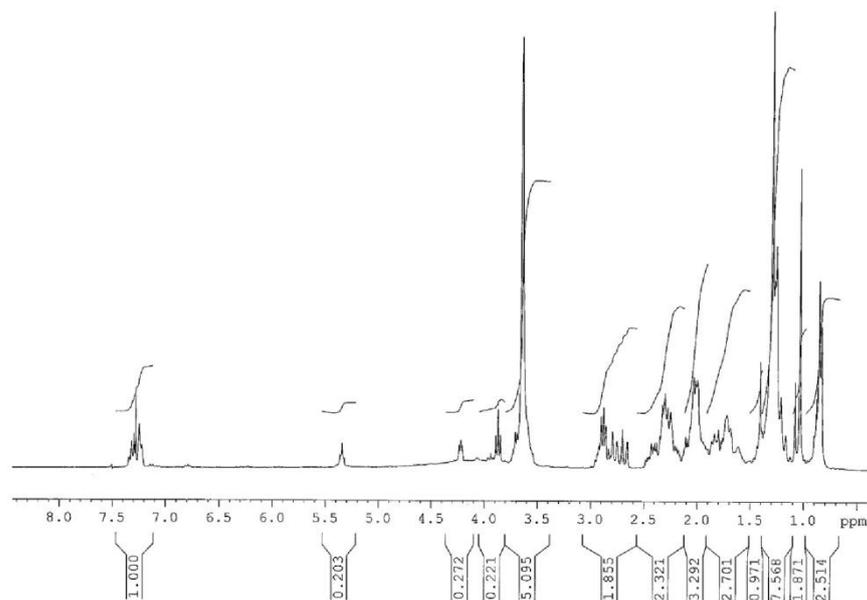
รูปที่ ผ.2 ^1H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหายาจากกรดดีไฮโดร โคลิก 14 และอาหารเหลว PDB



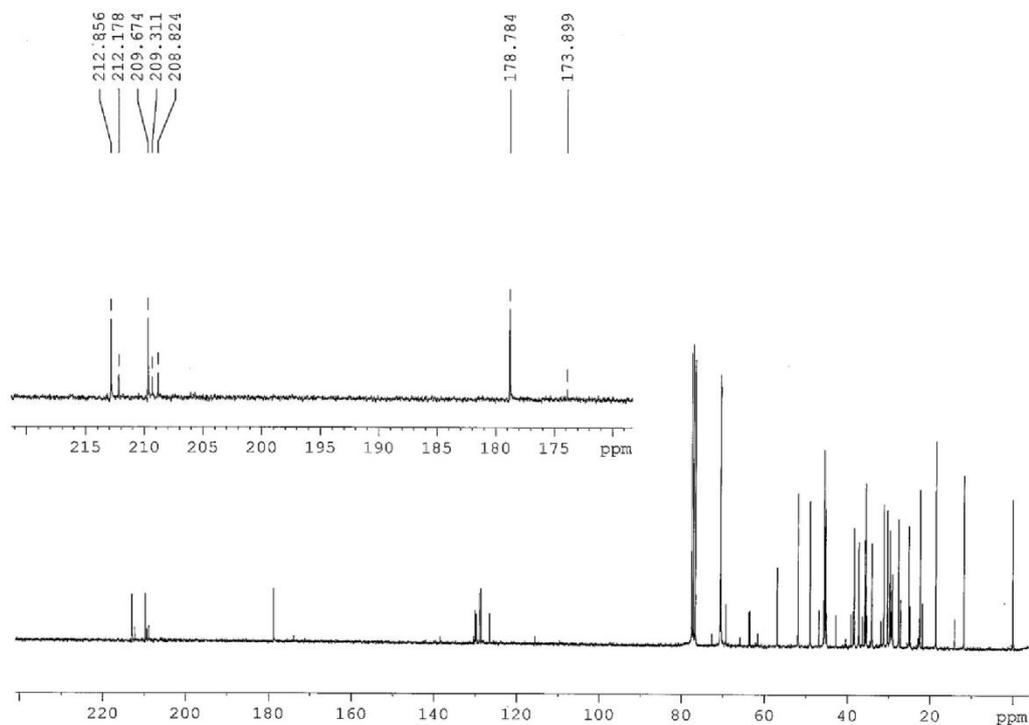
รูปที่ ผ.3 ^1H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดร โคลิก 14 และเชื้อ *F. solani* TISTR 3436 ในวันที่ 5



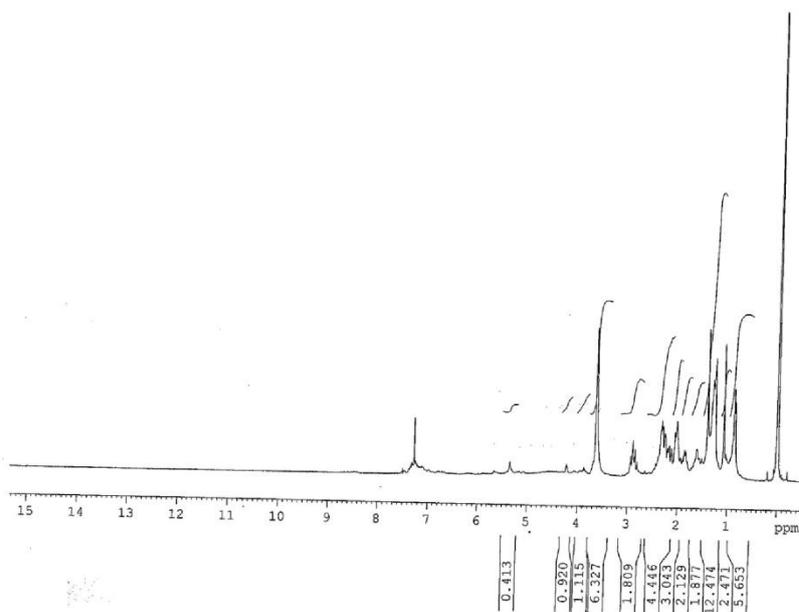
รูปที่ ผ. 4 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดร โคลิก 14 และเชื้อ *F. solani* TISTR 3436 ในวันที่ 5



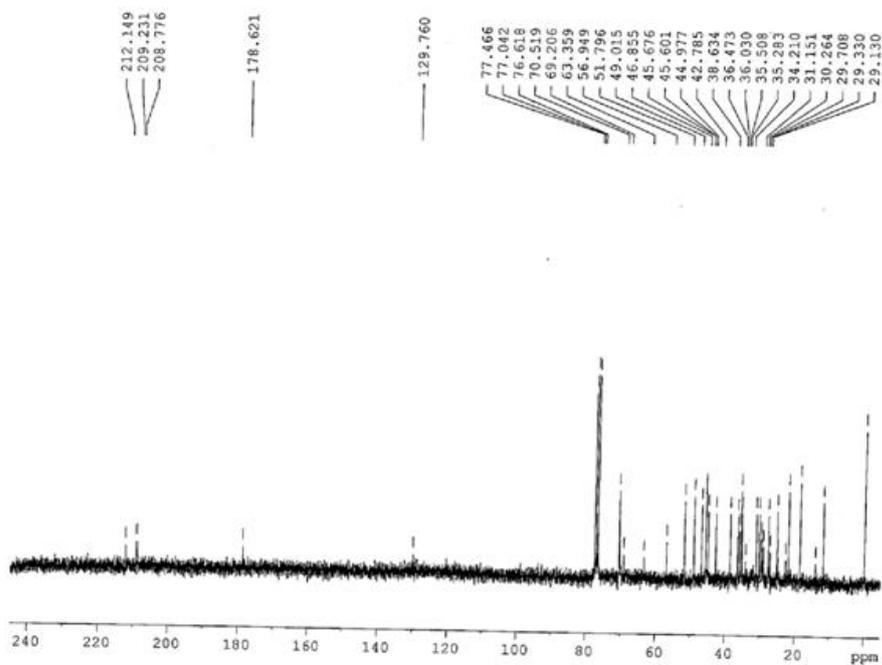
รูปที่ ๕ ^1H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคลิค 14 และเชื้อ *F. solani* TISTR 3436 ในวันที่ 7



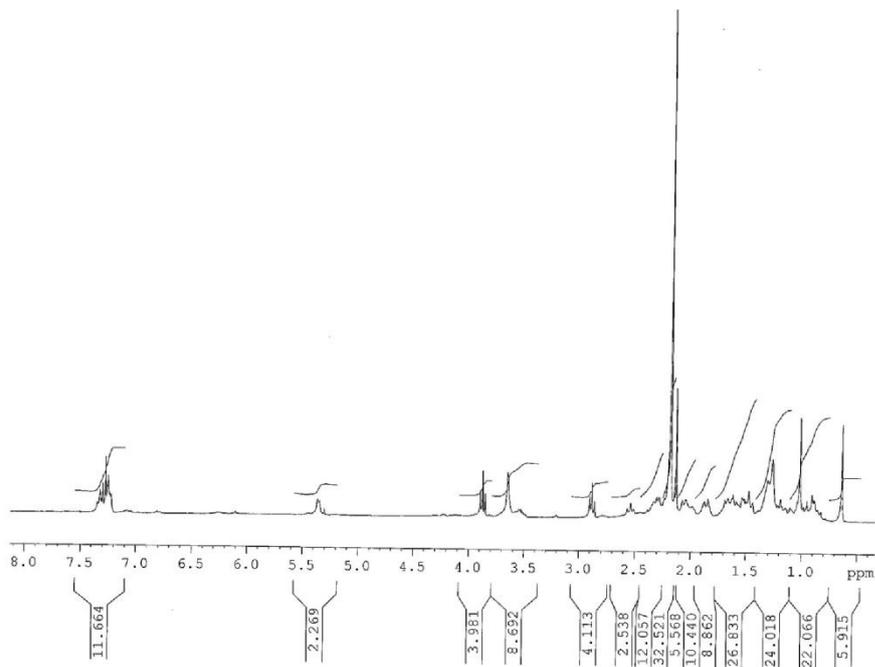
รูปที่ ๖ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดรโคลิค 14 และเชื้อ *F. solani* TISTR 3436 ในวันที่ 7



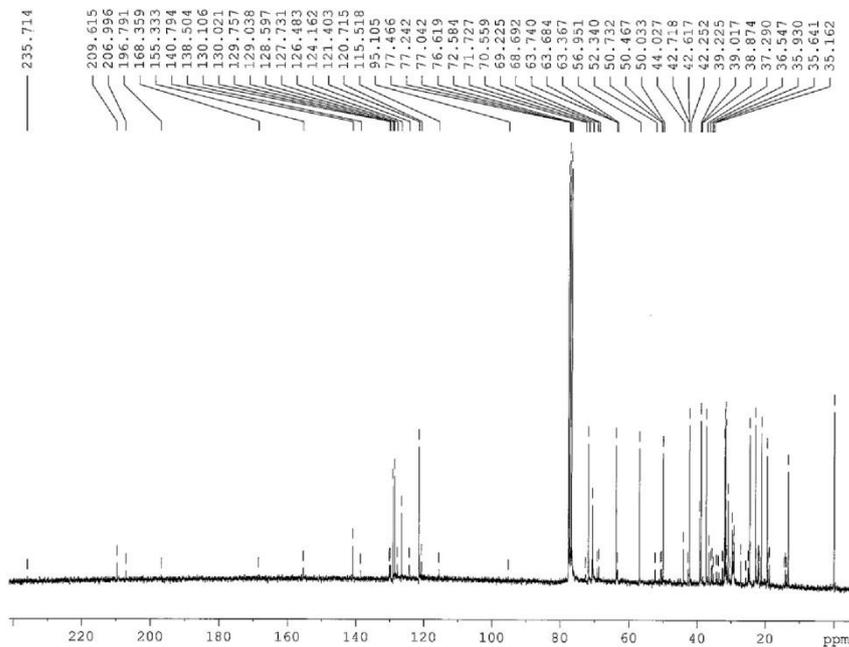
รูปที่ ๗. ^1H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดร โคลิก 14 และเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 ในวันที่ 7



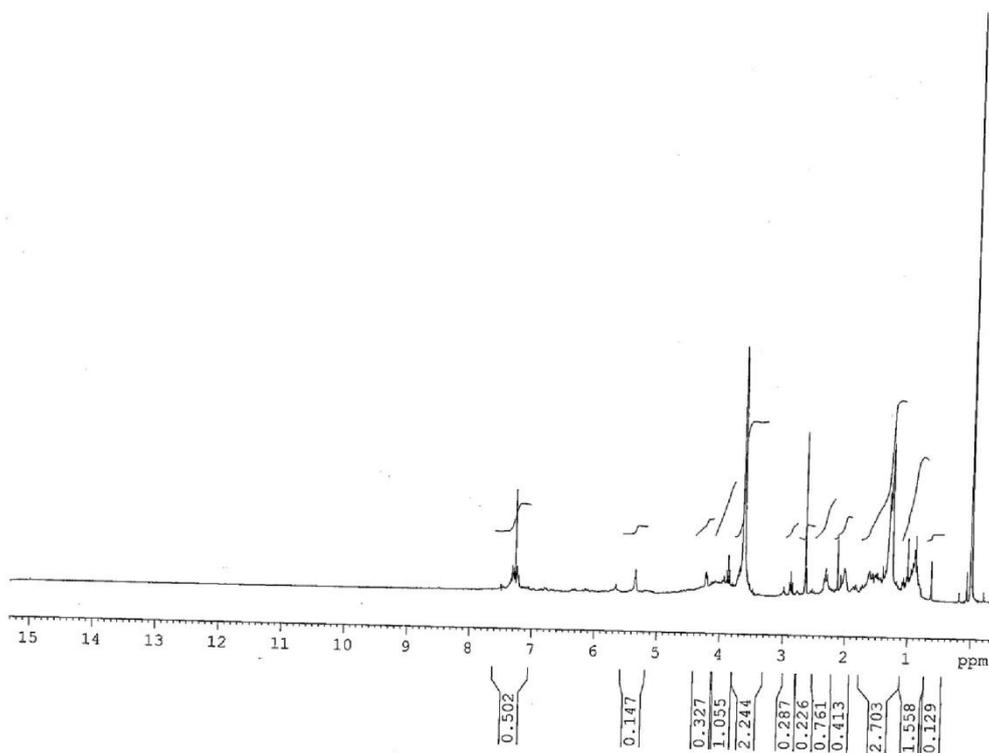
รูปที่ ๘. ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างกรดดีไฮโดร โคลิก 14 และเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 ในวันที่ 7



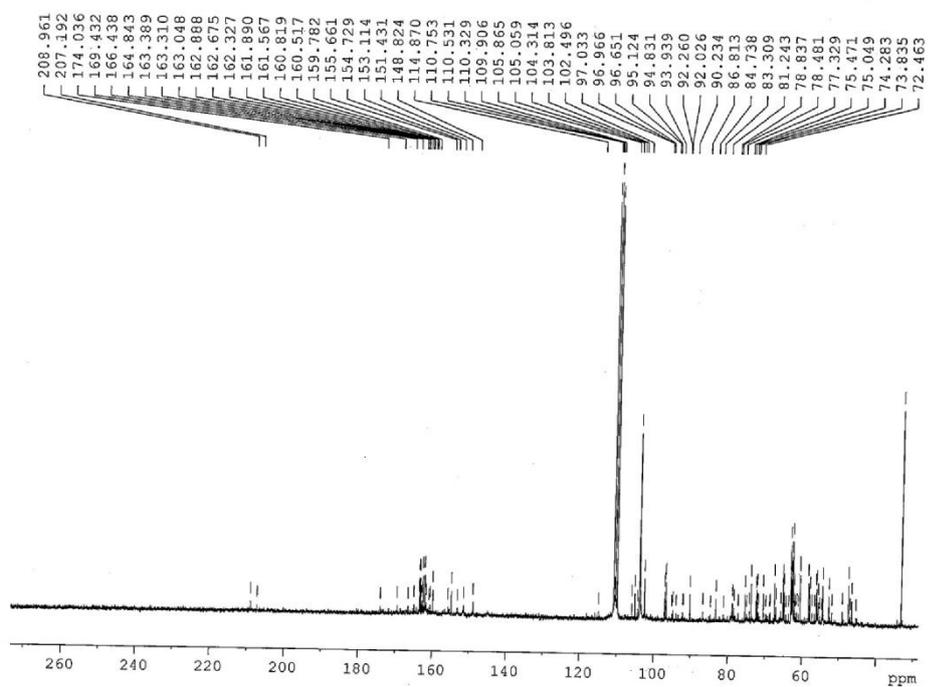
รูปที่ ผ. 9 ^1H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกริยาระหว่างเพรณิน โนโลน 1 และเชื้อ *F. solani* TISTR 3436 ในวันที่ 7



รูปที่ ผ. 10 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกริยาระหว่างเพรณิน โนโลน 1 และเชื้อ *F. solani* TISTR 3436 ในวันที่ 7



รูปที่ ๑๑. ^1H NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างเพรกนิน โนโลน 1 และเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 ในวันที่ 7



รูปที่ ๑๒. ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบจากปฏิกิริยาระหว่างเพรกนิน โนโลน 1 และเชื้อ *C. globosum* TISTR 3093 ในวันที่ 7