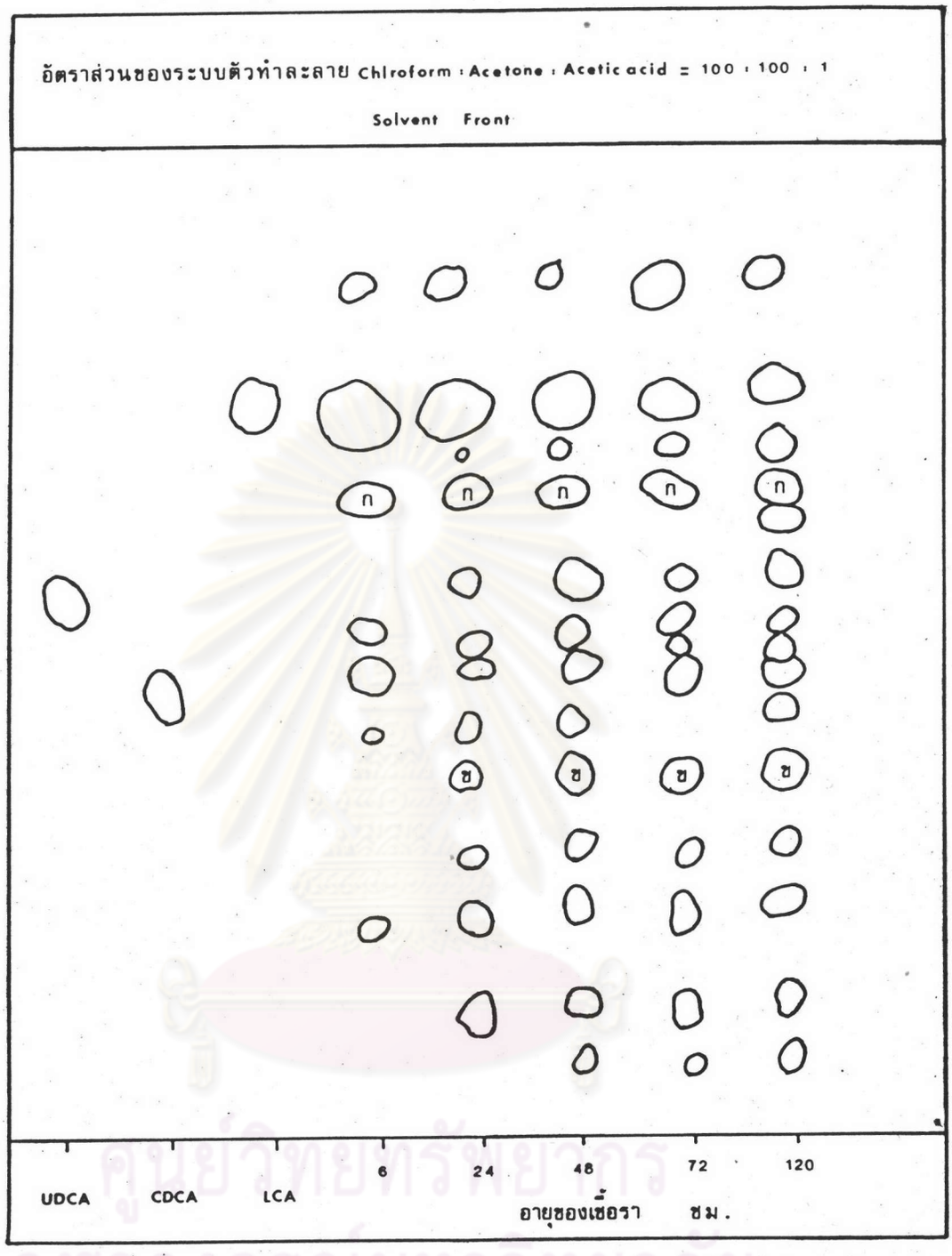
บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การตรวจและเลือกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่เปลี่ยนรูปจากกรดลิโทโคลิกโดยเชื้อราสายพันธุ์ Absidia sp. BA16

จากการเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ Absidia sp. BA16 ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 2.8 ตรวจหาอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเมื่อเชื้อรามีอายุ 6 24 48 72 และ 120 ชั่วโมง โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 13 และตารางที่ 3 พบว่า สามารถตรวจพบอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกในอาหารเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยบนแผ่นโครมาโตแกรมจะปรากฏจุดสีเขียวซึ่งมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์สูงกว่ากรดน้ำดีมาตรฐานที่ใช้คือ กรดอูโซดีออกซีโคลิกและกรดคีโนดีออกซีโคลิก (กรดน้ำดีมาตรฐานทั้งสามจะปรากฏเป็นจุดสีเขียว ภายหลังจากฉีดพ่นด้วยกรดซัลฟูริค 10 เปอร์เซนต์และอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที) ตำแหน่งของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกนี้ คือ จุด ก. ในรูปที่ 13 นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์อื่น ๆ อีก เมื่อเชื้อรามีอายุตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไปจะมีผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นอีกหลายชนิด และยังพบผลิตภัณฑ์ที่มีจุดสีเขียวคล้ายกับกรดน้ำดีมาตรฐานทั้งสาม (จุด ข. ในรูปที่ 13) แต่มีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ต่ำกว่าซึ่งคาดว่าอาจจะเป็นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกอีกชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ยังได้พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อราจนถึงชั่วโมงที่ 72 อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่จุด ก. จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและจะเริ่มลดลงเมื่อเชื้อรามีอายุมากกว่า 72 ชั่วโมง ในทำนองกลับกันอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่จุด ข. จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อรามีอายุมากขึ้น อย่างไรก็ตามความเข้มของสีที่จุด ก. จะยังคงเข้มกว่าจุด ข. ดังนั้นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่จุด ก. เป็นอนุพันธ์หลักที่ได้จากการเปลี่ยนรูปกรดลิโทโคลิก โดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 การศึกษาต่อไปจะได้มุ่งศึกษาอนุพันธ์หลักนี้



รูปที่ 13 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 ในช่วงเวลาต่าง ๆ (6-120 ชม.) กับกรดน้ำดีมาตรฐาน กรดอูโซดีออกซีโคลิก กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง ก.และ ข.เป็นอนุพันธ์ที่มีสีเขียวคล้ายสีของ UDCA และ CDCA

ตารางที่ 3 ความเข้มสีของกรดลิโทโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกซึ่งได้จากการเปลี่ยนรูปของกรดลิโทโคลิกโดย Absidia sp. BA16 ที่เวลาต่าง ๆ โดยการทำให้เกิดสีตามวิธีข้อ 2.5 เทียบกับความเข้มสีของกรดน้ำดีมาตรฐาน*

ระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ชนิดของกรดน้ำดี		
	กรดลิโทโคลิก	อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	
		จุด ก.	จุด ข.
6	+ 6	+ 1	-
24	+ 5	+ 2	+ 1
48	+ 4	+ 3	+ 1
72	+ 3	+ 5	+ 2
120	+ 3	+ 4	+ 3

หมายเหตุ

* กำหนดหน่วยความเข้มสีของกรดน้ำดีมาตรฐานให้มีความเข้มสูงสุดเท่ากับ +8

3.2 การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดย Absidia sp. BA16 ในระดับขวดเขย่า

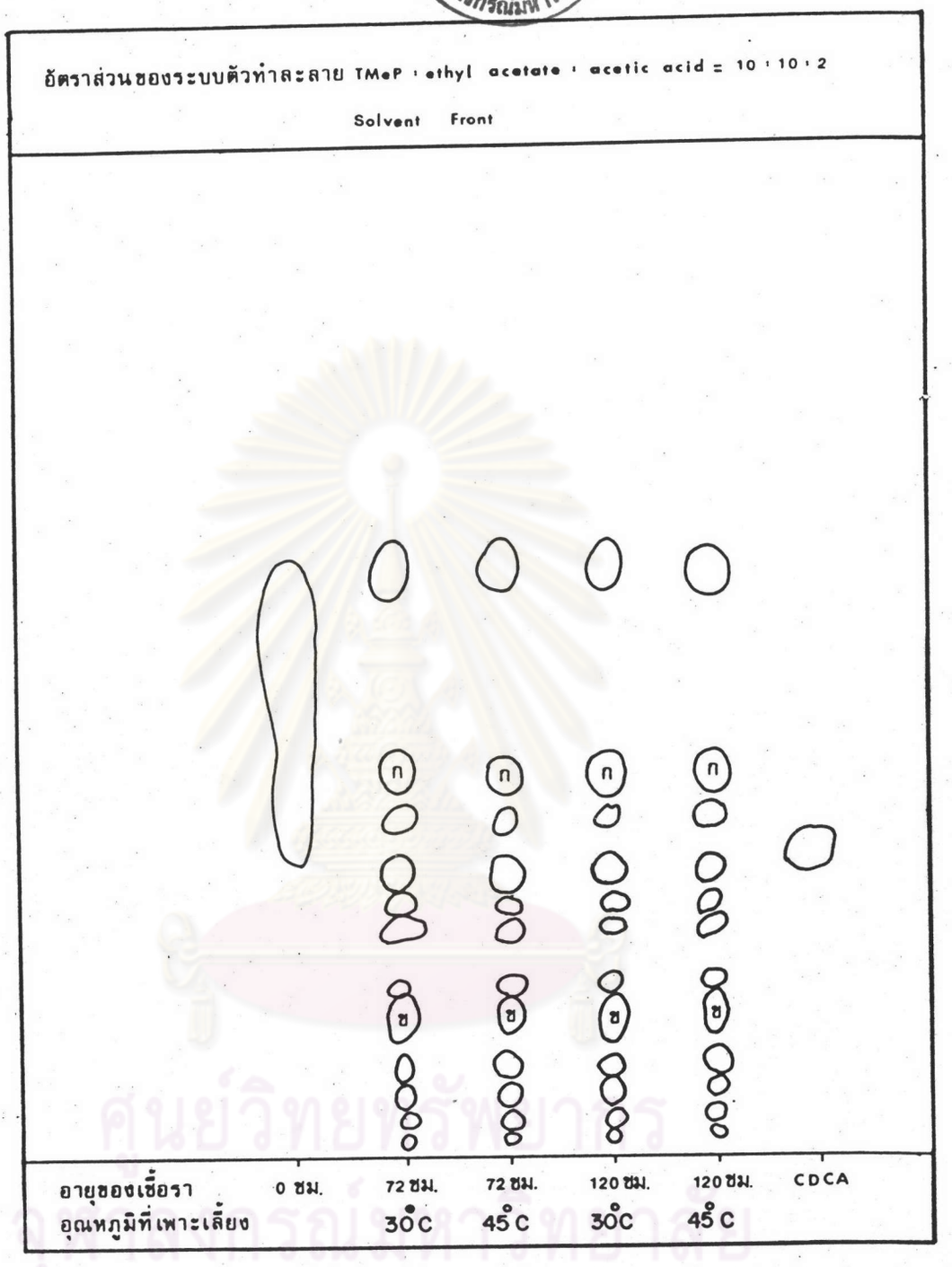
การศึกษาการเปลี่ยนรูปอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อราสายพันธุ์ Absidia sp. BA16 จำเป็นที่จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้ผลิตอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกในปริมาณสูงและลดสารเจือปนอื่น ๆ ลง

ทำให้การสกัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์ง่ายขึ้น เนื่องจากวัตถุประสงค์หลักในงานวิจัยนี้เน้นกระบวนการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อในการทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาพอสังเขปเท่านั้น

โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ Absidia sp. BA16 ตามวิธีในข้อ 2.9 ตรวจหาอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางได้ผลดังแสดงในรูปที่ 14 และตารางที่ 4 ตามลำดับ

ในการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ Absidia sp. BA16 ที่อุณหภูมิ 45 และ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเมื่อทำการแยก (isolation) เชื้อรานี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนกรดลิโทโคลิกให้เป็นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกได้ที่อุณหภูมิสูง ส่วนอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่ได้เคยมีรายงานการเพาะเลี้ยงเชื้อรา(11)ซึ่งสามารถเปลี่ยนกรดลิโทโคลิกไปเป็นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและเป็นอุณหภูมิปกติที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมทั่วไป

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จุด ก. ซึ่งเป็นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่สนใจมีความเข้มมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิเดียวกันนี้นาน 120 ชั่วโมง และเมื่ออายุเชื้อราเพิ่มขึ้นพบว่า จุด ข. ซึ่งเป็นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกอีกชนิดหนึ่งมีความเข้มเพิ่มขึ้น การเพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมงและ 120 ชั่วโมง ให้ผลในทำนองเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่จุด ก.เมื่อเชื้อรามีอายุเท่ากัน พบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ความเข้มของสีที่จุด ก. มากกว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยที่เชื้อรามีอายุ 72 ชั่วโมงจะให้ความเข้มมากที่สุด ดังนั้นสภาวะที่เลือกใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารสำหรับผลิตเพื่อให้ผลิตอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่เป็นอนุพันธ์หลัก คือ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 72 ชั่วโมง



รูปที่ 14 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียสกับกรดน้ำดีมาตรฐาน คีโนดีออกซีโคลิก โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความเข้มสีของกรดลิโทโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส และแยกผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบางเทียบกับกรดคีโนดีออกซีโคลิก *

อุณหภูมิ ($^{\circ}C$)	ระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	ชนิดของกรดน้ำดี		
		กรดลิโทโคลิก	อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	
			จุด ก.	จุด ข.
30	0	+ 7	-	-
	72	+ 3	+ 6	+ 2
	120	+ 3	+ 5	+ 3
45	72	+ 3	+ 5	+ 3
	120	+ 3	+ 4	+ 4

หมายเหตุ

* กำหนดหน่วยความเข้มสีของกรดคีโนดีออกซีโคลิก เป็นความเข้มสูงสุดให้มีค่าเท่ากับ +8

3.3 <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำดีโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี</u>

จากการนำวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์กรดน้ำดีดังกล่าวในข้อ 2.5 ผลดังแสดงในข้อ 3.1 และ 3.2 จะเห็นได้ว่าวิธี

โครมาโตกราฟีแบบผิวบางทำได้ง่ายกว่าวิธีแกสโครมาโตกราฟี เนื่องจากไม่ต้องมีการเตรียมอนุพันธ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์ แต่การตรวจวัดปริมาณกรดน้ำดีโดยดูจากความเข้มของสีภายหลังจากฉีดพ่นด้วยสารเคมีบางชนิดเป็นการตรวจปริมาณโดยการเปรียบเทียบสีเป็นค่าสัมพัทธ์ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณที่มีอยู่จริงได้ การตรวจวัดปริมาณกรดน้ำดีที่มีอยู่จริงโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางจะต้องทำการสกัดกรดน้ำดีออกจากตัวดูดซับก่อนแล้วจึงนำมาตรวจวัดปริมาณโดยวิธีอื่นต่อไป ซึ่งขั้นตอนจะยุ่งยากมากขึ้นและอาจสูญเสียกรดน้ำดีบางส่วนไป นอกจากนี้วิธีการโครมาโตกราฟีแบบผิวบางมีความไวต่ำกว่าวิธีแกสโครมาโตกราฟี จากเหตุผลดังกล่าว วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำดีที่เหมาะสมคือวิธีแกสโครมาโตกราฟี

การตรวจวัดปริมาณกรดน้ำดีโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี จะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อทำการตรวจวัดในสภาวะที่เหมาะสม สภาวะที่สำคัญต่อการตรวจวัดคือ อุณหภูมิของการฉีดตัวอย่าง (injection temperature) อุณหภูมิของคอลัมน์ (column temperature) อัตราการไหลของแกสตัวพา (flow rate of carrier gas) ชนิดของคอลัมน์ ชนิดของแกสตัวพา เป็นต้น

ในการศึกษานี้มุ่งหาสภาวะที่เหมาะสมบางสภาวะ คือ อุณหภูมิของคอลัมน์และอัตราการไหลของแกสไนโตรเจนซึ่งใช้เป็นแกสตัวพา ส่วนสภาวะอื่น ๆ ได้จากรายงานที่ได้เคยมีการใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟีชนิดเดียวกันนี้(11) และเป็นสภาวะที่ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างเมื่อใช้เครื่องมือต่างชุดกัน เช่น อุณหภูมิของการฉีดตัวอย่าง เป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้สารกลายเป็นไอซึ่งจะต้องเป็นอุณหภูมิที่ไม่สูงจนเกิดการทำลายตัวอย่าง หรือต่ำจนไม่สามารถทำให้สารกลายเป็นไอ เป็นต้น

นำสารสกัดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Absidia sp. BA16 มาเตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ตามวิธีที่กล่าวถึงในข้อ 2.7 หลังจากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจวัดโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟีได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5, 6, 7, และ กราฟรูปที่ 1

จากตารางที่ 5, 6, และ 7 จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิคอลัมน์ค่าหนึ่ง ๆ

ระยะเวลาที่พีคของกรดน้ำดีปรากฏเรียงจากน้อยไปมากดังนี้คือ กรดลิโทโคลิก กรดดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก และเมื่อความดันของแกสไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ค่าเวลาที่อยู่ในคอลัมน์หรือค่าเวลาที่พีคของกรดน้ำดีปรากฏจะลดลง ในทำนองเดียวกันกับเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์และให้ความดันของแกสไนโตรเจนคงที่ สภาวะทั้งสองนี้จะมีผลต่อการแยกของพีคของกรดน้ำดี เนื่องจากสภาวะในการตรวจหาที่เหมาะสมสำหรับวิธีแกสโครมาโตกราฟี คือ สภาวะที่พีคของกรดน้ำดีที่ปรากฏมีการแยกออกจากกันและลักษณะของพีคต้องสมมาตร (symmetry) โดยพิจารณาจากค่าความสามารถในการแยกของพีค (resolution) นอกจากนี้จะต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดซึ่งจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการตรวจวัด จากค่าความสามารถในการแยกในตารางดังกล่าว การตรวจวัดโดยใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ 210 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแกสไนโตรเจนแทนด้วยความดันของแกสไนโตรเจน 1.2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร มีความสามารถในการแยกของพีคสูงสุด แต่เนื่องจากสภาวะนี้ใช้เวลาในการตรวจวัดนานกว่าสภาวะอื่น ๆ นอกจากนี้ค่าความสามารถในการแยก เมื่อทำการตรวจวัดโดยใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ 220 องศาเซลเซียส และ ความดันของแกสไนโตรเจนต่าง ๆ ให้ค่าใกล้เคียงกับเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 210 องศาเซลเซียส แต่ใช้เวลาในการตรวจวัดน้อยกว่า สำหรับการตรวจวัดโดยใช้อุณหภูมิคอลัมน์เป็น 230 องศาเซลเซียส ให้ค่าความสามารถในการแยกของพีคต่ำสุด จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มุ่งความสนใจศึกษาความดันของแกสไนโตรเจนที่อุณหภูมิคอลัมน์ 220 องศาเซลเซียส โดยที่อัตราการไหลของแกสตัวพาที่เหมาะสมคือ อัตราการไหลที่ทำให้ได้ค่าเอชอีทีพีต่ำสุด(42) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเอชอีทีพีและความดันของแกสไนโตรเจนดังกราฟที่ 1 ความดันของแกสไนโตรเจน 1.0 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร จะเป็นความดันที่เหมาะสม

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์กรดน้ำดี โดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟี คือ อุณหภูมิของการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์ 220 องศาเซลเซียส ความดันของแกสไนโตรเจนเท่ากับ 1.0 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ความดันของ

แกสไฮโดรเจนและอากาศที่ใช้ในเครื่องตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน เท่ากับ 1.0 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ตารางที่ 5 ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยก เมื่ออุณภูมิของคอลัมน์เป็น 210 องศาเซลเซียส

ความดันของแกสไนโตรเจน ($กก./ซม.^2$)	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time)			HETP	R
	LCA (นาที)	DCA (นาที)	P (นาที)		
1.2	6.41	10.75	14.55	0.190	1.53

ตารางที่ 6 ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 220 องศาเซลเซียส

ความดันของแกสไนโตรเจน ($กก./ซม.^2$)	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time)			HETP	R
	LCA (นาที)	DCA (นาที)	P (นาที)		
1.2	3.70	6.00	7.80	0.180	1.43
1.0	4.60	7.40	9.60	0.170	1.30
0.8	5.40	8.80	11.30	0.196	1.34

ตารางที่ 7 ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 230 องศาเซลเซียส

ความดันของแกสไนโตรเจน* (กก./ซม.^{2})	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time)			HETP	R
	LCA (นาที)	DCA (นาที)	P (นาที)		
1.2	2.60	4.20	5.20	0.420	0.79
1.0	3.10	4.90	6.30	0.350	0.92
0.8	3.80	5.90	7.50	0.280	0.82
0.6	5.10	8.00	10.20	0.240	0.90

หมายเหตุ

* ความดันของแกสไนโตรเจนแทนอัตราการไหลของแกสไนโตรเจน

LCA = กรดลิโทโคลิก

DCA = กรดดีออกซีโคลิก

P = อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

HETP = height equivalent theoritical plate $= \frac{L}{16\ (x/y)^2}$

R = ความสามารถในการแยกผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน ในงานวิจัยนี้จะเป็นความสามารถในการแยกของพีคกรดดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก $= \frac{2d}{W_1+Y}$

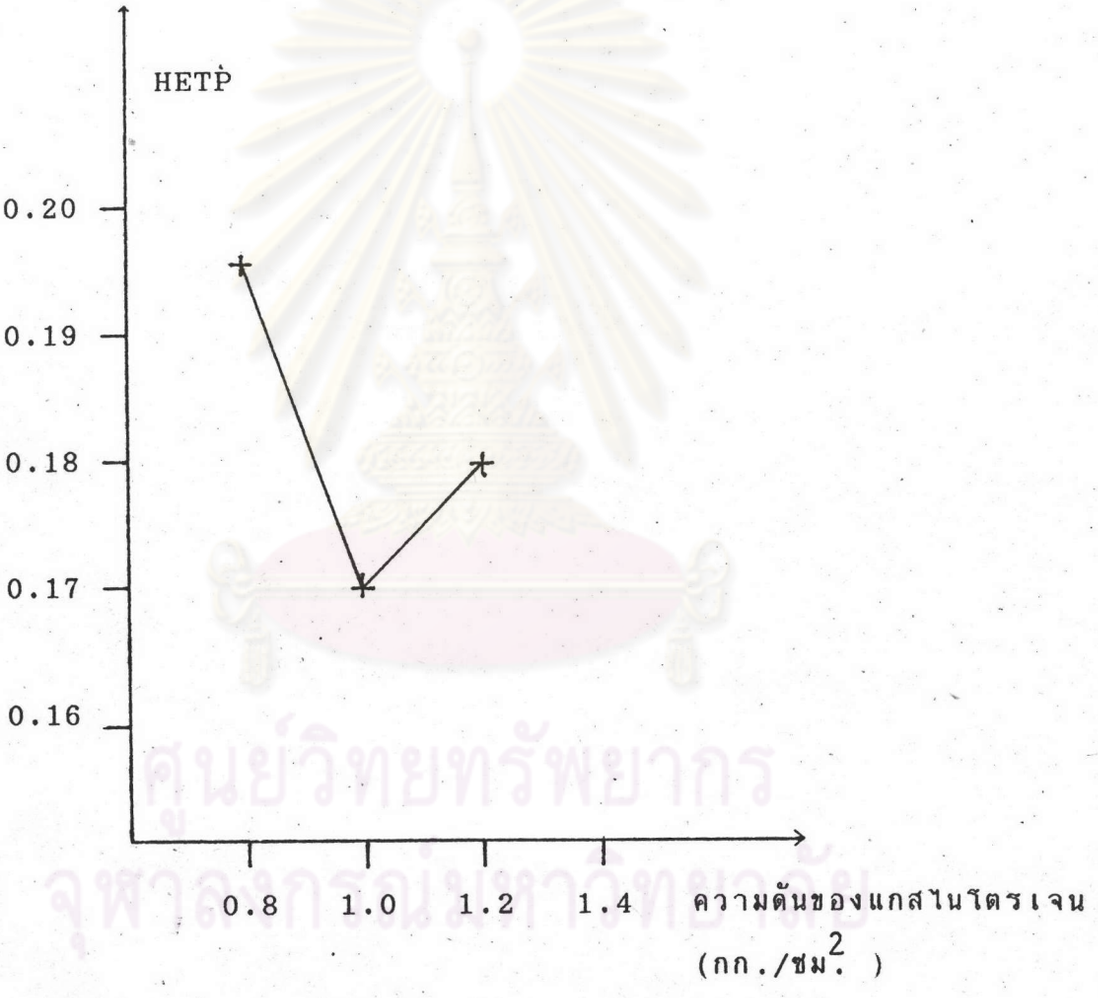
L = ความยาวของคอลัมน์ในเครื่องแกสโครมาโตกราฟหน่วยเป็น ซม.

X = ระยะทางวัดจากพีคของตัวทำละลายจนถึงจุดยอดของพีคอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

Y = ความกว้างของฐานพีคของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

W_1 = ความกว้างของฐานพีคกรดดีออกซีโคลิก

d = ระยะห่างระหว่างจุดยอดของพีคกรดดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก



กราฟที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างเอชอีทีพีและความดันของแกสไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การทำให้อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกบริสุทธิ์

3.4.1 การเลือกระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการแยกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

ในการทำให้อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกบริสุทธิ์ เลือกใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ โดยมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นตัวชะสาร (eluent) ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเลือกโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยเลือกจากระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกออกจากสารเจือปนอื่น ๆ ซึ่งพิจารณาจากค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน (resolution)

เพาะเลี้ยงเชื้อรา Absidia sp. BA16 และดำเนินการทดลองตามวิธีในข้อ 2.10.1 ระยะทางที่กรดลิโทโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเคลื่อนที่บนแผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางในระบบตัวทำละลายต่าง ๆ และค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน แสดงไว้ในตารางที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ระยะทางการเคลื่อนที่ของกรดลิโทโคลิก อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก และความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กันบนแผ่นโครมาโตแกรมเมื่อทำการแยกตามวิธีการทดลองข้อ 2.10.1

ระบบตัวทำละลาย	ระยะการเคลื่อนที่ (ซม.)		ความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน
	กรดลิโทโคลิก	อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	
I_a	0.70	0.55	0.010
I_b	0.65	0.49	0.011
I_c	0.73	0.54	0.012
I_d	0.38	0.27	0.007
I_e	0.37	0.16	0.014
I_f	0.26	0.12	0.009
I_g	0.20	0.08	0.008
I_h	0.46	0.32	0.010
I_j	0.36	0.23	0.009
A	0.30	0.15	0.010
B	0.60	0.50	0.007
C	0.35	0.19	0.011
D	0.44	0.23	0.013
E	0.93	0.87	0.004

ความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน = $\frac{\text{ผลต่างของระยะทางระหว่างกรดลิโทโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ในระบบตัวทำละลายที่กำหนด}}$

เนื่องจากค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน จะบ่งบอกความสามารถของระบบตัวทำละลายที่จะแยกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกออกจากกรดลิโทโคลิกซึ่งเป็นจุดที่ใช้เทียบเคียงบนแผ่นโครมาโตแกรม ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่ให้ค่าความสามารถในการแยกผลิตภัณฑ์ประมาณ 0.01 ยกเว้นระบบตัวทำละลาย Id E และ B มีความสามารถในการแยกต่ำกว่า 0.01 ระบบตัวทำละลายที่มีค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์สูงกว่า 0.01 มี 3 ระบบ คือ Ic Ie และ D ระบบตัวทำละลาย D ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่ายคือ ไดเอทธิลอีเธอร์ การนำมาใช้เป็นระบบตัวทำละลายสำหรับชะสารมีปัญหา คือ เกิดฟองแก๊สดันให้ซิลิกาเจลที่บรรจุในคอลัมน์แยกออกจากกันเมื่อตั้งทิ้งไว้ จึงไม่เลือกระบบตัวทำละลายนี้สำหรับระบบตัวทำละลาย Ic และ Ie มีองค์ประกอบเหมือนกันต่างกันที่อัตราส่วนของกรดน้ำส้ม โดยที่ระบบตัวทำละลาย Ic มีปริมาณกรดน้ำส้มมากกว่า ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่แยกบนแผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางเคลื่อนที่ได้ระยะทางมากกว่าในระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่เท่า ๆ กันกับระบบตัวทำละลาย Ie จึงเลือกระบบตัวทำละลาย Ic ในการชะสาร ซึ่งจะทำให้ใช้ปริมาตรตัวทำละลายน้อยกว่าและใช้เวลาสั้นกว่าเนื่องจากผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่ในระบบนี้ได้เร็ว

3.4.2 <u>การทำให้อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกบริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี</u>

น้ำสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา <u>Absidia</u> sp. BA16 ตามวิธีข้อ 2.3 และ 2.9 ปริมาณ 2.1 กรัม มาผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล (ขนาดของคอลัมน์ 2.5 เซนติเมตร x 70 เซนติเมตร) ซึ่งเตรียมไว้โดยวิธีในข้อ 2.10.2.1 ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารคือ ระบบตัวทำละลาย Ic เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ปริมาณหลอดละ 3 มิลลิลิตร ตรวจหาอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (ตามวิธีข้อ 2.5) ทุกทุก 5 หลอด นำหลอดที่ตรวจพบอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมารวมกันแล้วตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีพบว่ามีความบริสุทธิ์ 84 เปอร์เซนต์ และมีปริมาณกรดน้ำดีเหลือ 51.9 เปอร์เซนต์ของสารตั้งต้น แต่ความบริสุทธิ์ดัง

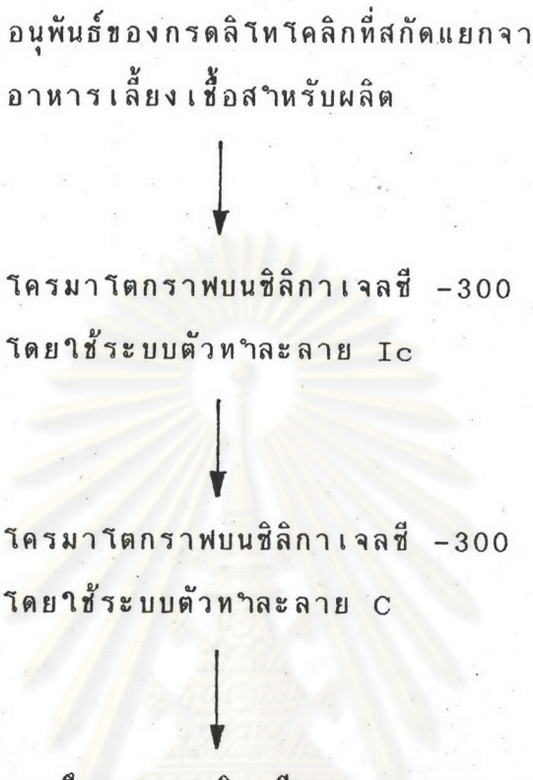
กล่าวยังไม่เพียงพอที่จะนำมาตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ จึงทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยนำมาผ่านคอลัมน์อีกครั้ง ชะสารในคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย C ซึ่งเป็นระบบตัวทำละลายที่พบว่าสามารถแยกกรดลิโทโคลิกออกจากอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก และได้เคยมีรายงานการนำระบบตัวทำละลายนี้มาใช้ในการทำให้อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกบริสุทธิ์(11) อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผ่านคอลัมน์ครั้งที่สอง พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 92 เปอร์เซนต์และมีปริมาณสารเหลือ 21.6 เปอร์เซนต์

3.4.3 <u>การเพิ่มความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยการตกผลึก</u>

นำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผ่านคอลัมน์ครั้งที่สองมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยการตกผลึกในสารละลายเอทธิลอซีเตท-เฮกเซน ตามวิธีในข้อ 2.10.2.3 ได้ผลึกสีขาวที่มีความบริสุทธิ์ 97 เปอร์เซนต์ และมีปริมาณอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 17.6 เปอร์เซนต์ของปริมาณสารตั้งต้น เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟให้ผลดังแสดงในรูปที่ 15 และตารางที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 สรุปขั้นตอนการทำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกให้บริสุทธิ์



ตารางที่ 9 ความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนในการทำให้อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกบริสุทธิ์	น.น.สาร (กรัม)	ความบริสุทธิ์ของสาร (เปอร์เซนต์)	ปริมาณสาร (เปอร์เซนต์ของสารตั้งต้น)
สารสกัดของกรดน้ำดี	2.10	44.1	100.0
หลังจากผ่านคอลัมน์ที่ 1	1.09	83.8	51.9
หลังจากผ่านคอลัมน์ที่ 2	0.52	92.0	21.6
หลังจากการตกผลึก	0.37	97.0	17.6

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

3.5.1 วิธีการหาจุดหลอมเหลว

นำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่บริสุทธิ์มาตรวจหาจุดหลอมเหลว ตามวิธีที่กล่าวใน 2.11.1 พบว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วงระหว่าง 186-188 องศาเซลเซียส และมีค่าใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของกรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก (3α, 15β-dihydroxy-5β-Cholanic acid,3α,15β-DHC)ซึ่งได้มีผู้รายงานไว้(11) โดยกรดน้ำดีนี้จะมีค่าจุดหลอมเหลวเท่ากับ 185.5-186.5 องศาเซลเซียส

การที่อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมีจุดหลอมเหลวเป็นช่วงต่างกัน 2 องศาเซลเซียสแสดงว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกยังมีสิ่งเจือปน

3.5.2 วิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

จากการตรวจโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบางตามวิธีในข้อ 2.11.2 โดยใช้ระบบตัวทำละลาย Ic พบว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่บริสุทธิ์จะปรากฏจุดเพียง 1 จุด และเนื่องจากจุดหลอมเหลวของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมีค่าใกล้เคียงกับกรด 3α, 15β-DHC จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกรดน้ำดี 3α, 15β-DHC กับอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางในระบบตัวทำละลายกลุ่มเดียวกับที่ใช้ศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ซึ่งกล่าวไว้ในข้อ 2.10.1 ผลคือกรดน้ำดีทั้งสองชนิดมีค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เท่ากันในระบบตัวทำละลายทุกระบบ

3.5.3 วิธีแกสโครมาโตกราฟี

โดยเตรียมอนุพันธ์เอสเตอร์ของกรดน้ำดีตามวิธีในข้อ 2.7.2 ตรวจหาความบริสุทธิ์ตามวิธีแกสโครมาโตกราฟีตามวิธีใน 2.11.3 ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่ามีพีคปรากฏ 2 พีค คือ พีคของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก และพีคสิ่งเจือปน คำนวณความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกได้เท่ากับ 97 เปอร์เซนต์ และพบว่าตำแหน่งของพีคอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกตรงกับพีคของกรด 3α, 15β-DHC และ

ตรงกับพีคของกรดคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งทำให้ไม่สามารถใช้วิธีแกสโครมาโตกราฟีในการบ่งบอกชนิดของกรดน้ำดีได้

3.5.4 วิธีไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก ตามวิธีในข้อ 2.11.4 พบว่า นอกเหนือจากพีคของเมทธานอลซึ่งใช้เป็นตัวชะสารแล้วจะปรากฏพีคของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 1 พีค โดยมีค่ารีเทนชันแฟคเตอร์ 0.46 และไม่พบพีคสิ่งเจือปนอื่น ๆ แสดงว่า จากการตรวจสอบโดยวิธีนี้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซนต์

เนื่องจากการตรวจวัดโดยวิธีแกสโครมาโตกราฟีพบว่า อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก กรด 3α,15β-DHC และกรดคีโนดีออกซีโคลิก มีตำแหน่งของพีคตรงกัน ซึ่งทำให้ไม่สามารถบ่งบอกชนิดของกรดน้ำดีได้ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาวิเคราะห์กรดน้ำดีอื่น ๆ ควบคู่กับอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ตรวจหาความบริสุทธิ์ โดยเปรียบเทียบเวลาการอยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดน้ำดีแต่ละชนิดกับตัวชะสาร (เมทธานอล-น้ำ) และแสดงค่าเป็นค่ารีเทนชันแฟคเตอร์ (retention factor) ดังแสดงผลในตารางที่ 10 ซึ่งสามารถเรียงลำดับกรดน้ำดีที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์โดยพิจารณาจากค่ารีเทนชั่นแฟคเตอร์ตามลำดับก่อนหลัง คือ กรดอูโซดีออกซีโคลิก อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก สารผสมระหว่างกรด 3α, 15β-DHCและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก กรด 3α, 15β-DHC กรดคีโนดีออกซีโคลิก กรดดีออกซีโคลิก กรดลิโทโคลิก

จากการทดลองดังกล่าว พบว่า พีคของกรดคีโนดีออกซีโคลิกจะแตกต่างจากพีคของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก และกรด 3α, 15β-DHC นั่นคือ อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเป็นกรดน้ำดีต่างชนิดกับกรดคีโนดีออกซีโคลิก

ตารางที่ 10 เวลาที่กรดน้ำดีมาตรฐานและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกอยู่ในคอลัมน์และค่ารีเทนชันแฟคเตอร์ ในการตรวจวัดโดยวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

กรดน้ำดี	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (นาที)		รีเทนชันแฟคเตอร์
	เมทธานอล	ผลิตภัณฑ์	
กรดอูโซดีออกซีโคลิก	2.78	4.00	0.44
กรดคีโนดีออกซีโคลิก	2.78	5.71	1.05
กรดดีออกซีโคลิก	2.77	6.14	1.22
กรดลิโทโคลิก	2.78	7.75	1.79
กรด 3α,15β-DHC	2.76	4.08	0.48
อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	2.86	4.19	0.46
สารผสมระหว่างกรด 3α,15β-DHC และอนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิก	2.78	4.08	0.47

$$\text{รีเทนชันแฟคเตอร์} = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

t_r = เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของผลิตภัณฑ์

t_o = เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของเมทธานอล

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีต่าง ๆ ในข้อ 2.11 ได้ผลดังแสดงใน 3.5 พบว่า บางวิธีจะแสดงความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 100 เปอร์เซนต์ ได้แก่ วิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง วิธีไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีวิธีทั้งสองนี้เป็นวิธีที่มีความไวต่ำ ดังนั้นหากมีสิ่งเจือปนในปริมาณไม่มากนักจะไม่สามารถตรวจพบได้ สำหรับวิธีการตรวจหาจุดหลอมเหลวของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก และวิธีแกสโครมาโตกราฟี ตรวจพบสิ่งเจือปนในอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก โดยที่วิธีการตรวจวัดโดยแกสโครมาโตกราฟีมีความไวในการตรวจวัดสูง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกจะยังคงมีสิ่งเจือปนอื่น ความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเท่ากับ 97 เปอร์เซนต์ (โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟี)

ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลึก ยังได้พบว่า อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมีคุณสมบัติที่สำคัญบางประการ ซึ่งรวบรวมดังแสดงในตารางที่ 11 ใกล้เคียงหรือตรงกันกับกรด 3α, 15β-DHC ดังนั้นกรดน้ำดีทั้งสองอาจเป็นกรดน้ำดีชนิดเดียวกัน ซึ่งจะต้องศึกษาด้วยโครงสร้างทางเคมี

ตารางที่ 11 คุณสมบัติที่สำคัญบางประการของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและกรด 3α, 15β-DHC

วิธีการตรวจสอบ	อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก	กรด 3α, 15β-DHC
จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	186-188	185.5-186.5
การเคลื่อนที่สัมพัทธ์บน TLC ระบบต่าง ๆ	มีค่าตรงกันใน 14 ระบบตัวทำละลาย	
ค่าเวลาการอยู่ในคอลัมน์ในแกสโครมาโตกราฟ	7.4 นาที	7.4 นาที
ค่ารีเทนชันแฟคเตอร์ใน HPLC	0.46	0.48

3.6 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

ได้ทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

3.6.1 การวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบในโมเลกุล

ตรวจหาธาตุองค์ประกอบคือ คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และออกซิเจนตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.12.1 ผลแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ธาตุองค์ประกอบของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

ธาตุองค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซนต์)
คาร์บอน	73.30
ไฮโดรเจน	10.34
ออกซิเจน	16.36

จากปริมาณของธาตุองค์ประกอบในตารางที่ 12 คำนวณหาสูตรโมเลกุลอย่างง่ายของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกได้เป็น $C_6H_{10}O$ และเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจหาธาตุองค์ประกอบของกรด3α,15β-DHC ซึ่งมีผู้รายงานไว้(11) ได้ผลใกล้เคียงกันโดยที่กรด 3α , 15β-DHC ประกอบด้วย ธาตุคาร์บอน 73.38 เปอร์เซนต์ ไฮโดรเจน 10.30 เปอร์เซนต์ และออกซิเจน 16.32 เปอร์เซนต์ ซึ่งคำนวณหาสูตรโมเลกุลอย่างง่ายเป็นอย่างเดียวกันกับอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

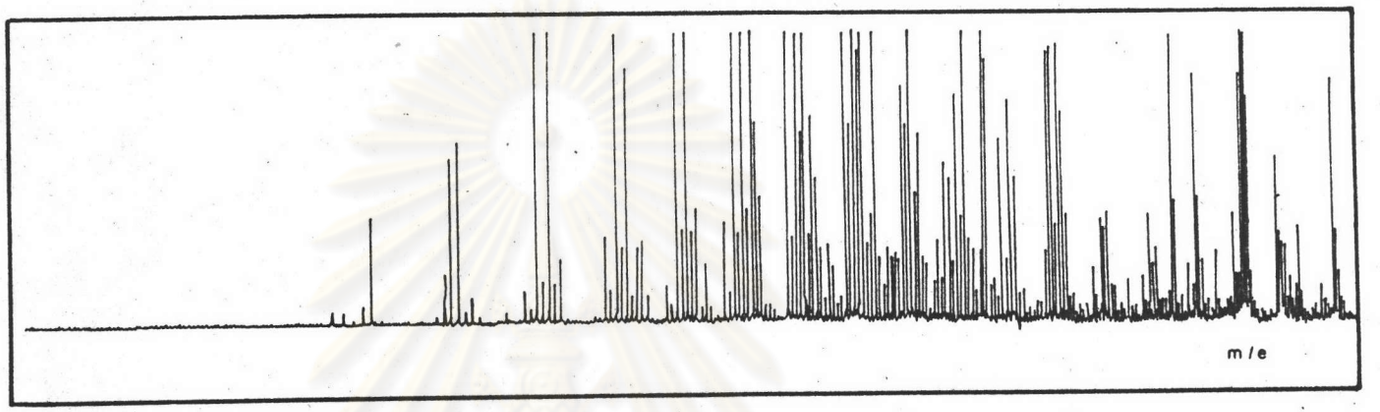
3.6.2 <u>แมสสเปคโตรมิเตอร์</u>

การวิเคราะห์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.12.2 ได้ผลดังรูปที่ 16 และ 17 พบว่ามีสเปคตรัมคล้ายกันกับกรด 3α, 15β-DHC ทั้งพีคหลัก (parent peak) และพีคย่อย (fraction peak)

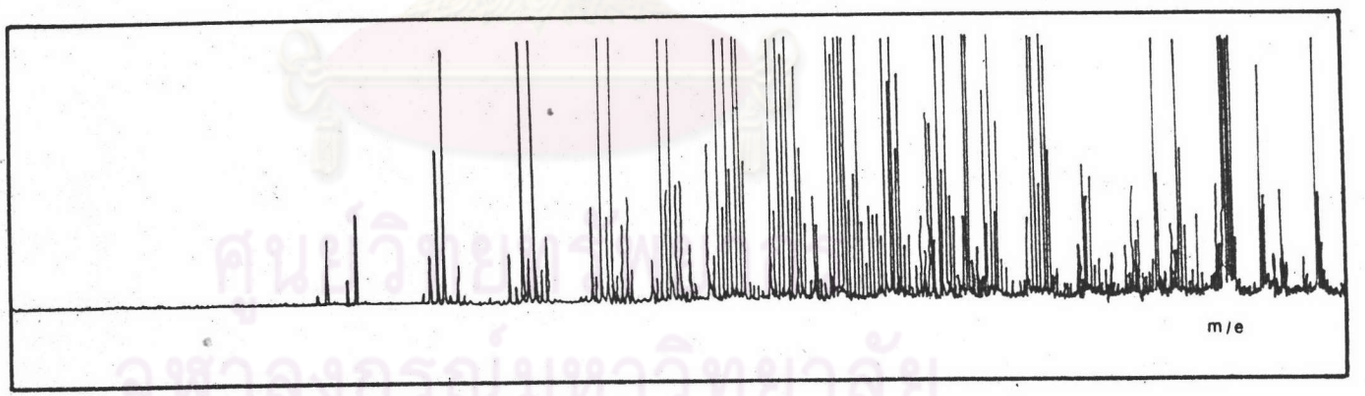
เนื่องจากได้มีการศึกษามวลโมเลกุลของกรด 3α , 15B-DHC โดยวิธีแมสสเปคโตรเมทรี(11)พบว่ากรด 3α, 15β-DHC มีมวลโมเลกุล 392 ดังนั้นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกจะมีมวลโมเลกุล 392 เช่นกัน ทำให้สามารถเขียนสูตรโมเลกุลของอนุพันธ์ของกรดลิโทโคลิกได้เป็น $C_{24}H_{40}O_4$ ซึ่งเหมือนกันกับสูตรโมเลกุลของ 3α, 15β-DHC

เมื่อพิจารณาจากสารตั้งต้นคือ กรดลิโทโคลิก ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{40}O_3$ เทียบกับสูตรโมเลกุลของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก พบว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกอาจจะเป็นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 แมสสเปคตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16



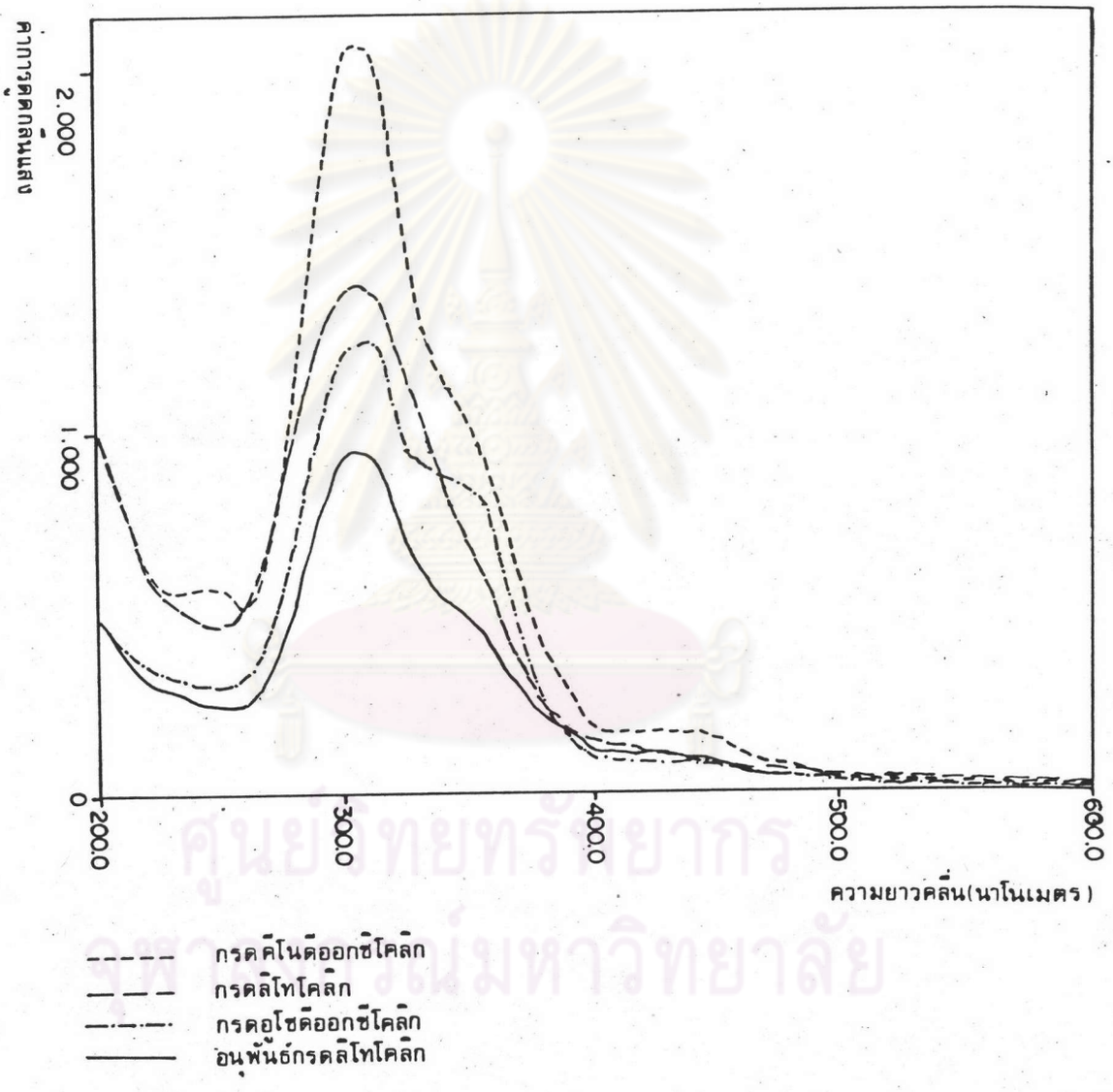
รูปที่ 17 แมสสเปคตรัมของกรด 3α, 15β-DHC

3.6.3 อุลตราไวโอเลท-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เตรียมกรดน้ำดีมาตรฐาน คือ กรดลิโทโคลิก กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดอูโซดีออกซีโคลิก อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้กรดซัลฟูริคเป็นตัวทำละลาย วัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลทตามวิธีในข้อ 2.12.3 ผลดังรูปที่ 18 พบว่ากรดน้ำดีทั้งหมดให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นในช่วง 300-310 นาโนเมตร จากรายงานการศึกษาการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลทของกรดน้ำดีที่ละลายอยู่ในกรดซัลฟูริคเข้มข้น พบว่ากรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่จะให้ค่าความยาวคลื่นที่กรดน้ำดีสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ 316 นาโนเมตร กรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่จะให้ค่าความยาวคลื่นที่ 305-312 นาโนเมตร กรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ จะมีค่าความยาวคลื่นที่ 389-390 นาโนเมตร(21)

ดังนั้นความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงได้สูงสุดสำหรับอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกจะอยู่ในช่วงของกรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ และ 2 หมู่ แต่จากลักษณะของสเปคตรัมอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเทียบกับกรดลิโทโคลิก ซึ่งเป็นกรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ และกรดอูโซดีออกซีโคลิก กรดคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งเป็นกรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ จะเห็นว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกมีรูปสเปคตรัมใกล้เคียวกับกรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่คือ สเปคตรัมจะปรากฏไหล่ (shoulder) ทางด้านความยาวคลื่นที่มีค่าสูง ดังนั้นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกอาจประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 การดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลทของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ

3.6.4 <u>อินฟราเรดสเปคโตรโฟโตมิเตอร์</u>

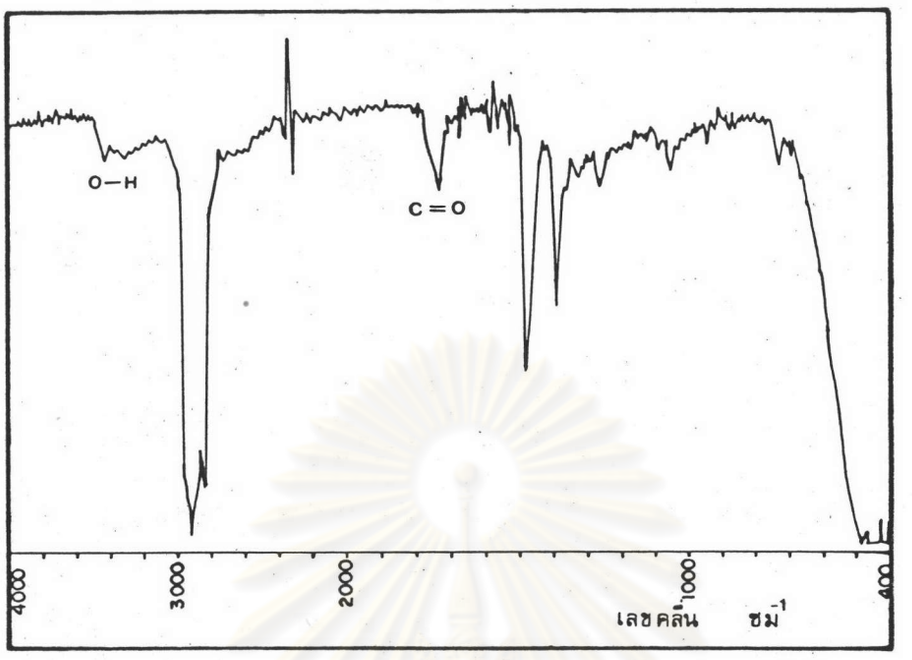
เตรียมอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกสำหรับตรวจหาหมู่ฟังชัน (functional group) ของสารตามวิธีในข้อ 2.12.4 สเปคตรัมให้พีคที่สำคัญ 2 พีค ซึ่งแสดงดังรูปที่ 19 เมื่อเปรียบเทียบกับสเปคตรัมของกรด 3α, 15β-DHC ซึ่งมีสเปคตรัมดังรูปที่ 20 ตามรายงานที่มีผู้ศึกษาไว้(11)เปรียบเทียบตำแหน่งของพีคอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและกรด 3α, 15β-DHC ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ตำแหน่งของพีคที่สำคัญของกรด 3α, 15β-DHC และ อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก

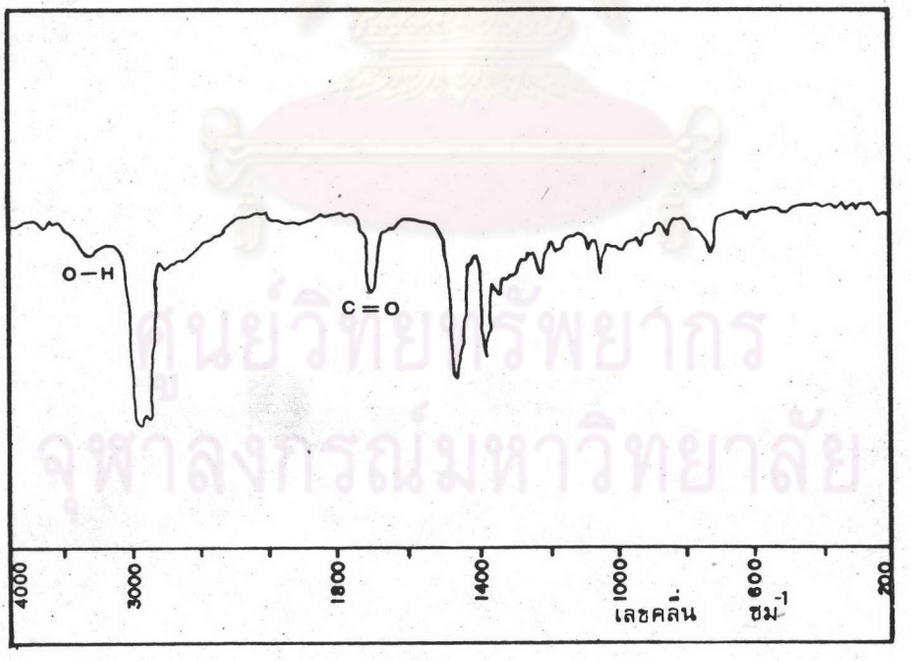
หมู่ฟังชัน	เลขคลื่น ($ชม.^{-1}$)	
	กรด 3α, 15β-DHC	อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก
หมู่ไฮดรอกซิล	3280	3300
หมู่คาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิก	1700	1700

จากสเปคตรัมของกรดน้ำดีทั้งสองซึ่งบ่งบอกว่าในโมเลกุลของกรดน้ำดีทั้งสองประกอบด้วย หมู่คาร์บอนิล (C=O) ของกรดคาร์บอกซิลิกและหมู่ไฮดรอกซิล (O-H) โดยมิได้บอกตำแหน่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 อินฟราเรดสเปคตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16



รูปที่ 20 อินฟราเรดสเปคตรัมของกรด 3α, 15β-DHC (11)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.5 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์

เตรียมอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและกรด 3α, 15β-DHC ตามวิธีในข้อ 2.12.5

3.6.5.1 คาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์

จากคาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก (รูปที่ 21) สนับสนุนการมีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ และการมีคาร์บอน 24 อะตอม โดยสเปคตรัมปรากฏพีคของคาร์บอน 24 พีค แบ่งเป็นเมทธิลคาร์บอน ($-CH_3$) 3 อะตอม เมทธิลลีนคาร์บอน ($-CH_2-$) 10 อะตอม เทอร์เชียรีคาร์บอน ($-\overset{|}{C}H$) 8 อะตอม ซึ่งมีเทอร์เชียรีคาร์บอน 2 อะตอมที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่ ควอเทอนารีคาร์บอน ($-\overset{|}{\underset{|}{C}}-$) 3 อะตอม ซึ่งมี 1 อะตอมที่เป็นหมู่คาร์บอกซิล ตำแหน่งของพีคเหล่านี้แสดงไว้ในตารางที่ 14

สเปคตรัมของกรด 3α, 15β-DHC (ดังรูปที่ 22) ให้แบบแผนเหมือนกันกับอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเช่นกัน

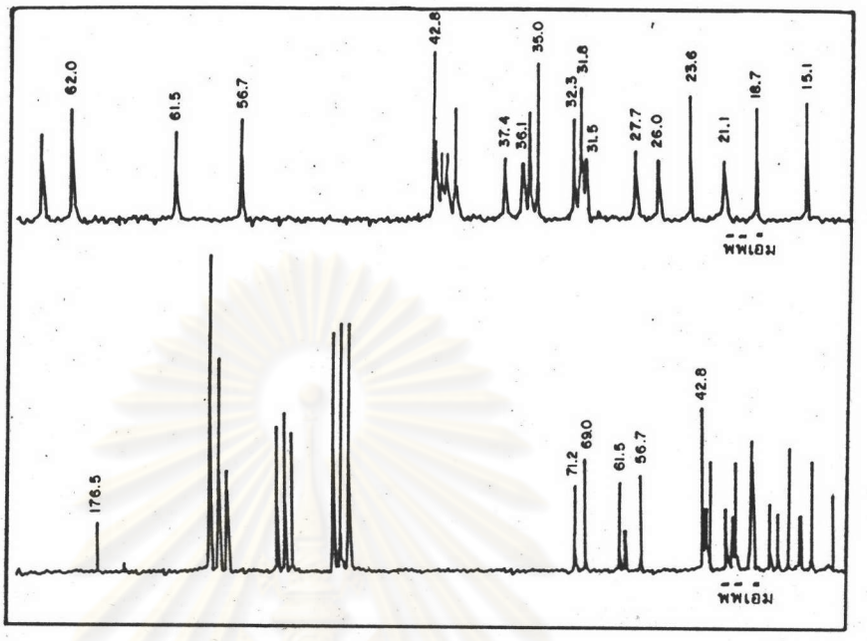
อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกจึงเป็นอนุพันธ์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ และอาจเป็นกรด 3α, 15β-DHC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

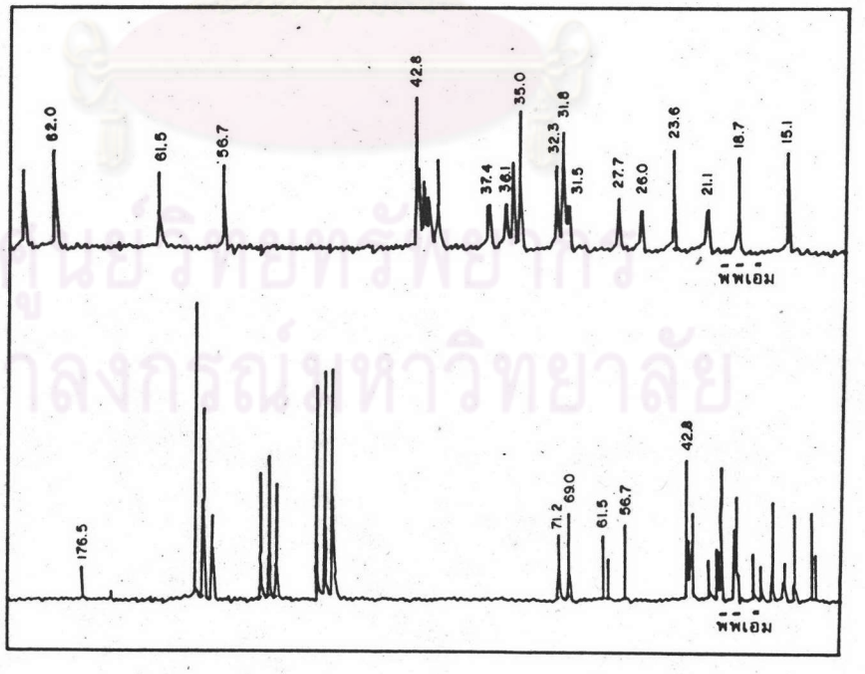
ตารางที่ 14 เคมิคัลชิฟท์ (Chemical shift) ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก โดยวิธีคาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

เคมิคัลชิฟท์ (พีพีเอ็ม)	ตำแหน่งของคาร์บอน	เคมิคัลชิฟท์ (พีพีเอ็ม)	ตำแหน่งของคาร์บอน
36.1	1 - CH_2	42.8	13 - C
31.5	2 - CH_2	61.5	14 - CH
71.2	3 - CHOH	69.0	15 - CHOH
37.4	4 - CH_2	41.1	16 - CH_2
42.8	5 - CH	56.7	17 - CH
27.7	6 - CH_2	15.1	18 - CH_3
26.0	7 - CH_2	23.6	19 - CH_3
32.3	8 - CH	35.6	20 - CH
41.8	9 - CH	18.7	21 - CH_3
35.0	10 - C	31.8	22 - CH_2
21.1	11 - CH_2	31.8	23 - CH_2
41.9	12 - CH_2	176.5	24 - COOH

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 คาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16



รูปที่ 22 คาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรด 3α, 15β-DHC

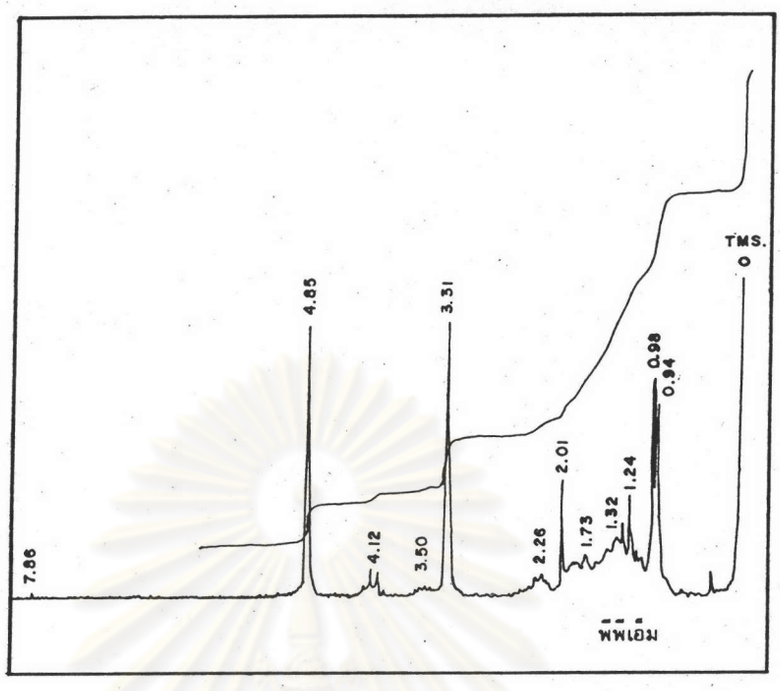
3.6.5.2 <u>โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์</u>

สเปคตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกซึ่งปรากฏดังรูปที่ 23 ปรากฏพีคของไฮโดรเจนอะตอมที่เชื่อมอยู่กับคาร์บอนอะตอมซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเชื่อมอยู่ด้วย (C<u>H</u>OH) 2 พีค คือที่ค่าเคมิคัลชิฟท์ 4.14 และ 3.50 พีพีเอ็ม เนื่องจากในสเปคตรัมของกรดลิโทโคลิกจะปรากฏพีคของไฮโดรเจนอะตอมที่เชื่อมอยู่กับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเชื่อมอยู่ด้วยและเป็น 3 เบตาโปรตอน (3β-C<u>H</u>OH) ดังนั้นพีคที่ 3.50 พีพีเอ็มจะเป็นพีคของ 3 เบตาโปรตอนด้วย

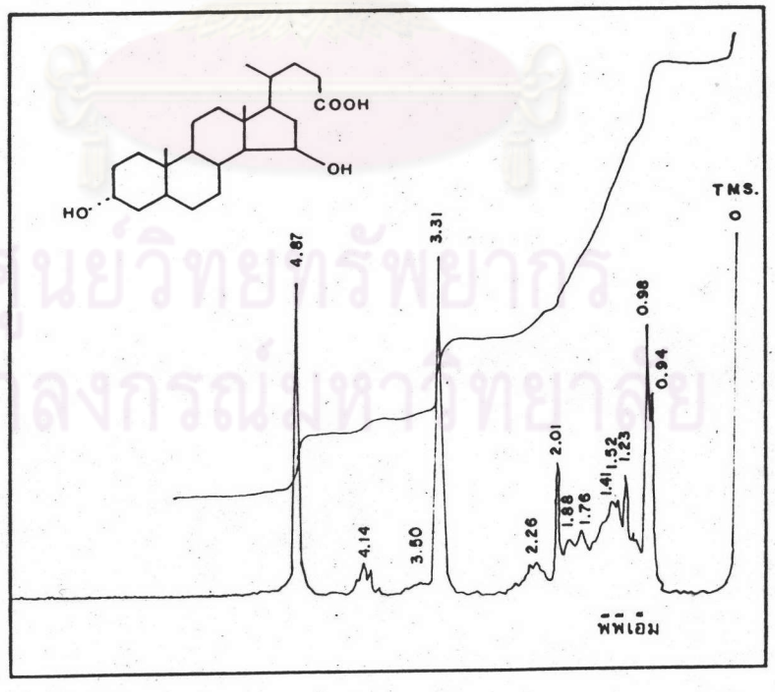
ตำแหน่งของพีคที่ 4.14 พีพีเอ็ม จะสามารถเป็นพีคของไฮโดรเจนอะตอมที่เชื่อมอยู่กับคาร์บอนอะตอมซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเชื่อมอยู่ด้วย (C<u>H</u>OH) โดยคาร์บอนอะตอมอาจเป็นตำแหน่ง 14 15 หรือ 16

เนื่องจากสเปคตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกดังแสดงในรูปที่ 23 จะเหมือนกับสเปคตรัมของกรด 3α, 15β-DHC (รูปที่ 24) ซึ่งแสดงว่า อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเป็นกรดน้ำดีชนิดเดียวกันกับกรด 3α, 15B-DHC

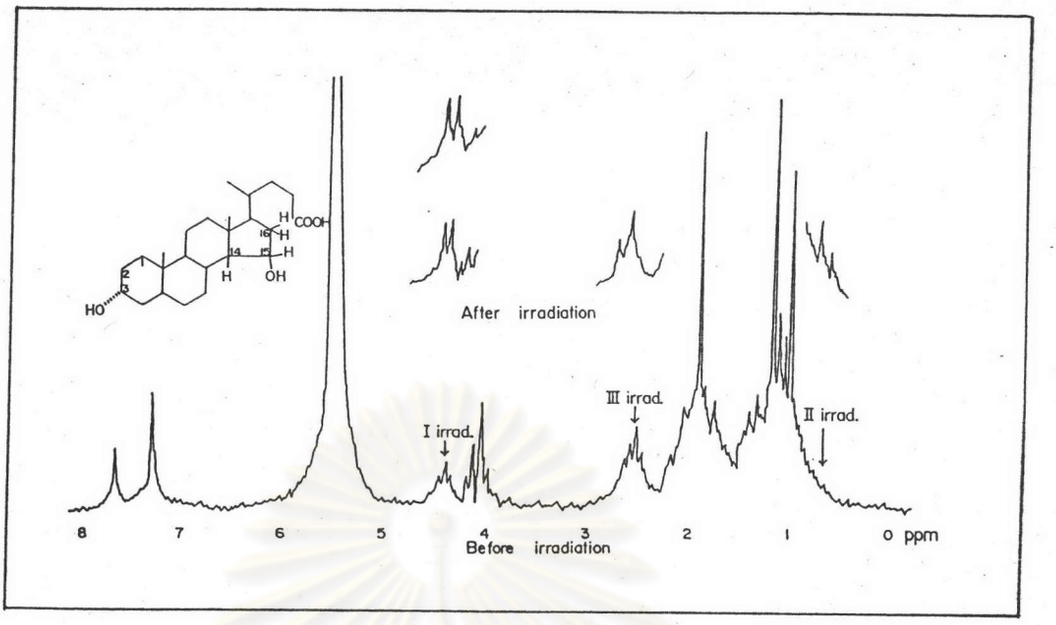
นอกจากนี้เมื่อศึกษาโดยวิธี ดีคับปลิ้งโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Decoupling proton nuclear magnetic resonance) ดังแสดงในรูปที่ 25 เมื่อเพิ่มพลังงาน(irradiate)ที่ตำแหน่ง I (4.4 พีพีเอ็ม) ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอนที่คาร์บอน -15 ได้พบการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 0.9 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอนที่คาร์บอน -14 และที่ตำแหน่ง 2.6 พีพีเอ็มซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอนที่คาร์บอน -16 เมื่อเพิ่มพลังงานที่ตำแหน่ง II (0.9 พีพีเอ็ม) พบการเปลี่ยนแปลงของพีคที่ตำแหน่ง 4.4 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอนที่คาร์บอน -15 ในทำนองเดียวกันเมื่อเพิ่มพลังงานที่ตำแหน่งที่ III (2.6 พีพีเอ็ม) ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอนที่คาร์บอน -16 พบการเปลี่ยนแปลงของพีคที่ตำแหน่ง 4.4 พีพีเอ็ม ในทำนองเดียวกันพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสำหรับกรด 3α , 15β-DHC (รูปที่ 26) ดังนั้นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกจึงเป็นกรด 3α, 15β-DHC



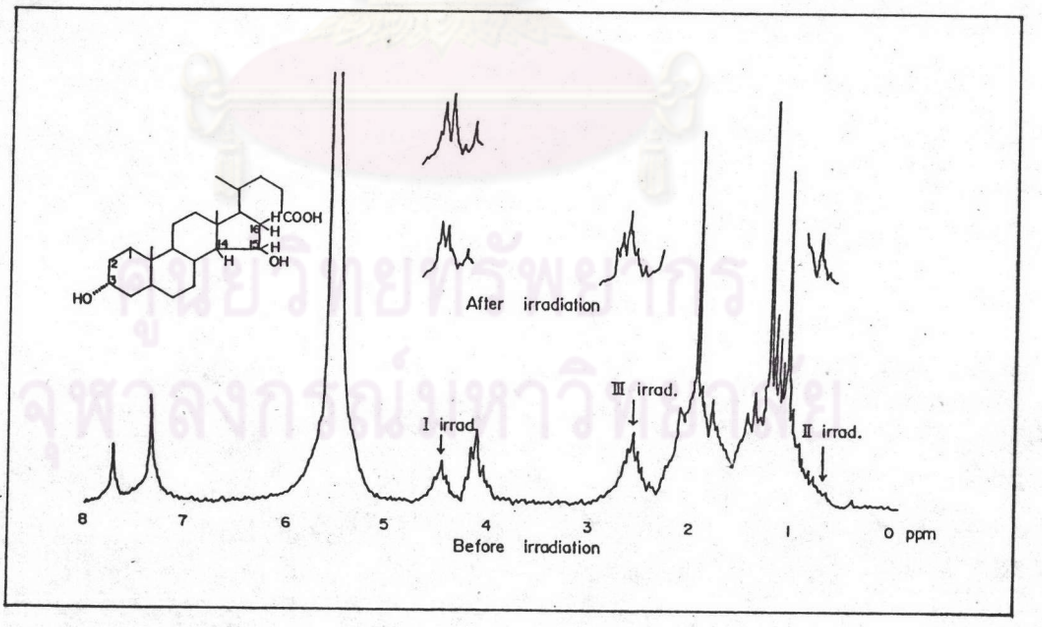
รูปที่ 23 โปรตอน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16



รูปที่ 24 โปรตอน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ 3α, 15β-DHC



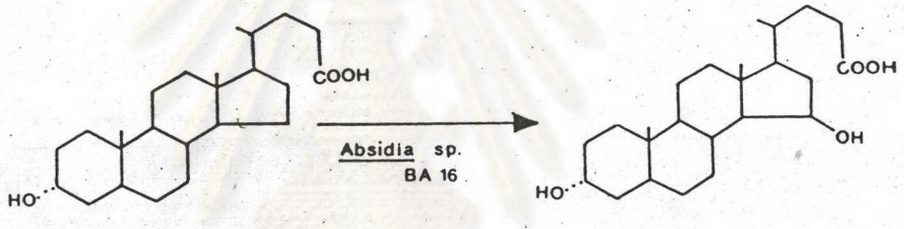
รูปที่ 25 ดีคับปลิ้งโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16



รูปที่ 26 ดีคับปลิ้งโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรด 3α, 15β-DHC

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 โดยการวิเคราะห์ทางเคมีดังกล่าวแล้วสามารถสรุปได้ว่าอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกนี้มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น กรด 3α, 15β-DHC ซึ่งเป็นกรดชนิดเดียวกันกับกรดน้ำดีที่มีรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1982 โดยเชื้อรา Cunninghamella blakesleeana ST-22(11)

การวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาการผลิตกรด 3α, 15β-DHC ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลเข้าที่อะตอมของคาร์บอนตำแหน่งที่ 15 ของกรดลิโทโคลิก โดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเรียกว่าปฏิกริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxylation) ดังแสดงในรูปที่ 27



กรด 3 แอลฟา 5 เบตาโคลานิก

กรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก

รูปที่ 27 การเปลี่ยนรูปกรด 3 แอลฟา 5 เบตาโคลานิก เป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย