



## การตรวจสอบทางเคมี:

### แนวทางเบื้องต้นเพื่อการค้นหาสารใหม่จากธรรมชาติ

Chemical Screening: a Preliminary Approach for the Discovery of Novel Compounds from Natural Sources

ปนัดดา ไยภักดี\*

คำสำคัญ การตรวจสอบทางเคมี (chemical screening)

#### บทคัดย่อ

ได้มีการพัฒนาและประยุกต์ใช้วิธีการตรวจสอบทางเคมีเพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับการค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ การตรวจสอบทางเคมีเป็นวิธีการที่อาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์ลักษณะของ metabolic finger-print ที่เป็นลักษณะเฉพาะและแสดงถึงกลุ่มทางเคมีของสารเมตาบอไลต์ที่พบได้ในสารสกัดหยาบแต่ละชนิด ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ประกอบการคัดเลือกและจำแนกแหล่ง

ธรรมชาติที่มีศักยภาพและอาจนำไปสู่การค้นพบสารต้นแบบชนิดใหม่ที่น่าไปใช้พัฒนาเป็นยาได้ต่อไป

#### ที่มา

ปัจจุบันมีโรคเป็นจำนวนมากที่ก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิต วิทยาการทางการแพทย์และยารักษาโรคยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องในสาขาต่าง ๆ เช่น การพัฒนาเทคนิคการสกัดแยกสารจากธรรมชาติ [1] การพัฒนาวิธีการสังเคราะห์สารแบบคอมบินาโทเรียล [2] การพัฒนาวิธีการตรวจสอบทางเคมี [3] และการพัฒนาวิธีทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแบบ high-throughput screening [4] เป็นต้น เพื่อช่วยกระบวนการค้นหาสารต้นแบบชนิดใหม่เป็นไป

\*ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จ. นครปฐม

อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

จากความสำเร็จของการค้นพบยากลุ่มต่าง ๆ จากแหล่งผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติเช่น การค้นพบยาต้านมะเร็ง ยาต้านเชื้อแบคทีเรีย และยาลดภาวะโคเลสเตอรอลสูง [5] งานวิจัยเป็นจำนวนมากรวมทั้งในประเทศไทยจึงมุ่งเน้นการศึกษาเพื่อค้นหาสารใหม่ที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจจากแหล่งธรรมชาติทั้งจากพืช สัตว์ เชื้อจุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตทางทะเล [6] ที่ผ่านมามีการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหายาจากแหล่งธรรมชาติจัดได้ว่าเป็นขั้นตอนสำคัญเบื้องต้นในการคัดเลือกแหล่งธรรมชาติที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารใหม่ อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหายามีโอกาสได้ผลการทดสอบเป็นแบบผลบวกлож (false-positive) หรือผลลบлож (false-negative) ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบหลายชนิดที่ผสมอยู่ร่วมกันในสารสกัดหายาอาจส่งผลกระทบต่อการศึกษาวิเคราะห์ ดังนั้นเมื่อนำสารสกัดหายาที่ให้ผลบวกложไปผ่านขบวนการแยกบริสุทธิ์จึงอาจพบว่าสารที่แยกได้แต่ละชนิดไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพแต่อย่างใด ในขณะที่สารสกัดหายาซึ่งแสดงผลบวกложกลับไม่ได้นำมาศึกษาต่อทั้งที่อาจมีสารบริสุทธิ์ซึ่งมีฤทธิ์ที่น่าสนใจแต่ไม่แสดงผลในการทดสอบเบื้องต้น

ในราวช่วงต้นปี ค.ศ. 1980 ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบทางเคมีโดยอาศัยเทคนิคแรงคเลขวาง (thin layer chromatography) เพื่อนำมาตรวจสอบกลุ่มทางเคมีของสารที่พบได้ในสารสกัดหายา และต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีเรื่อยมาจนสามารถนำผลการศึกษามาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อประกอบการคัดเลือกแหล่งธรรมชาติที่มีศักยภาพในการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่น่าสนใจ [3,7] ดังนั้นในบทความนี้จะกล่าวถึงการตรวจสอบทางเคมี โดยมีเนื้อหาครอบคลุมถึง

หลักการ การประยุกต์ใช้และการพัฒนาวิธีการตรวจสอบทางเคมีเพื่อนำมาเป็นแนวทางเบื้องต้นในการค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพ

## การตรวจสอบทางเคมี (Chemical Screening)

ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น การตรวจสอบทางเคมีเป็นวิธีการที่อาศัยหลักการของเทคนิคแรงคเลขวางเพื่อใช้วิเคราะห์ความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหายา ถึงแม้ว่าผลที่ได้จะไม่สามารถบ่งบอกถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดนั้นได้โดยตรง แต่วิธีการดังกล่าวมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกแหล่งธรรมชาติที่มีศักยภาพในการผลิตสารใหม่อันอาจนำไปสู่การค้นพบสารต้นแบบที่น่าไปใช้พัฒนาเป็นยาได้ ทั้งนี้เพราะการค้นพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างทางเคมีใหม่แตกต่างไปจากเดิมที่มีอยู่ มักมีรายงานแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างใดอย่างหนึ่งที่สนใจตามมาด้วยเช่นกัน [8]

การตรวจสอบทางเคมีของสารสกัดหายาโดยอาศัยหลักการของเทคนิคแรงคเลขวาง จะสามารถแยกสารเมตาบอไลต์แต่ละชนิดที่ผสมกันอยู่ในสารสกัดหายาได้และแสดงลักษณะเฉพาะที่เรียกว่า metabolic finger-print โดยขึ้นอยู่กับแหล่งธรรมชาติ วิธีการสกัดหายา ชนิดของแผ่นแรงคเลขวางและวัฏภาคของเหลวที่ใช้ประเภทของสารเมตาบอไลต์ที่มีในสารสกัด รวมทั้งความแตกต่างทางคุณสมบัติทางเคมีซึ่งมีผลต่อความไวในการแยกและการทำปฏิกิริยาเกิดสีของสารเมตาบอไลต์แต่ละตัวบนแผ่นแรงคเลขวาง [9,10] การตรวจวัดผลบนแผ่นแรงคเลขวางทำได้โดยการดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร

และการใช้สารพ่น (spray reagent) ชนิดต่าง ๆ เช่น อนิซาลดีไฮด์ (anisaldehyde) ออร์ซินอล (orcinol) บลูเททราโซเลียม (blue tetrazolium) และ สารเออร์ลิช (Ehrlich's reagent) เป็นต้น

การตรวจสอบทางเคมีเพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับการคัดเลือกแหล่งธรรมชาติและค้นหาสารผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่น่าสนใจ ควรใช้วิธีมาตรฐานในระหว่างขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบทั้งนี้เพื่อให้มีความแม่นยำ น่าเชื่อถือและไม่มีผลคลาดเคลื่อนจากการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกันในแต่ละครั้ง โดยทั่วไปแล้วในกรณีที่แหล่งธรรมชาติเป็นเชื้อจุลินทรีย์เช่น เชื้อรา หรือ แอคทีโนไมซีต การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบทางเคมีนั้นสามารถทำได้โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยชนิดและระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้นให้แยกส่วนตัวเซลล์หรือเส้นใยไมซีเลียม (mycelium) ออกจากส่วนของเหลวหรือบรอธ (broth) โดยการปั่นแยกหรือการกรอง ส่วนเส้นใยนั้นให้นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น อะซิโตน (acetone) หรือ เมทานอล (methanol) จากนั้นจึงให้นำสารสกัดมาทำให้เข้มข้นขึ้น 50 เท่า ในขณะที่ส่วนบรอธให้นำไปผ่านคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยเรซินชนิดแอมเบอร์ไลต์ เอกซ์เอดี-16 (amberlite XAD-16) และใช้เมทานอลต่อน้ำที่อัตราส่วนประมาณ 4:1 ชะล้างคอลัมน์ แล้วจึงนำสารละลายที่ผ่านมาจากคอลัมน์นี้ไปทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้นอีก 50 เท่า [10]

การเตรียมตัวอย่างดังวิธีข้างต้นมีข้อดีเช่น การใช้เรซินแอมเบอร์ไลต์ เอกซ์เอดี-16 จะช่วยดูดซับและแยกสารเมตาบอไลต์ที่น่าสนใจออกจากสารประเภทเกลืออินทรีย์และน้ำตาลบางชนิดที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ [11] การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดด้วยซีเลียมหรือเซลล์จะช่วยให้เซลล์แตกและสกัดสารเมตาบอไลต์ภายใน

เซลล์ออกมาได้ การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดอาจเพิ่มได้ถึง 100 ถึง 200 เท่า ขึ้นกับความสามารถในการผลิตสารของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ โดยทั่วไปแล้ววิธีการตรวจสอบทางเคมีควรตรวจวัดหาสารที่ผลิตขึ้นได้ในช่วงความเข้มข้นประมาณ 0.1 ถึง 1 มิลลิกรัม ต่อบรอธ ปริมาณ 1 ลิตร

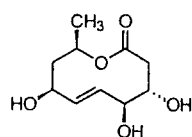
เมื่อเตรียมสารตัวอย่างซึ่งเป็นสารสกัดหยาบแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการตรวจสอบทางเคมีของสารตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานที่ใช้ทั่วไปคือการใช้แผ่นรอกเลซผิวนางชนิดที่มีประสิทธิภาพในการแยกสูง (high performance thin layer chromatography, HPTLC) โดยมักนิยมใช้ชนิดเจลซิลิกา (silica gel) ที่เคลือบบนแผ่นแก้วหรืออะลูมิเนียม และใช้คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 9:1 สำหรับแยกสารเมตาบอไลต์กลุ่มที่ค่อนข้างมีความเป็นขั้วต่ำ เอธิลอะซิเตต เมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 6:2:1 หรือ 1-บิวทานอล กรดอะซิติกและน้ำที่อัตราส่วน 4:1:5 สำหรับแยกสารกลุ่มที่ค่อนข้างมีขั้วปานกลาง แต่หากต้องการแยกสารกลุ่มที่มีความเป็นขั้วสูงมากอาจใช้คลอโรฟอร์ม เมทานอล 2-โพรพานอล 25%-แอมโมเนียและน้ำในอัตราส่วน 25:30:30:0.4:25 การตรวจวัดจุดที่ปรากฏบนแผ่นรอกเลซผิวนางทำได้โดยการดูภายใต้แสง UV ร่วมกับการใช้สารพ่นต่าง ๆ ดังข้างต้น การใช้สารพ่นสีหลายประเภททำให้สามารถตรวจวัดครอบคลุมกลุ่มสารเคมีได้กว้าง

นอกจากนี้ยังควรทำการศึกษาเปรียบเทียบผลโครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบกับสารอ้างอิงชนิดต่าง ๆ เช่น สารกลุ่มที่เป็นองค์ประกอบทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสารเมตาบอไลต์ชนิดที่พบได้บ่อยในธรรมชาติ เพื่อช่วยคัดเลือกแหล่งธรรมชาติที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาและลดปัญหาความซ้ำซ้อนในการแยกสกัด

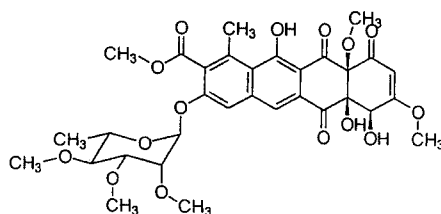
สารชนิดเดิมและไม่น่าสนใจซ้ำ [12]

## แนวทางการประยุกต์ใช้

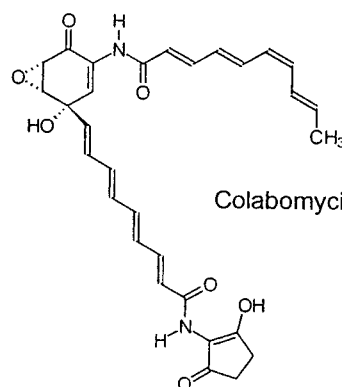
ที่ผ่านมาการประยุกต์ใช้วิธีการตรวจสอบทางเคมีในการนำมาค้นหาสารใหม่จากแหล่งธรรมชาติโดยเฉพาะจากเชื้อจุลินทรีย์พบว่าประสบความสำเร็จพอสมควร สารเหล่านี้มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายและบางชนิดยังปรากฏฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ (รูปที่ 1) เช่น สารเดคาเรสทริกทินดี (decastrictine D) เป็นสารกลุ่มเดคา-



Decastrictine D



Elloramycin A



Colabomycin A

รูปที่ 1 ตัวอย่างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์

วิธีการตรวจสอบทางเคมียังสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาและติดตามเฉพาะกลุ่มสารเมตาบอไลต์ที่สนใจได้ นอกจากนี้แล้วยังสามารถช่วยลดปัญหาความซ้ำซ้อนในการแยกสกัดสารชนิดเดิมซ้ำ โดยให้พิจารณาจากลักษณะ metabolic finger-print ของสารสกัดหยาบที่นำมาทดสอบ สารสกัดหยาบชนิดใดที่ปรากฏจุด (spot) โดเด่นบนแผ่นแรงคเลขวางและแตกต่างจาก meta-

โนไลด์ สารนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งขบวนการชีวสังเคราะห์โคเลสเตอรอล [13] สารเอลลอรามัยซินเอ (elloramycin A) เป็นสารกลุ่มแอนทราซัยคลินที่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย [14] สารโคลาโบมัยซินเอ (colabomycin A) เป็นสารกลุ่มเมนูมัยซิน (manumycin) ซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด murine L-120 leukemia [15] และสารอะมัยซินบี (amycin B) เป็นสารกลุ่มมาร์จิ้นแลกโตน (marginolactone) ที่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ [16] เป็นต้น

bolic finger-print ของสารสกัดหยาบอื่น รวมทั้งพบเห็นได้ไม่บ่อยครั้งจากการตรวจสอบทางเคมีของสารสกัดหยาบชนิดต่าง ๆ เป็นชนิดที่ควรคัดเลือกไว้ศึกษาต่อไป

ผลการตรวจสอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ยังสามารถนำมาใช้ในการจำแนกกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ได้ออกเป็นสามกลุ่มหลัก [10] คือ

1. กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่มีศักยภาพในการผลิตสารเมตาบอไลต์ที่น่าสนใจ (non-producing organisms) ผลการตรวจสอบทางเคมีของสารสกัดยับยั้งจากเชื้อในกลุ่มนี้จะให้ลักษณะโครมาโทแกรมที่ไม่ปรากฏผลบ่งชี้ว่าเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตหรือควรรนำมาเป็นแหล่งธรรมชาติในการนำมาแยกหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลักษณะ metabolic finger-print ของสารสกัดยับยั้งจากเชื้อในกลุ่มนี้ไม่ชัดเจนหรือไม่สามารถสังเกตเห็นจุดใดได้ชัดภายใต้การตรวจวัดด้วยวิธีต่าง ๆ

2. กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารในช่วงแคบ (narrow-producing organisms) ผลการตรวจสอบทางเคมีจะพบว่าผลโครมาโทแกรมที่ได้แสดงจุดสังเกตเห็นชัดแต่มีจำนวนไม่มากนักบนแผ่นแรงคเลขผิวบาง เชื้อในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์หลักได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิด ซึ่งมักขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นสำคัญ

3. กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีศักยภาพสูงในการผลิตสาร (talented organisms) ผลการตรวจสอบทางเคมีของสารสกัดยับยั้งจากเชื้อกลุ่มนี้จะให้ผลโครมาโทแกรมซึ่งแสดงลักษณะของ metabolic finger-print ที่เด่นชัด ปรากฏจุดขึ้นหลากหลายที่ค่า  $R_f$  ต่าง ๆ เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้มีความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์ได้หลายประเภท จึงเหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นแหล่งในการค้นหาสารใหม่ได้ต่อไป ตัวอย่างเช่น เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เชื้อกลุ่ม *Streptomyces* เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* กลุ่ม *Penicillium* และกลุ่ม *Acremonium* เป็นต้น [17-19]

ดังนั้นการตรวจสอบทางเคมีจึงสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมและคัดกลุ่มที่ไม่มีศักยภาพออกไป จากการศึกษาวิจัยร่วมกันระหว่าง A.G. Hoechst และ A. Zeeck ในช่วงปี ค.ศ. 1985-1992 [3]

เพื่อค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่น่าสนใจจากเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 8000 สายพันธุ์ โดยประยุกต์ใช้วิธีการตรวจสอบทางเคมีพบว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมและนำมาซึ่งการค้นพบสารเมตาบอไลต์ที่มีโครงสร้างทางเคมีหลากหลายได้ถึง 259 ชนิด และเป็นสารชนิดใหม่ถึง 129 ชนิด หรือประมาณร้อยละ 50 ของจำนวนทั้งหมด

นอกจากการตรวจสอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคแรงคเลขผิวบางดังกล่าว ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบทางเคมีร่วมกับการตรวจทางชีวโมเลกุลหรือที่เรียกว่าวิธี biomolecular-chemical screening [20] โดยยังคงอาศัยเทคนิคแรงคเลขผิวบางเพื่อนำมาใช้ในการดูลักษณะการแยกสารเมตาบอไลต์แต่ละชนิดบนแผ่นแรงคเลขผิวบางร่วมไปกับการตรวจสอบความสามารถในการจับกันระหว่างสารแต่ละชนิดกับสารชีวโมเลกุลบนแผ่นแรงคเลขผิวบาง ปัจจุบันได้มีการนำสารชีวโมเลกุลประเภทสารดีเอ็นเอ (DNA) มาใช้ในการทดสอบดังกล่าว สารเมตาบอไลต์ชนิดใดที่สามารถทำปฏิกิริยาจับกับดีเอ็นเอได้ ค่า  $R_f$  ของสารตัวนั้นจะลดต่ำลงเมื่อเทียบกับค่า  $R_f$  เดิม [21,22] ได้มีรายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจสอบสารสกัดยับยั้งจากเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 500 ตัวอย่างพบว่าสารสกัดยับยั้ง 17 ตัวอย่างมีสารเมตาบอไลต์ซึ่งสามารถจับกับดีเอ็นเอได้ดี โดยบางชนิดเป็นสารชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน

## บทสรุป

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การตรวจสอบทางเคมีจัดได้ว่าเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ได้ แม้ว่าการตรวจสอบทางเคมีอาจมีข้อด้อยบางประการเช่น ผลการตรวจสอบมิได้บ่งบอกถึงฤทธิ์ทางชีวภาพโดยตรง รวม

ทั้งความไวในการตรวจวิเคราะห์อาจไม่สูงนัก แต่ข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบทางเคมีของสารสกัดหายาจากธรรมชาติสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นเพื่อประกอบการคัดเลือกแหล่งธรรมชาติที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อการค้นหาสารใหม่ การตรวจสอบทางเคมียังมีข้อดีอื่นอีกหลายประการ เช่น เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง รวมทั้งยังสามารถพัฒนาใช้ร่วมกับการตรวจสอบทางชีวภาพได้ เช่น วิธี biomolecular-

chemical screening นอกจากนี้ผลโครมาโทแกรมที่แสดงลักษณะของ metabolic fingerprint ของแหล่งธรรมชาติแต่ละชนิดยังสามารถจัดเก็บเป็นข้อมูลภาพเพื่อรวบรวมเป็นฐานข้อมูลสำหรับใช้อ้างอิงค้นคว้าได้ และที่สำคัญคือเป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จค่อนข้างดีในการนำมาใช้คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาซึ่งการค้นพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่

## เอกสารอ้างอิง

1. Kaufman, P. B., L. J. Cseke, and A. Okybo. 1999. Bioseparation of compounds. In *Natural Products from Plants*. P.B. Kaufman, L. J. Cseke, S. warber and et al., eds. Pp. 207-240. Boca Raton: CRC Press.
2. ปันตดา ไยภักดี. 2543. การประยุกต์ใช้การสังเคราะห์สารแบบคอมบินาโทเรียลในกระบวนการค้นหายาใหม่. *วารสารไทยเภสัชสาร*, 4: 121-142.
3. Grabley, S. and R. Thiericke. 2000. In *Drug Discovery from Nature*. Pp. 124-148. New York: Springer.
4. Cox, B., J. C. Denyer, A. Binnie, Donnelly M. C. and et al. 2000. Application of high-throughput screening techniques to drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*, 37: 83-133.
5. Clark, A. M. 1996. Natural Products as a Resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*, 13: 1133-1141.
6. Bioactive Compounds Symposium and Biological Screening Tests Workshop. Chulalongkorn University, Thailand, 6-9 November, 2001
7. Zahner, H., H. Drautz, and W. Weber. 1982. Novel approaches to metabolites screening. In *Bioactive Microbial Products, Search and Discovery*. J. D Bu'Lock, L. J. Nisbet, and D. J. Winstanley, eds. Pp. 51-70. London: Academic Press.
8. Omura, S. 1992. In *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*. Pp 263-280. New York: Springer Verlag.
9. Poole, C. F. and N. C. Dias. 2000. Practioner's guide to method development in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 892: 123-142.
10. Burkhardt, K. and H. P. Fiedler. 1996. New cineromycins and musacins obtained by metabolite pattern analysis of *Streptomyces griseoviridis* (FH-S 1832). *Journal of Antibiotics*, 49: 432-437.
11. Fluka. 1999/2000. *Laboratory Chemicals and Analytical Reagents*. Pp. 74-76. Germany: Riedel-de Haen.
12. Grabley, S. and R. Thiericke. 1999. Access to structural diversity via chemical screening. In *Bioorganic Chemistry*. U. Diederrichsen, T. K. Lindhorst, I Westermann, and L. A. Wessjohann, eds. Pp. 409-417. Germany: Wiley-VC Verlag.
13. Drager, G., A. Kirschning, R. Thiericke, and M. Zerlin. 1996. Decanolides, 10-membered lactones of natural origin. *Natural Product Reports*, 13: 365-375.
14. Fiedler, H-P., J. Rohr, and A. Zeeck. 1986. Elloramycins B, C, D, E and F: min

- congeners of the elloramycin producer *Streptomyces olivaceus*. *Journal of Antibiotics*, 39: 856-859.
15. Dick, O., U. Onken, I. Sattler, and A. Zeeck. 1994. Influence of increased dissolved oxygen concentration on productivity and selectivity in cultures of a colabomycin-producing strain of *Streptomyces griseoflavus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 41:373-377.
  16. Grabley, S., P. Hammann, W. Raether, J. Wink, and A. Zeeck. 1990. Secondary metabolites: II. Amycins A and B two novel niphimycin analogs isolated from a high producer strain of elaiophylin and nigericin. *Journal of Antibiotics*, 43: 639-647.
  17. Hunter-Cevera, J. C. and A. Belt. 1994. Bacterial as a source of novel therapeutics. In *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*. V. P. Gullo, ed. Pp. 31-48. MA: Butterworth-Heinemann.
  18. Dreyfuss, M. M. and I. H. Chapela. 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*. V. P. Gullo, ed. Pp. 49-80. MA: Butterworth-Heinemann.
  19. Omura, S. 1992. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *Journal of Industrial Microbiology*, 10: 135-156.
  20. Maier, A., C. Maul, M. Zerlin, I. Sattler, S. Grabley, and R. Thiericke. 1999. Bimolecular-chemical screening-a novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites I. Screening strategy and validation. *Journal of Antibiotics*, 52: 945-951.
  21. Maier, A., C. Maul, M. Zerlin, S. Grabley, and R. Thiericke. 1999. Bimolecular-chemical screening-a novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites II. Application studies with pure metabolites. *Journal of Antibiotics*, 52: 952-959.
  22. Maul, C., I. Sattler, M. Zerlin, C. Hinze, C. Koch, A. Maier, S. Grabley, and R. Thiericke. 1999. Bimolecular-chemical screening-a novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites III. New DNA-binding metabolites. *Journal of Antibiotics*, 52: 1124-1134.