บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา Absidia sp. BA16 ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีกรดลิโทโคลิก 0.1 เปอร์เซนต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อราจะแปรรูปกรดลิโทโคลิกให้เป็นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมากมายหลายชนิด สารเหล่านี้ไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง Absidia sp. BA16 ในอาหารที่ไม่เติมกรดลิโทโคลิก ในจำนวนนี้มีอยู่ 2 ชนิดซึ่งมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์และสีใกล้เคียงกับกรดอูโซดีออกซีโคลิกและคีโนดีออกซีโคลิกบนแผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่มีการเคลื่อนที่สัมพัทธ์สูงกว่ากรดน้ำดีมาตรฐานทั้งสองเป็นสารอนุพันธ์หลักของการแปรรูปและเป็นสารที่เลือกศึกษาในรายงานนี้

ในการทำให้อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกบริสุทธิ์โดยสกัดสารอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกด้วยเอทธิลอซีเตท แล้วนำสารสกัดปริมาณ 2.10 กรัมมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟ 2 ครั้ง ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารคือ ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยไตรเมทธิลเพนเทน-เอทธิลอซีเตท-กรดน้ำส้ม (10:10:2 โดยปริมาตร) และคลอโรฟอร์ม-อซีโตน-กรดน้ำส้ม (50:10:0.6 โดยปริมาตร) ตามลำดับ แล้วนำมาตกผลึกด้วยเอทธิลอซีเตทและเฮกเซนได้ผลึกสีขาวหนัก 0.37 กรัม คิดเป็นร้อยละ 17.6 ของน้ำหนักสารสกัด และมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 97 ด้วยการตรวจวัดโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดโดยวิธีนี้คือ อุณหภูมิของการฉีดตัวอย่าง 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์ 220 องศาเซลเซียส ความดันของแกสไนโตรเจน 1.0 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ความดันของแกสไฮโดรเจนต่ออากาศเป็น 1 ต่อ 1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร วิธีการนี้เป็นวิธีตรวจวัดปริมาณกรดน้ำดีที่เหมาะสมที่สุดเพราะสามารถใช้ตรวจวัดปริมาณได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีความไวสูง ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะต้องมีการเตรียม

อนุพันธ์เอสเตอร์ซึ่งยุ่งยากกว่าวิธีการตรวจวัดโดยใช้ไฮเพอร์ฟอเม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีก็ตาม แต่วิธีตรวจโดยใช้ไฮเพอร์ฟอเม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีมีความไวและความแม่นยำต่ำกว่า นอกจากนี้ยังถูกรบกวนด้วยสารละลายเมทธานอลที่ใช้เป็นตัวพา

จากการตรวจสอบโดยโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 14 ระบบ พบว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและกรด 3α,15β-DHC มีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ตรงกัน ส่วนการตรวจสอบโดยแกสโครมาโตกราฟีและไฮเพอร์ฟอเม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีให้ค่าระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์เท่ากัน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเทียบกับกรด 3α , 15β-DHC พบว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมีจุดหลอมเหลวในช่วง 186-188 องศาเซลเซียสซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของกรด 3α , 15β-DHC (185.5-186.5 องศาเซลเซียส) อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกนี้แสดงความถี่ของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่สำคัญ 2 พีค คือ ที่ 1700 ซม$^{-1}$ เป็นพีคของหมู่คาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิกและที่ 3300 ซม$^{-1}$ เป็นพีคของหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งพบในสเปคตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของกรด 3α,15β-DHC เช่นกัน ในการตรวจหาธาตุองค์ประกอบในอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก พบว่าประกอบด้วย ธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เท่ากับ 73.30 10.34 และ 16.36 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนที่พบในกรด 3α , 15β-DHC (73.38 10.30 และ 16.32 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ) จากปริมาณธาตุองค์ประกอบสามารถคำนวณหาสูตรโมเลกุลอย่างง่ายเป็น $C_6H_{10}O$ และการที่แมสสเปคตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมีพีคหลัก (parent peak) และพีคย่อย (fraction peak) เหมือนกับกรด 3α, 15β-DHC ซึ่งกรด 3α, 15β-DHC มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 392 ดังนั้นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกจะมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 392 ทำให้คำนวณหาสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{40}O_4$ โดยที่กรดลิโทโคลิกเป็นสารตั้งต้นและมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{40}O_3$ อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกอาจเป็นกรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ สเปคตรัมของคาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกประกอบด้วยคาร์บอน 24 อะตอมซึ่งเป็นเมทธิลคาร์บอน (CH_3-)

3 อะตอม เมทธิลีนคาร์บอน (-CH_2-) 10 อะตอม เทอร์เชียร์คาร์บอน (>CH-) 8 อะตอม ซึ่งมี 2 อะตอมที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเชื่อมต่ออยู่ ควอเทอนารีคาร์บอน (>C<) 3 อะตอม ซึ่งมี 1 อะตอม ที่เป็นหมู่คาร์บอกซิล สเปคตรัมของโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์แสดงการมีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ โดยที่ไฮดรอกซิล 1 หมู่จะเชื่อมอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และเป็นพันธะแบบแอลฟาหมู่ไฮดรอกซิลอีกหมู่จะเชื่อมอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 15 และเป็นแบบเบตา โดยสเปคตรัมของทั้งคาร์บอน -13 และ โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและสเปคตรัมของดีคับปลิ้งโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (decoupling proton nuclear magnetic resonance) เหมือนกับกรด 3α, 15β-DHC ดังนั้นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16คือกรด 3α, 15β-DHC

จากการตรวจวิเคราะห์กรดน้ำดีโดยวิธีไฮเพอร์ฟอเม้นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี โดยมีระบบตัวทำละลายเมทธานอล-น้ำ อัตราส่วน 4 ต่อ 1 พีเอช 4.5 เป็นตัวพา พบว่ากรดน้ำดีมีค่ารีเทนชันแฟคเตอร์เรียงลำดับจากน้อยไปหามาก ดังนี้ กรดอูโซดีออกซีโคลิกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก สารผสมระหว่างกรด 3α, 15β-DHC และอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 3α, 15β-DHC กรดคีโนดีออกซีโคลิก กรดดีออกซีโคลิก กรดลิโทโคลิก เนื่องจากได้มีผู้ศึกษาค่าเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของกรด 3α, 15β-DHC เมื่อตรวจวัดโดยไฮเพอร์ฟอเม้นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำลายเมทธานอล-น้ำอัตราส่วน 3 ต่อ 1 พีเอช 5.0 โดยคอลัมน์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองนี้(41)พบว่า ลำดับค่าเวลาที่อยู่ในคอลัมน์เรียงลำดับจากน้อยไปหามากคือ กรด 3α, 15β กรดอูโซดีออกซีโคลิก กรดโคลิก กรดคีโนดีออกซีโคลิก กรดดีออกซีโคลิก กรดลิโทโคลิก จากรายงานของ Salvioli และคณะ(43) พบว่าความสามารถในการละลายก้อนนิ่วที่เกิดจากโคเลสเตอรอลในถุงน้ำดีมีความสัมพันธ์กับการเกิดผลึกของเหลว (liquid crystal) ระหว่างกรดน้ำดี เลซิทิน และโคเลสเตอรอล และสัมพันธ์กับความสามารถในการละลายน้ำของกรดน้ำดี Armstrong และคณะ (44) ได้เสนอผลการตรวจวัดความสามารถในการละลายน้ำของกรดน้ำดีโดยใช้คอลัมน์ชนิด Altex Ultrasphere-ODS เทคนิคไฮเพอร์ฟอเม้นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

และยังศึกษาว่าค่าเวลาที่อยู่ในคอลัมน์หรือค่าความสามารถในการเคลื่อนที่ (mobility) ของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ ในคอลัมน์ดังกล่าวจะสัมพันธ์กับความสามารถในการละลายน้ำ โดยที่กรดน้ำดีที่มีค่าเวลาที่อยู่ในคอลัมน์น้อยหรือค่าความสามารถในการเคลื่อนที่สูงจะมีความสามารถในการละลายน้ำสูง นอกจากนั้น Armstrong และคณะยังรายงานว่า ความสามารถในการละลายโคเลสเตอรอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของกรดน้ำดีในคอลัมน์ Altex Ultrasphere-ODS ของไฮเพอร์ฟอเม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีลดลง หรือเมื่อเวลาที่อยู่ในคอลัมน์มากขึ้น คือ ความสามารถในการละลายโคเลสเตอรอลของกรดน้ำดีอิสระจะมีลำดับดังนี้ กรดดีออกซีโคลิก > กรดคีโนดีออกซีโคลิก > กรดอูโซดีออกซีโคลิก (ความสามารถในการเคลื่อนที่ของกรดน้ำดีในคอลัมน์ดังกล่าวคือ กรดอูโซดีออกซีโคลิก > กรดคีโนดีออกซีโคลิก > กรดดีออกซีโคลิก) ดังนั้นกรด 3α, 15β-DHC ซึ่งมีความสามารถในการเคลื่อนที่ต่ำกว่ากรดอูโซดีออกซีโคลิกในการทดลองนี้จะมี ความสามารถในการละลายโคเลสเตอรอลสูงกว่า Kulprecha, S และคณะ (41) รายงานว่าในสภาวะของการทดลอง (in vitro) กรด 3α, 15β-DHC จะมีความสามารถในการละลายโคเลสเตอรอลต่ำกว่ากรดอูโซดีออกซีโคลิก และกรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นกรดน้ำดีที่มีความสามารถในการละลายโคเลสเตอรอลสูงสุด คณะวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ยังรายงานว่าความสามารถในการละลายของกรดน้ำดีเหล่านี้จะเปลี่ยนไปเมื่อมีเลซิทินอยู่ด้วย พบว่า กรด 3α, 15β-DHC จะละลายโคเลสเตอรอลได้มากขึ้นจนเท่ากับกรดคีโนดีออกซีโคลิก แต่ต่ำกว่ากรดอูโซดีออกซีโคลิก นั่นคืออัตราการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการละลายโคเลสเตอรอลของกรด 3α, 15β-DHC จะสูงที่สุด ในการศึกษานี้ยังพบว่า กรด 3α, 15β-DHC มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตมากกว่ากรดอูโซดีออกซีโคลิก โดยกรด 3α, 15β-DHC มีค่า LD_{50} ต่อหนูทดลองเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ในขณะที่กรดอูโซดีออกซีโคลิกมีค่า LD_{50} ต่อหนูสูงถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว อย่างไรก็ตามกลไกของการละลายก้อนนิ่วที่เกิดจากการโคเลสเตอรอลในร่างกายของคนจริง (in vivo) นั้นอาจมีกลไก ซึ่งแตกต่างไปจากการทดลองในหลอดทดลองก็เป็นไปได้