

7. ผลการทดลอง

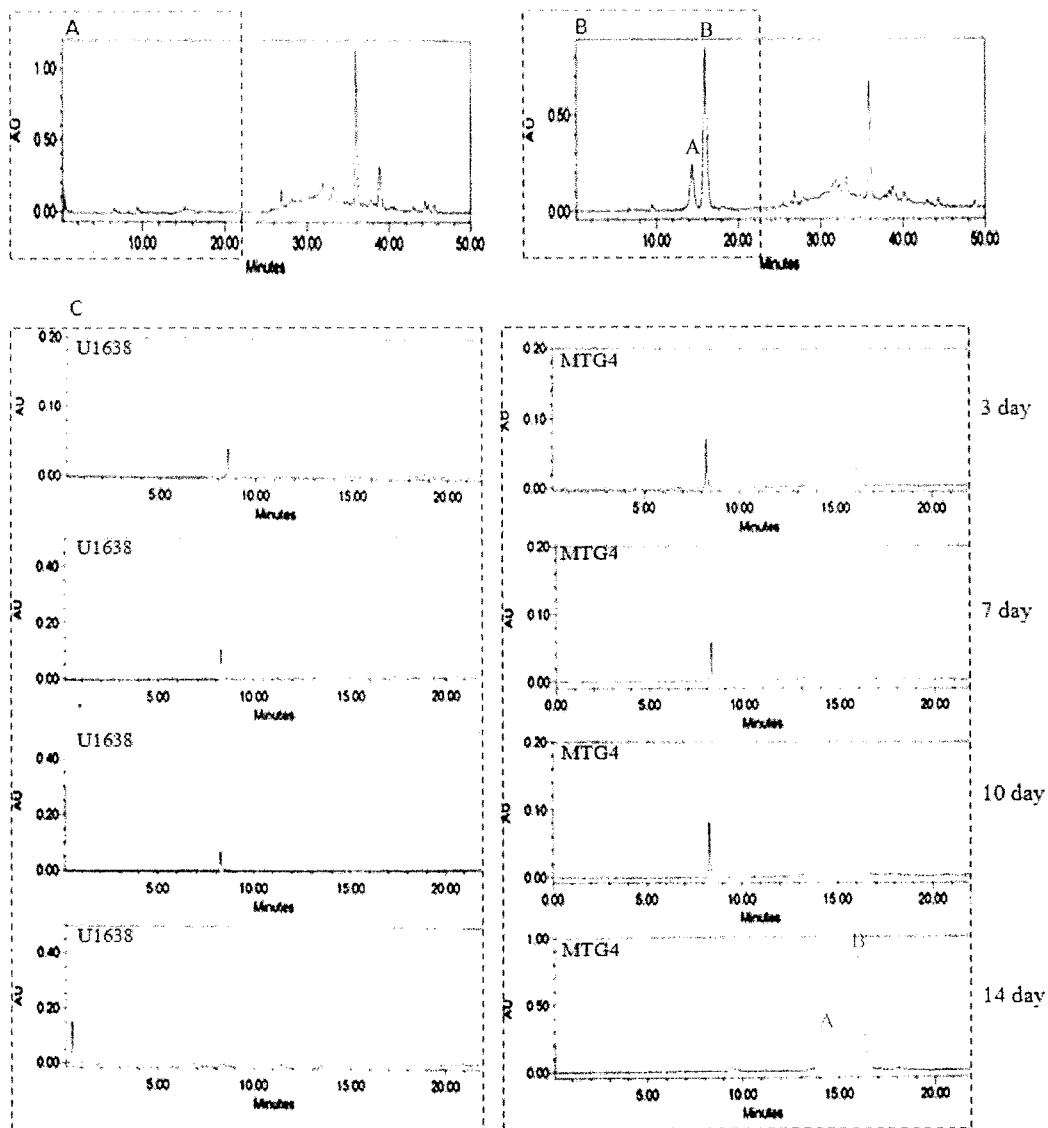
การวิจัยนี้ได้นำรา *A. oryzae* MTG4 มาเลี้ยงภายใต้สภาวะควบคุม เพื่อให้ราสังเคราะห์สาร Secondary metabolite ที่มีปริมาณมากพอสำหรับนำไปแยกสารให้บริสุทธิ์ เพื่อนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี โดยกระบวนการต่าง ๆ ในการทดลอง ทำได้ดังต่อไปนี้

7.1 การสังเคราะห์สาร Secondary metabolite ในรา *A. oryzae* MTG4 ในถังหมักขนาด 25 ลิตร

ในการทดลองนี้เป็นการเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) ให้มีปริมาณมากพอต่อการนำไปใช้ในการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์ (Purity) มากที่สุด เพื่อให้เหมาะต่อการแยกวิเคราะห์โครงสร้าง (Chemical structure elucidation) ของสารและมีค่าที่เชื่อถือได้ ด้วยกระบวนการต่าง ๆ โดยทำการเลี้ยงรา *A. oryzae* MTG4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB (1% malt extract, 0.1% Bacto peptone, 2% glucose, pH 6.5) ซึ่งได้ใช้หัวเชื้อสปอร์ของราที่มีความเข้มข้น 10^8 spore/L media นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C โดยเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm ตลอดการทดลอง ทำการเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวนาน 14 วัน จากนั้นทำการกรองแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บน้ำหมักที่ได้ไปสกัดแยกเอาสารสังเคราะห์ Secondary metabolite ด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate โดยใช้สัดส่วนน้ำหมักต่อตัวทำละลาย ในอัตราส่วน 1 : 2 เก็บชั้นตัวทำละลายที่นำจะมีสาร ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Evaporator) เก็บตะกอนสารที่ได้ ซึ่งจากการเลี้ยงเซลล์ในถังหมักขนาด 25 ลิตร และผ่านกระบวนการต่าง ๆ ข้างต้นแล้ว พบว่าสามารถเก็บตะกอนสารที่เป็น Crude extract ที่มีน้ำหนักแห้งรวมได้ประมาณ 1.2 g ซึ่งได้นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อตรวจสอบว่ามีสาร Secondary metabolite ที่ต้องการหรือไม่ โดยทำการเปรียบเทียบกับรา *A. oryzae* U1638 ซึ่งใช้เทคนิคการแยกสารตามหัวข้อที่ 6.2

ซึ่งได้เก็บตัวอย่างในวันที่ 3 7 10 และ 14 เพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาความแตกต่างของปริมาณสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น จากการทดลองพบว่า สาร secondary metabolite ที่แยกได้จากรา *A. oryzae* MTG4 จะสังเคราะห์สารที่ไม่พบในรา *A. oryzae* U1638 โดยจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าในน้ำหมักที่ได้จากรา *A. oryzae* MTG4 จะสามารถผลิตสารที่ไม่ทราบชนิด โดยพบที่เวลาที่ 14 และ 16 นาทีหลังการแยก ซึ่งจากการเก็บผลน้ำหมักไปวิเคราะห์ตามระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าสารทั้งสองชนิดจะถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดที่เวลา 14 วันหลังการเลี้ยง โดยจะเรียกสารทั้งสองชนิดว่า compound A และ compound B ตามลำดับ (รูปที่ 2)

จากรูปที่ 2 เป็นการแสดงผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบที่ได้จากรา *A. oryzae* U1638 และ MTG4 ด้วยเทคนิค HPLC โดยแสดงผล ณ เวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยง จากการทดลอง พบว่ารา *A. oryzae* MTG4 สามารถผลิตสาร secondary metabolite ที่ไม่พบในรา *A. oryzae* U1638 โดยพบที่เวลาที่ประมาณ 14 และ 16 นาทีหลังการแยก คือ compound A และ B ตามลำดับ และจากการทดลองพบว่าสารทั้งสองชนิดจะถูกสังเคราะห์ได้ตั้งแต่ระยะแรก ๆ ของการเลี้ยงและมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตลอดเวลา ซึ่งจะมีปริมาณสูงสุดที่วันที่ 14 หลังการเลี้ยง และจากการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณของสาร compound B มีค่าการดูดกลืนแสงที่ (OD) 210 nm มากกว่าสาร compound A ตลอดการทดลอง นั้นแสดงให้เห็นว่าสาร Compound B น่าจะมีปริมาณความเข้มข้นมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ผล HPLC profile ที่แสดงในรูปที่ 2 ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าสาร compound B จะมีปริมาณมากกว่าสาร compound A



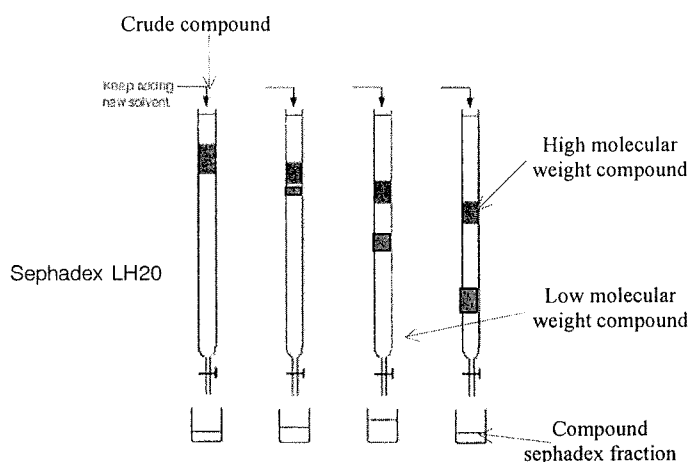
รูปที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้จากรา *A. oryzae* MTG4 ณ เวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยง โดยเปรียบเทียบกับรา *A. oryzae* U1638 ด้วยเทคนิค HPLC

ซึ่งจากการทดลองนี้ จึงได้ทำการเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* MTG4 ในถังหมักขนาด 25 ลิตร และได้แยกสกัดเอาสารสกัดหยาบในวันที่ 14 หลังการเลี้ยง สามารถแยกสกัดสารสกัดหยาบได้มากถึง 1.2 g ซึ่งสารสกัดหยาบที่ได้ จะถูกนำไปผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์ต่าง ๆ เพื่อให้ได้สาร compound A และ B ที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุด ก่อนที่จะนำสารทั้งสองชนิด ไปวิเคราะห์หาอัตลักษณ์ทางเคมีของสารดังกล่าวต่อไป

7.2 การแยกบริสุทธิ์สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค Sephadex LH20 column chromatography

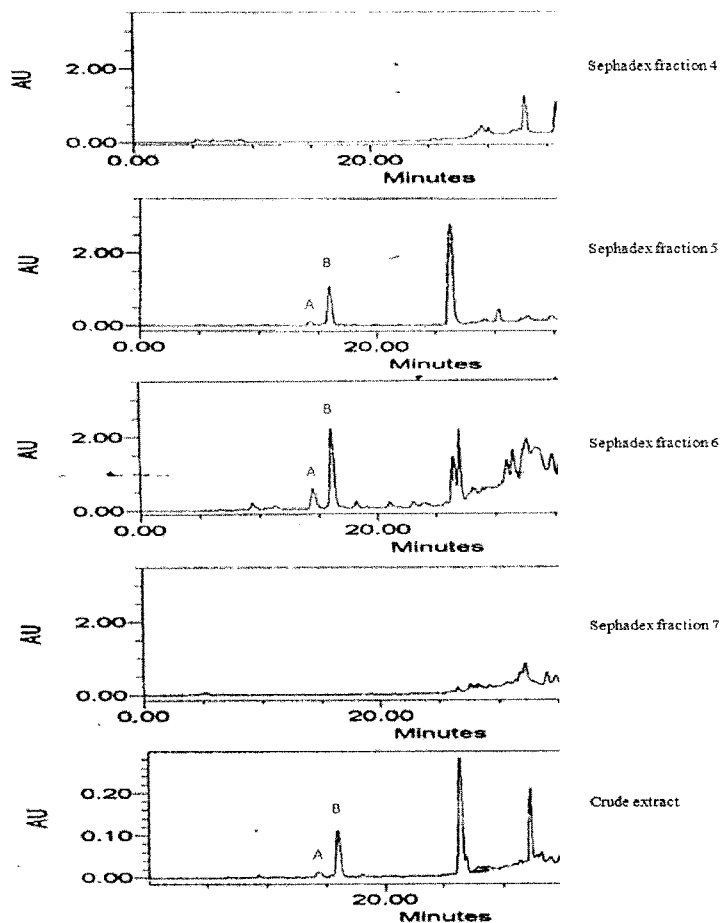
จากการเลี้ยงรา *A. oryzae* MTG4 ในถังหมักขนาด 25 L และทำการแยกสกัดเอาสารสกัดหยาบจากการทดลองที่ผ่านมา สามารถแยกสกัดเอาสารสกัดหยาบได้ปริมาณ 1.2 g ซึ่งในสารสกัดหยาบที่ได้ มีองค์ประกอบของสาร secondary metabolite หลายชนิดปะปนกันอยู่ และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสาร secondary metabolite จากราดังกล่าวที่น่าสนใจ พบที่เวลาที่ 14 และ 16 หลังการแยก ซึ่งในการทดลองนี้เป็นการแยกสารสกัดหยาบผ่าน Sephadex LH20 column โดยคอลัมน์ชนิดนี้จะแยกสารที่มีมวลโมเลกุล (Molecular weight) แตกต่างกัน ออกจากกัน โดยสารที่มีมวลโมเลกุลน้อย จะวิ่งผ่านคอลัมน์สัออกมาได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลใหญ่กว่า ซึ่งจะมีการชะสารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ ด้วยตัวทำละลาย Methanol โดยทำการเก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ทุก ๆ 20 ml ทำการเก็บสารละลายไปเรื่อย ๆ จนกว่าสาร

สกัดหยาบ จะผ่านออกจากคอลัมน์ทั้งหมด (สังเกตว่าจะไม่มีสีของสารสกัดหยาบติดค้างในคอลัมน์) ซึ่งในการทดลองนี้ ได้ใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 cm ยาวประมาณ 51 cm เพื่อแยกสารออกจากกัน ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงลักษณะการแยกสารสกัดหยาบผ่าน Sephadex column โดยใช้ตัวทำละลาย methanol ในการชะสารที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันออกจากคอลัมน์

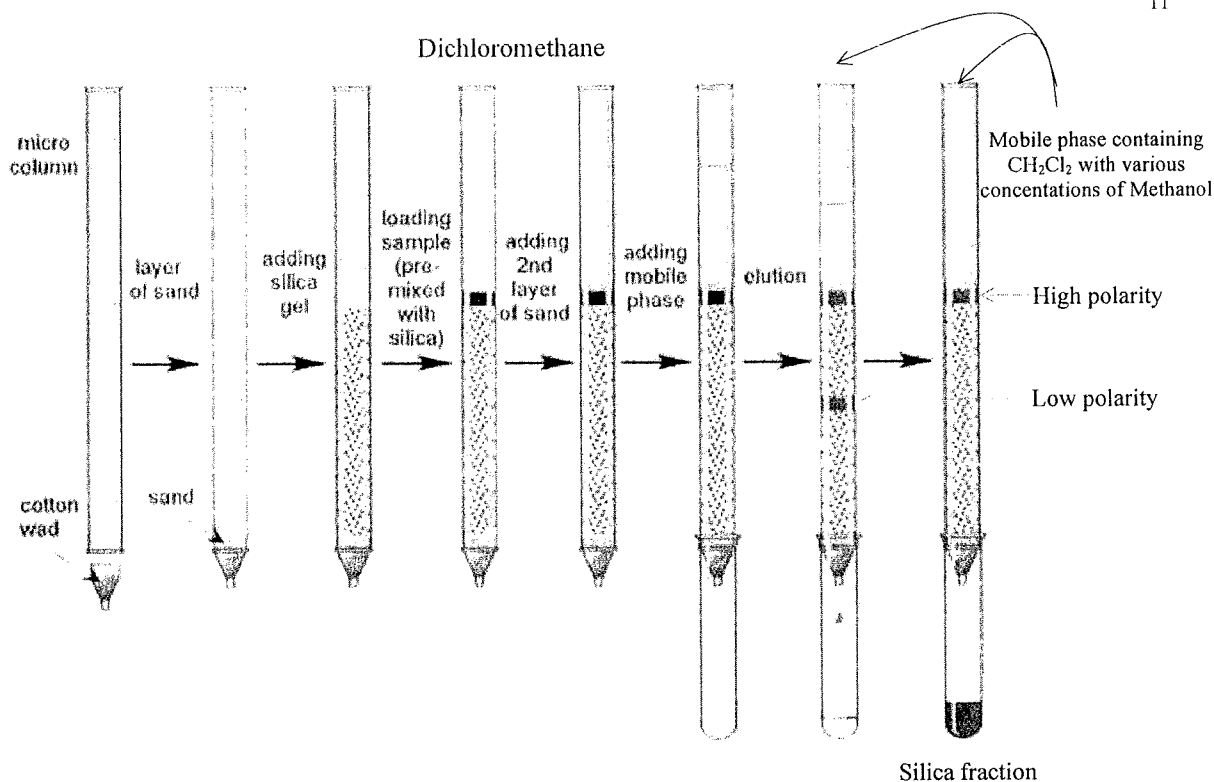
ซึ่งจากการทดลองแยกบริสุทธิ์สารสกัดหยาบผ่าน Sephadex column ได้ทำการเก็บ fraction ต่าง ๆ ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ทุก ๆ 20 ml (flow rate; 2 ml/min) จากนั้นจึงนำสารละลายใน fraction ต่าง ๆ ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง evaporator และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อตรวจหาสาร compound A และ B ถูกชะออกจากคอลัมน์มาอยู่ใน Sephadex fraction ไหน โดยได้แสดงผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 4 ซึ่งพบว่าสาร compound A และ B จะถูกแยกออกมาใน Sephadex fraction ที่ 5 และ 6 ตามลำดับ โดยพบมากที่สุด ใน fraction ที่ 6 (รูปที่ 4) ดังนั้นจึงได้นำสาร sephadex fraction ที่ 5 และ 6 ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง evaporator ซึ่งพบว่าน้ำหนักของสารที่เหลืออยู่น้ำหนักรวมกันเหลือประมาณ 250 mg นั้นแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการแยกบริสุทธิ์นี้ ได้คัดแยกสารเจือปนอื่น ๆ ออกจากสาร secondary metabolite ที่ต้องการได้พอสมควร แต่อย่างไรก็ตาม ก็ยังไม่สามารถคัดกรองสารให้บริสุทธิ์ได้โดยสมบูรณ์ ซึ่งยังมีสารเจือปนอื่น ๆ หลงเหลืออยู่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ด้วยเทคนิคอื่น ๆ ต่อไป



รูปที่ 4 แสดงผล HPLC profile ที่วิเคราะห์สารสกัดหยาบ ซึ่งถูกแยกผ่าน Sephadex column โดยได้เก็บสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์สัปดาห์ 20 ml/fraction (flow rate 2 ml/min)

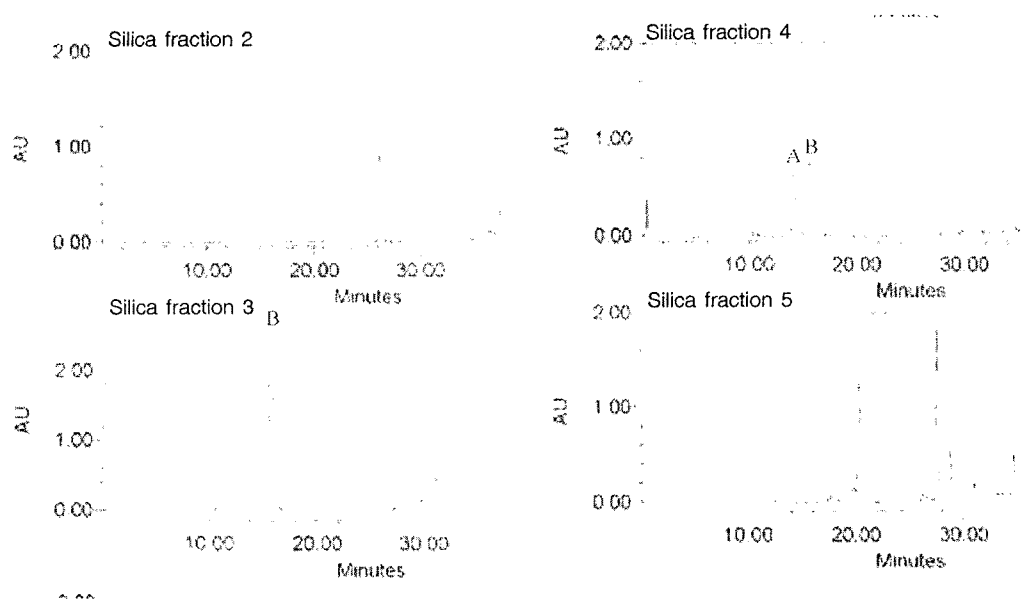
7.3 การแยกบริสุทธิ์สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค Silica column chromatography

จากการทดลองที่ผ่านมา สามารถคัดกรองสารเจือปนอื่น ๆ ออกจากสกัดหยาบที่มี compound A และ B ด้วย Sephadex column และเมื่อวิเคราะห์ผล HPLC profile ของ sephadex fraction พบว่าสาร compound A และ B ถูกแยกให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และถูกชะออกจากคอลัมน์สัปดาห์ไปอยู่ใน sephadex fraction ที่ 5 และ 6 ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักรวมกันเหลือประมาณ 250 mg แต่จากผล HPLC profile พบว่าสาร secondary metabolite ที่พบในทั้ง 2 fraction ยังมีสิ่งเจือปนอื่น ๆ อยู่รวมด้วยอีก ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้ทำการเพิ่มความบริสุทธิ์ของสาร compound A และ B โดยอาศัยหลักการแยกผ่าน silica column ซึ่งคอลัมน์ดังกล่าว เป็นการแยกสารออกจากกัน โดยอาศัยความมีขั้วที่แตกต่างกันของสารหนึ่ง ๆ ซึ่งได้ทำการเตรียมคอลัมน์ขนาด 1.5 * 35 cm ภายในบรรจุ silica sand ที่ถูกแช่ให้อิ่มตัวในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (dichloromethane) จากนั้นทำการ pack silica ลงไปในคอลัมน์อัดเม็ดทรายซิลิกาให้แน่นคอลัมน์สัปดาห์ ปล่อยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ไหลออกจากคอลัมน์สัปดาห์ให้เหลือปริมาตรด้านบนสุดของชั้นซิลิกา จากนั้นทำการเทสารที่ต้องการแยกลงไปเหนือขอบบนสุดของชั้นซิลิกา ปล่อยตัวทำละลายออกให้ส่วนของสารทั้งหมดแทรกเข้าไปอยู่ในตัว silica sand จากนั้นค่อยทำการแยกสารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์สัปดาห์ โดยการปรับ mobile phase (ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ที่มี polarity ต่าง ๆ ซึ่งในการทดลองนี้ ได้ใช้ CH_2Cl_2 ที่สัดส่วน 100% เป็น mobile phase และใช้ Methanol ที่สัดส่วน 2 4 6 8 และ 10% เพื่อเพิ่มค่า polarity ให้แก่ mobile phase ซึ่งจะเริ่มต้นการชะสารออกจากคอลัมน์สัปดาห์ที่ mobile phase ที่ไม่มี methanol ผสมอยู่ ก่อนจะค่อย ๆ เพิ่ม polarity โดยการผสม methanol ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ลงไปใน CH_2Cl_2 ทำการเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์สัปดาห์ ๆ 30 ml/silica fraction ซึ่งขั้นตอนการเตรียม silica column ได้แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงแผนภูมิการแยกสารผ่าน Silica column โดยอาศัยการแยกสารที่มีความแตกต่างของขั้ว โดยใช้ตัวทำละลายพาที่มี polarity ต่าง ๆ ในการชะสารออกจากคอลัมน์

จากการทดลองเพื่อแยกสารให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น พบว่าที่ silica fraction 3 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าใน fraction ดังกล่าวสามารถแยกได้สาร compound B ที่มีปริมาณมากที่สุด ในขณะที่ fraction 4 มีสาร compound A อยู่มาก ขณะที่สารเจือปนถูกคัดแยกออกไปได้มากยิ่งขึ้น สังเกตได้จากผล HPLC profile ที่ได้ จะมีการแสดงผลของสารอื่น ๆ อยู่ไม่มาก ซึ่งเมื่อนำ silica fraction ทั้งสองไปทำให้แห้ง พบว่าน้ำหนักสารรวมเหลือประมาณ 65 mg



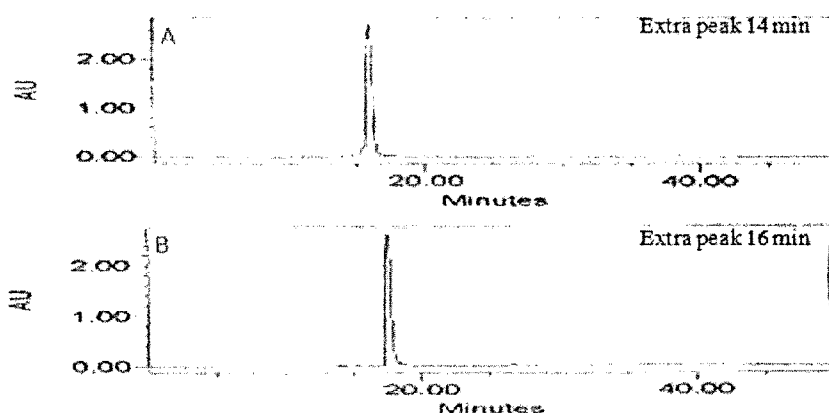
รูปที่ 6 แสดงผล HPLC profile ของสารกึ่งบริสุทธิ์ (semi-pure) ที่ถูกแยกบริสุทธิ์ผ่าน Silica column ซึ่งอาศัยหลักการแยกสารที่มีขั้วต่างกัน ออกจากกันด้วยการชะผ่านตัวทำละลายพาที่มี polarity ต่าง ๆ

จากการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยเทคนิคการแยกผ่านคอลัมส์ซิลิกา โดยอาศัยคุณสมบัติการมีขั้วที่ต่างกันของสาร พบว่าสาร compound A และ B น่าจะมี molecular weight และ polarity ที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 6) เนื่องจากในการแยกสารทั้งสองให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ที่ผ่านมา พบว่าสารทั้งสองมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกันมาก แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคในการแยกสารให้บริสุทธิ์ที่ผ่านมา ยังไม่สามารถคัดกรองให้สารมีความบริสุทธิ์อย่างแท้จริง ดังนั้นจึงได้ใช้เทคนิคการแยกเก็บสารเป้าหมายที่ถูกแยกผ่านคอลัมส์ prep-HPLC ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเก็บสารเป้าหมาย ณ เวลาที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง

7.4 การแยกบริสุทธิ์สารด้วยเทคนิค HPLC

จากการทดลองที่ผ่านมา สารกึ่งบริสุทธิ์ที่ผ่านขั้นตอนการแยกต่าง ๆ แล้ว มีน้ำหนักรวมกันเหลือประมาณ 35 mg แต่จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ต้องการ ยังมีการปนเปื้อนสารอื่น ๆ อยู่พอสมควร ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงอาศัยการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ด้วยการแยกผ่าน prep-HPLC (Lichro CART 250-10) โดยใช้ Detector ชนิด Water 996 photodiode array ที่อัตราการแยกผ่านคอลัมส์ (Flow rate) เท่ากับ 8 ml/min และใช้ตัวทำละลายพาคือ 20% Acetomitrile ซึ่งได้ทำการฉีดสารกึ่งบริสุทธิ์ผ่านเข้าไปในคอลัมส์ดังกล่าวครั้งละประมาณ 200 μ l และทำการเก็บสารที่ไหลผ่านออกจากคอลัมส์ทุก ๆ นาที นานทีละ 1 fraction เก็บทั้งหมด 30 fraction ก่อนที่จะเริ่มการฉีดเข็มใหม่ ทำซ้ำ ๆ จนกว่าสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีจะหมดไป จากนั้นนำสารที่ได้แต่ละ fraction ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Evaporator) และนำสารที่ได้ไปตรวจเช็คอีกครั้งด้วยเครื่อง HPLC

ซึ่งจากการทดลอง เมื่อวิเคราะห์สารที่แยกผ่าน prep-HPLC ในแต่ละ fraction ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารเป้าหมาย compound A และ B จะถูกแยกออกมาใน fraction ที่ 5 – 8 ซึ่งผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าสารที่ได้มีความบริสุทธิ์มากเพียงพอ (รูปที่ 7) และจากการวัดน้ำหนักแห้งของสารบริสุทธิ์ที่ได้ทั้งของ compound A และ B พบว่ามีน้ำหนักแห้งประมาณ 7 และ 5 mg ตามลำดับ



รูปที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์สาร Compound A และ B ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ข้างต้น แล้วด้วย HPLC

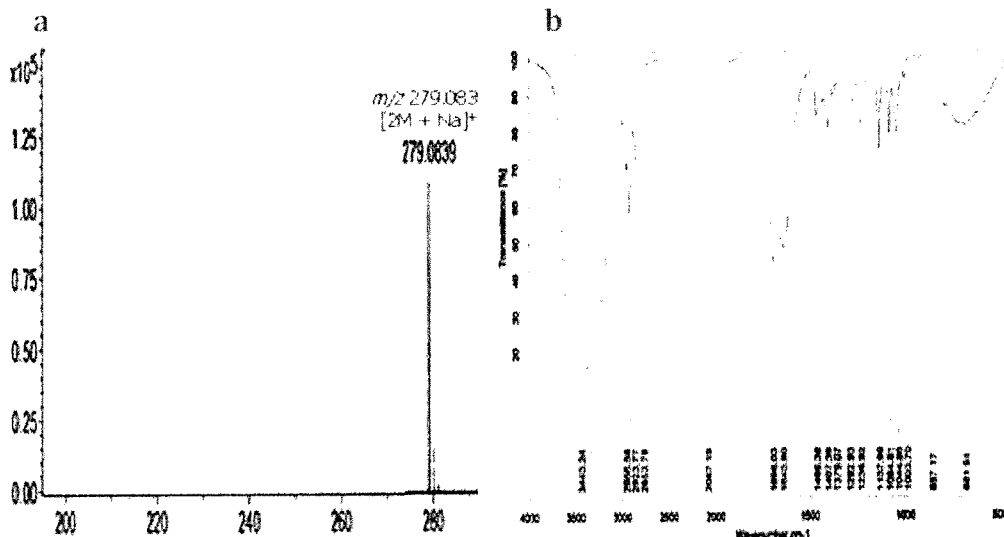
จากกระบวนการแยกบริสุทธิ์สาร ด้วยเทคนิคต่าง ๆ สามารถแยกบริสุทธิ์ได้สารที่เหลือน้ำหนักสุดท้ายประมาณ 5 – 7 mg ซึ่งสารที่ได้ทั้งหมดจะถูกนำไปวิเคราะห์หาอัตลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของสาร (Chemical elucidation) ต่าง ๆ เช่น Mass, IR, H-NMR, C-NMR และ 2D-NMR ตลอดจนวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ของสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมาย เช่น ไวรัสมาลาเรีย เชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่าง ๆ เซลล์มะเร็งและแมลงศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ

7.5 การวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ (Mass spectroscopy) และหาหมู่ fraction ต่าง ๆ (IR spectroscopy)

การทดลองนี้ เป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ compound A และ B ที่ผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์ต่าง ๆ ข้างต้น จนได้สารบริสุทธิ์ที่มีน้ำหนักประมาณ 5 – 7 mg ซึ่งสารที่ได้ จะถูกนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารด้วยเครื่อง HR ESI-TOF mass spectrometer และวิเคราะห์หมู่ functional group ที่อยู่ในโครงสร้างโมเลกุลด้วยเครื่อง FT-IR

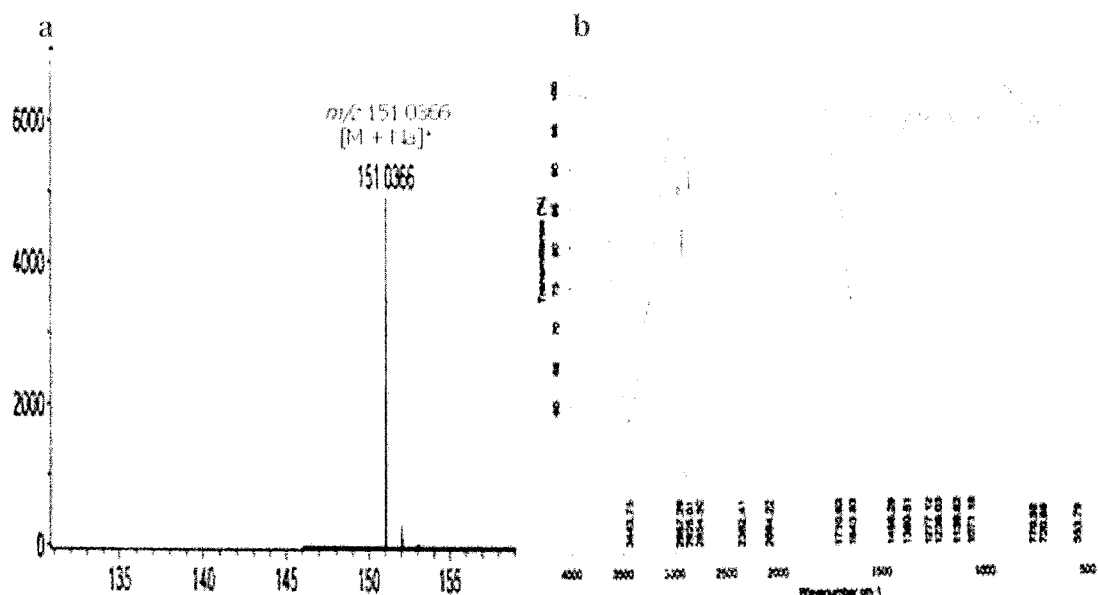
ซึ่งจากการสังเกตลักษณะทางกายภาพของสารบริสุทธิ์ compound A พบว่ามีลักษณะเป็นน้ำมัน ไม่หนืด ไร้สี ไร้กลิ่น และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HR ESI-TOF mass spectrometer พบว่าสาร compound A ให้ผล positive ในรูปของ $[2M + Na]^+$ เท่ากับ m/z 270.0839 และจากการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร compound A ผลปรากฏว่าสารดังกล่าวสามารถดูดกลืนแสง (absorption) ที่ 1644 และ 3443 cm^{-1} ซึ่งจากลักษณะดังกล่าว แสดงว่าภายในโครงสร้างของ compound A น่าจะมีหมู่พันธะเคมีชนิด carbonyl $[-C=O]$ และมีหมู่พันธะ hydroxyl $[-OH]$ ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (รูปที่ 8a และ 8b)

สาร Compound B มีลักษณะทางกายภาพเป็นน้ำมัน ไม่หนืด ไร้สี ไร้กลิ่นคล้ายกับ compound A แต่เมื่อวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเครื่อง HR ESI-TOF mass spectrometer พบว่าสาร compound B ให้ผล positive ในรูปของ $[M+Na]^+$ เท่ากับ m/z 151.0361 และจากการวิเคราะห์ความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร compound B ผลปรากฏว่าสารดังกล่าวสามารถดูดกลืนแสง (absorption) ที่ 1644 และ 3444 cm^{-1} ซึ่งจากลักษณะดังกล่าว แสดงว่าภายในโครงสร้างของ compound A น่าจะมีหมู่พันธะเคมีชนิด carbonyl $[-C=O]$ และมีหมู่พันธะ hydroxyl $[-OH]$ ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (รูปที่ 9a และ 9b)



รูปที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเครื่อง HR ESI-TOF mass spectrometer และวิเคราะห์หมู่ functional group ภายในโครงสร้างโมเลกุลของสาร Compound A ด้วยเครื่อง FT-IR ซึ่ง a คือมวลโมเลกุลของ compound A ที่ให้ผล positive ที่ค่า m/z 279.083 ส่วน b คือผลการดูดกลืนแสงของสาร compound A ที่ให้ผล positive ที่ค่า 1644 และ 3443 cm^{-1}

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 กองทุนวิจัย
 วันที่ 21.5.62 2555
 เลขหมาย 209216



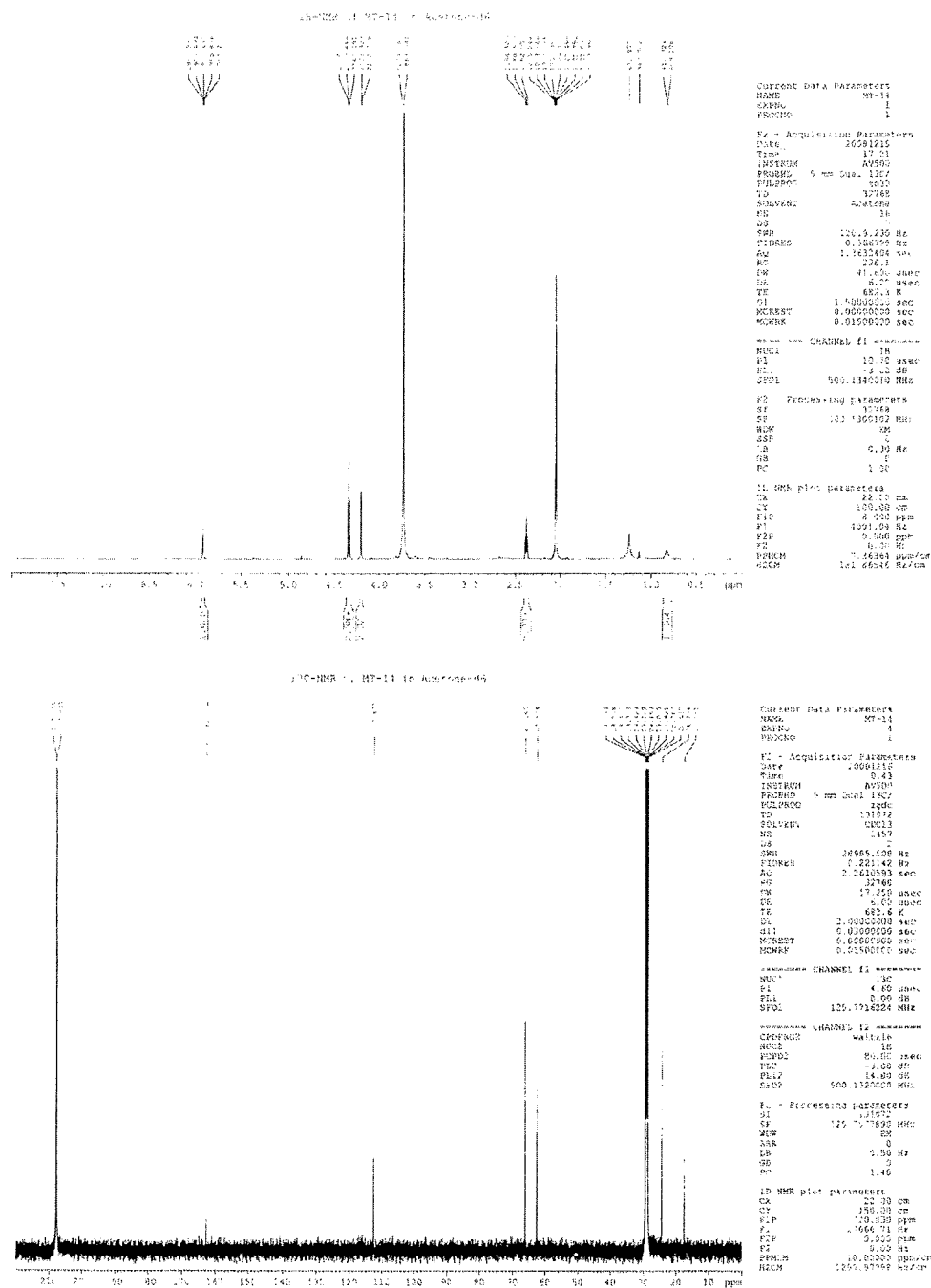
รูปที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเครื่อง HR ESI-TOF mass spectrometer และวิเคราะห์หมู่ functional group ภายในโครงสร้างโมเลกุลของสาร Compound B ด้วยเครื่อง FT-IR ซึ่ง a คือมวลโมเลกุลของ compound B ที่ให้ผล positive ที่ค่า m/z 151.0366 ส่วน b คือผลการดูดกลืนแสงของสาร compound B ที่ให้ผล positive ที่ค่า 1644 และ 3444 cm^{-1}

ซึ่งในการทดลองนี้เป็นการตรวจทราบขนาดโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ Compound A และ B ตลอดจนตรวจหาหมู่ functional group ภายในโครงสร้างของสารทั้งสองชนิด แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่า สารทั้งสองชนิดมีจำนวนคาร์บอน [C] ไฮโดรเจน [H] ออกซิเจน [O] ไนโตรเจน [N] หรืออะตอมธาตุอื่น ๆ ประกอบอยู่อีกกี่อะตอม ดังนั้นจึงได้นำสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในโมเลกุลสาร ด้วยเทคนิค H-NMR C-NMR และวิเคราะห์ 2D-NMR (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) ด้วยเครื่อง NMR Bruker AV500D spectrometer ต่อไป

7.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของสาร Compound A และ B ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR)

การทดลองนี้ เป็นการนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของอะตอมไฮโดรเจน [H] และอะตอมคาร์บอน [C] โดยอาศัยหลักการการสั่นโมเมนต์แม่เหล็กภายในโมเลกุล ซึ่งปรากฏการณ์นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของโปรตอน [^1H] และอะตอมคาร์บอน [^{13}C] ที่มีลักษณะหมู่พันธะต่างกัน จะให้สัญญาณต่าง ๆ ที่จำเพาะ โดยจะแสดงค่าเป็นค่า chemical shifts ที่มีความจำเพาะต่อลักษณะหมู่พันธะของโปรตอนและคาร์บอน ซึ่งค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณหาโครงสร้างพันธะภายในโมเลกุลสาร (framework)

โดยได้นำสารบริสุทธิ์ที่เหลือจากการทดลองที่ 7.5 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR Bruker รุ่น AV500D spectrometer ซึ่งได้แสดงผลการวิเคราะห์หาอะตอมไฮโดรเจนและคาร์บอน ของสารบริสุทธิ์ compound A และ compound B ได้ดังรูปที่ 10 และ 11 ตามลำดับ



รูปที่ 10 ผลการวิเคราะห์อะตอมไฮโดรเจนและอะตอมคาร์บอนของสารบริสุทธิ์ compound A ด้วยเทคนิค NMR โดยเครื่อง NMR Burkert AV500D spectrometer ซึ่ง a; ผลวิเคราะห์ไฮโดรเจนอะตอม [^1H -NMR] ของสารบริสุทธิ์ compound A และ b; ผลการวิเคราะห์คาร์บอนอะตอม [^{13}C -NMR] ของสารบริสุทธิ์ compound A



รูปที่ 11 ผลการวิเคราะห์ไฮโดรเจนและอะตอมคาร์บอนของสารบริสุทธิ์ compound B ด้วยเทคนิค NMR โดยเครื่อง NMR Burk AV500D spectrometer ซึ่ง a; ผลวิเคราะห์ไฮโดรเจนอะตอม [^1H -NMR] ของสารบริสุทธิ์ compound B และ b; ผลการวิเคราะห์คาร์บอนอะตอม [^{13}C -NMR] ของสารบริสุทธิ์ compound B

จากผลการวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ compound A และ compound B ที่ได้จากรูปที่ 10 และ 11 สามารถแปลผลได้ดังนี้

Compound A ภายในโครงสร้างโมเลกุลของสาร compound A ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม ที่เป็น Olefinic methane $[-\text{C}=\text{CH}-]$ จำนวน 1 พันธะ (δ_{C} 112.5) และมีคาร์บอนที่เป็น Oxygenated aliphatic methylene $[-\text{CH}_2-\text{O}]$ จำนวน 2 พันธะ (δ_{C} 66.1 & 62.6) มีคาร์บอนในรูป Methylene $[-\text{CH}_2-]$ จำนวน 1 พันธะ (δ_{C} 24.4) คาร์บอนในรูป Quaternary olefinic จำนวน 1 พันธะ (δ_{C} 162.6) และมีคาร์บอนที่เป็น Carbonyl $[-\text{C}=\text{O}]$ จำนวน 1 พันธะ (δ_{C} 165.0)

ซึ่งภายในโมเลกุลของสาร compound A มีไฮโดรเจนอะตอม ในรูป Methylene $[-\text{CH}_2-]$ ระหว่างโปรตอน H-5 (δ_{C} 2.38) และ H-6 (δ_{C} 4.34) นอกจากนั้นผลของ COSY spectrum ยังบ่งชี้ว่า H-5 เชื่อมต่อกับ H-6 ซึ่งผลของ HMBC spectrum ยังบ่งชี้ได้ว่า H-3 (δ_{C} 5.91) ไปยัง C-2, C-5 และ C-7 กับ H-5 ไปยัง C-3, C-4, C-6 และ C-7 ส่วน H-6 ยังเชื่อมไปยัง C-2, C-4 และ C-5 ซึ่งผลดังกล่าวสามารถประมาณการได้ว่า โครงสร้างโมเลกุลหลักของสาร compound A มีลักษณะเป็น Cyclic ester โดยมีหมู่ Hydroxymethyl $[-\text{CH}_2-\text{OH}]$ ที่เชื่อมพันธะต่อกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-4

Compound B ภายในโครงสร้างโมเลกุลของสาร compound B ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอม ที่เป็น Olefinic methane $[-\text{C}=\text{CH}-]$ จำนวน 1 พันธะ (δ_{C} 116.2) และมีคาร์บอนที่เป็น Oxygenated aliphatic methylene $[-\text{CH}_2-\text{O}]$ และ Methane $[-\text{CH}-\text{O}]$ จำนวนอย่างละ 1 พันธะ (δ_{C} 71.3 และ 63.6 ตามลำดับ) มีคาร์บอนในรูป Methyl $[-\text{CH}_3]$ จำนวน 1 พันธะ (δ_{C} 18.9) มีคาร์บอนในรูป Quaternary olefinic จำนวน 1 พันธะ (δ_{C} 159.9) และมีคาร์บอนที่เป็น Carbonyl $[-\text{C}=\text{O}]$ จำนวน 1 พันธะ (δ_{C} 163.7)

นอกจากนั้น ภายในโมเลกุลของสาร compound B มีไฮโดรเจนอะตอมในรูป Methane $[-\text{CH}-\text{O}]$ และ Methylene $[-\text{CH}_2-]$ ระหว่างโปรตอน H-5 (δ_{C} 4.22) และ H-6 (δ_{C} 4.19 และ 4.35) นอกจากนั้นผลของ COSY spectrum ยังบ่งชี้ว่า H-5 เชื่อมต่อกับ H-6 ซึ่งผลของ HMBC spectrum ยังบ่งชี้ได้ว่า H-3 (δ_{C} 5.72) ไปยัง C-2, C-5 และ C-7 กับ H-6 ไปยัง C-2, C-4 และ C-5 ซึ่งผลดังกล่าวสามารถประมาณการได้ว่า โครงสร้างโมเลกุลหลักของสาร compound B มีลักษณะเป็น Cyclic ester โดยมีหมู่ Methylene $[-\text{CH}-\text{O}]$ ที่เชื่อมพันธะต่อกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-5 (δ_{C} 63.6)

จากการแปลผลค่า Chemical shift ที่ได้จากการวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ compound A และ compound B สามารถนำมาสร้างความสัมพันธ์เชิงพันธะภายในโมเลกุลของสาร ได้ดังตารางที่ 1 และเมื่อนำผล NMR ที่ได้ ไปประกอบกับผล MS สามารถบ่งชี้ได้ว่า สูตรโมเลกุลของสาร Compound A คือ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3$ แต่ผล positive mass ของสารดังกล่าวแสดงผลในรูป $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ที่ m/z 279.0839 (คำนวณจาก $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{Na}$) ส่วนสูตรโมเลกุลของสาร Compound B คือ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3$ และผล positive mass ของสารดังกล่าวแสดงผลในรูป $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ที่ m/z 151.0371 (คำนวณจาก $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3\text{Na}$)

จากข้อมูลผลการทดลองทั้งหมด สามารถจำลองแผนผังโครงสร้างพันธะเคมีต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของ Compound A และ Compound B ได้ดังรูปที่ 12 ซึ่งสาร Compound A มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one (รูปที่ 12a) และสาร Compound B มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one (รูปที่ 12b)

ตารางที่ 1 แสดงค่าการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์บริสุทธิ์ Compound A และ Compound B

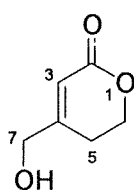
Compound A

#	Δ_C	Δ_H	J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1						
2	165.0	C				
3	112.5	CH	5.91 s		C-2, C-5, C-7	
4	162.6	C				
5	24.4	CH ₂	2.38 t	6.2	6	C-3, C-4, C-6, C-7
6	66.1	CH ₂	4.34 t	6.2	5	C-4, C-5
7	66.2	CH ₂	4.21 s			C-3, C-4, C-5

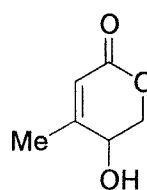
Compound B

#	Δ_C	Δ_H	J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1						
2	163.7	C				
3	116.2	CH	5.72 s		C-2, C-5, C-7	7
4	159.9	C				
5	63.6	CH	4.22 m			
6	71.3	CH ₂	4.19 dd	5.2, 10.6		C-4, C-5
			4.35 dd	3.0, 10.6		C-2, C-4
7	18.9	CH ₃	2.02 s			C-3, C-4, C-5

จากตารางที่ 1 สามารถนำค่า Chemical shift ที่ได้จากการวิเคราะห์ compound A และ compound B มาสร้างแบบจำลองโครงสร้างโมเลกุลสารได้ดังนี้



a

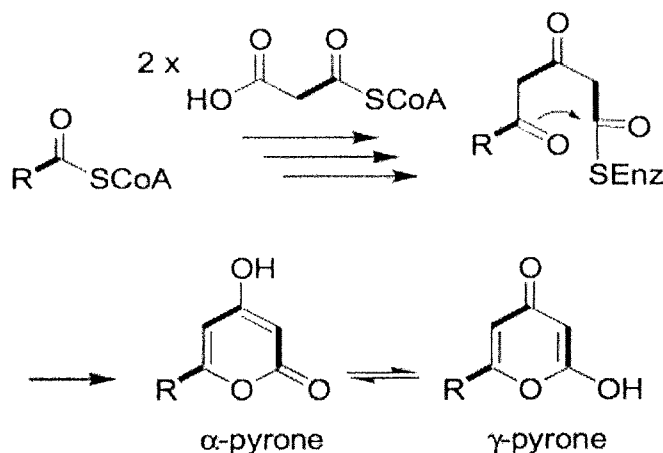


b

รูปที่ 12 แสดงแบบจำลองโครงสร้างโมเลกุลของสาร a; compound A ที่มีชื่อทางเคมีว่า 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one และ b; Compound B มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one

ซึ่งจากการนำโครงสร้างโมเลกุลของสาร compound A [4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one] และ Compound B [5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one] ที่ได้ ไปตรวจสอบกับฐานข้อมูลเคมี Scifinder ไม่ปรากฏสารทั้งสองชนิดภายในฐานข้อมูลดังกล่าว นั้นแสดงให้เห็นว่า สารทั้งสองชนิด เป็นสารเคมีชนิดใหม่ ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองตามธรรมชาติ แต่สารทั้งสองชนิด (Compound A และ Compound B) เป็นสารที่เกิดขึ้นได้ ด้วยกระบวนการทางค่าน้ำพันธุวิศวกรรม โดยในการทดลองนี้ได้นำยีนที่คาดว่าจะสังเคราะห์สารโพลีไทด์ของรา *Xylaria* sp.BCC 1067 ที่ไม่ทราบชนิด มาควบคุมให้ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ในรา *A. oryzae*

แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการสังเคราะห์สารโพลีรีโทดที่เกิดขึ้นในรา *A. oryzae* MTG4 อันเนื่องมาจากการ synthesis ของยีน *pkamt* ยังไม่ทราบกระบวนการที่ชัดเจนว่าสารทั้งสอง ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยสารตั้งต้น (starter unit) และสารทำปฏิกิริยา (extender unit) ว่าเป็นสารชนิดไหน แต่จากโครงสร้างสารทั้งสองชนิด เบื้องต้นสามารถระบุได้ว่าเป็นสารผลิตภัณฑ์ในกลุ่มไพโรน (Pyrone) ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไป สารกลุ่มไพโรนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นได้โดยใช้ Starter unit เป็น Acetyl Co-A และใช้ Extender unit คือ Malonyl Co-A (รูปที่13) [11]



รูปที่ 13 รูปแสดงกระบวนการการสังเคราะห์สารกลุ่มไพโรนโดยทั่ว ๆ ไป [11]

แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาวิจัยนี้ ยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่า สาร compound A [4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one] และ Compound B [5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one] เกิดขึ้นได้อย่างไร และสารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพใดบ้าง ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะนำรา *A. oryzae* MTG4 ไปศึกษาทดลองต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มผลผลิตการผลิตสาร compound A [4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one] และ Compound B [5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one] ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังต้องการสาร compound A และ Compound B ในจำนวนที่มากพอสมควร เพื่อนำไปศึกษาหลักการออกฤทธิ์ชีวภาพต่าง ๆ ต่อไป

7.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร Compound A และ B ต่อเซลล์เป้าหมาย

สารประกอบไพโรน 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one และ 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one ที่เหลือจากการทดลองข้างต้น ถูกแบ่งไปวิเคราะห์หาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ต่อเซลล์เป้าหมาย เช่น การยับยั้งเซลล์มะเร็ง ความมีพิษต่อเซลล์ปกติ การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย รา และแมลงต่าง ๆ โดยได้ส่งตัวอย่างสารสังเคราะห์ทั้งสองชนิดดังกล่าว ไปวิเคราะห์ที่ ห้องปฏิบัติการ Bioassay ของ ศช. ซึ่งได้แสดงผลการทดลองได้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร Compound A และ B ต่อเซลล์ทดสอบเป้าหมายต่าง ๆ

Activity test	Pure Compound		Positive control
	A 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one	B 5-hydroxyl-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one	
1) Anti-Oral cavity cancer; KB (IC ₅₀ ; $\mu\text{g/ml}$)	22.48	71.80	Ellipticine = 0.337 $\mu\text{g/ml}$
2) Anti-Breast cancer, MCF7 (IC ₅₀ ; $\mu\text{g/ml}$)	71.56	172.20	Doxorubicine = 3.31 $\mu\text{g/ml}$

3) Anti malaria, <i>Plasmodium falciparum</i> K1 (IC ₅₀ ; µg/ml)	inactive	inactive	Dihydroartemisinin = 3.8 µg/ml
4) Cytotoxicity; Vero cell (IC ₅₀ ; µg/ml)	91.75	132.58	Ellipticine = 1.099 µg/ml
5) Anti-Bacteria; <i>E. coli</i> (MIC; µg/ml)	inactive	inactive	Ampicillin = 8 µg/ml
6) Anti-Bacteria; <i>S. aureus</i> (MIC; µg/ml)	inactive	inactive	Vancomycin = 0.5 µg/ml

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าสารประกอบไพโรน 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one (A) และ 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one (B) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดของปาก (KB) และมะเร็งเต้านม (MCF7) ซึ่งพบว่าสารประกอบไพโรน 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one (A) มีฤทธิ์ที่ต่ำกว่าสารประกอบไพโรนชนิด 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one (B) เนื่องจากปริมาณสารที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด จะพบว่าสาร 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one (A) ใช้เพียง 22.48 และ 71.56 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าปริมาณสาร 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one (B) ซึ่งใช้สารมากถึง 71.81 และ 172.20 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่การทดสอบฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ปกติ (Cytotoxicity) ต่อเซลล์ Vero cell พบว่าสาร A มีค่า IC₅₀ เพียง 91.75 µg/ml แต่สาร B กลับมีค่าสูงถึง 132.58 µg/ml และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายอื่น ๆ ไม่พบว่าสาร A และ B ไม่มีผลแต่อย่างใด

จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า ถึงสารประกอบไพโรน 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one (A) และ 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one (B) จะเป็นสารประกอบ analog ซึ่งกันและกัน แตกต่างเพียงตำแหน่งของหมู่ hydroxyl [-OH] ที่จับกับโครงสร้างวงแหวนไพโรนเท่านั้น แต่กลับให้ผลการออกฤทธิ์ที่ต่างกันอย่างชัดเจน นั้นแสดงให้เห็นว่า ถ้าหากมีการปรับเปลี่ยนตำแหน่งต่าง ๆ ของหมู่ฟังก์ชันที่เกาะกับวงไพโรน น่าจะทำให้ได้สารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ ๆ ที่มีค่าการออกฤทธิ์ (IC₅₀) ที่ดีขึ้นได้กว่าเดิมมาก