5

การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการจำแนกโครงสร้างของอนุพันธ์ที่แปรรูปจากกรดลิโทโคลิกโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16

นางสาวอ้อยทิพย์ กาญจนบัญจพล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-070-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012851

I 18281395

Isolation, Purification and Structural Identification of Lithocholic Acid Derivative Transformed by Absidia sp. BA16

Miss Oytip Kanjanapanjapol

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1987

ISBN 974-568-070-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการจำแนกโครงสร้างของอนุพันธ์ที่แปรรูปจากกรดลิโทโคลิก โดยเชื้อรา Absidia sp. BA16

โดย นางสาวอ้อยทิพย์ กาญจนปัญจพล

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อุดม ก๊กผล)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการจำแนกโครงสร้างของอนุพันธ์ที่แปรรูปจากกรดลิโทโคลิกโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16
ชื่อนิสิต	นางสาวอ้อยทิพย์ กาญจนปัญจพล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล
	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เชื้อรา Absidia sp. BA16 สามารถแปรรูปกรดลิโทโคลิกไปเป็นอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกหลัก 2 ชนิด ซึ่งมีค่า R_f และสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางใกล้เคียงกับกรดอูโซดีออกซีโคลิกและกรดคีโนดีออกซีโคลิก

สกัดแยกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเอทธิลอซีเตทและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี หลังจากนั้นตกผลึกด้วยสารผสมเอทธิลอซีเตทและเฮกเซน ได้ศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบอินฟราเรดสเปคตรัม คาร์บอน-13 และโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่า อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกนี้เป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Isolation, Purification and Structural Identification of Lithocholic Acid Derivative Transformed by Absidia sp. BA16

Name Miss Oytip Kanjanapanjapol

Thesis Advisors Associated Professor Naline Nilubol Ph. D.
Associated Professor Sanha Panichayakul Ph. D..

Department Microbiology

Academic Year 1986

Abstract

The fungus Absidia sp. BA16 was found to be able to transform lithocholic acid into two major derivatives which possessed the R_f value and the color after developed on TLC plate are similar to those of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid.

The product was extracted from the culture broth with ethyl acetate and purified by silica gel column chromatography followed by crystallizing with the mixture of ethyl acetate and hexane. The product was identified as 3α,15β-dihydroxy-5β-cholanic acid on the basis of elemental analysis, IR, ^{13}C-NMR, ^{1}H-NMR etc..

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล และรองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ Dr. T.Nihira แห่งมหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น ที่ได้กรุณาแนะนำวิธีการทำให้กรดน้ำดีบริสุทธิ์และช่วยตรวจหาโครงสร้างของกรดน้ำดีโดยใช้แมสสเปคโตรมิเตอร์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร รองศาสตราจารย์ ดร.อุดม ก๊กผล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความสะดวกในการใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟและขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่สถาบันฯ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อน ๆ และพี่ ๆ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอขอบคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ตลอดจนสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือ ทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญกราฟ ..... ฐ
คำย่อ ..... ฑ
บทที่
1. บทนำ 1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 22
3. ผลการวิจัย 34
4. สรุปผลการทดลอง 68
เอกสารอ้างอิง 72
ภาคผนวก 79
ประวัติผู้เขียน 81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1. ขั้นตอนการสังเคราะห์กรดน้ำดีอิสระและกรดน้ำดีคอนจูเกต เริ่มจากสารตั้งต้นคือโคเลสเตอรอล 2
2. การสร้างกรดน้ำดีทุติยภูมิในคนโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ 3
3. สูตรโครงสร้างของแอลฟาซิมนอล 4
4. การสังเคราะห์กรดอูโซดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยวิธีทางอินทรีย์เคมี 5
5. การย่อยสลายกรดไกลโคโคลิกเป็นกรดโคลิกและไกลซีน 8
6. การเปลี่ยนกรด 3 แอลฟา 5 เบตาโคลานิก เป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก โดยเชื้อรา Cunninghamella blakesleeana ST-22 9
7. การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรดดีออกซีโคลิกโดย E. coli 9
8. การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรด 3 แอลฟา 12 แอลฟาไดไฮดรอกซี 7 ออกโซโคลานิก โดยเชื้อรา Alcaligenes faecalis 10
9. การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรด 7 แอลฟา 12 แอลฟาไดไฮดรอกซี 3 ออกโซโคล 4 เอนอิก โดยแบคทีเรียมในดินสายพันธุ์ CE-1 ... 10
10. การเปลี่ยนกรด 3, 12 ไดออกโซโคลานิกเป็นกรด 3 แอลฟา-ไฮดรอกซี 12 ออกโซโคลานิก โดยยีสต์ 11
11. การเปลี่ยนบิสนอโคล 4 เอน 3 ออน 22 ออลเป็น 6 เบตา 11 แอลฟา 22 ไตรไฮดรอกซีบิสนอโคล 4 เอน 3 โอน โดยเชื้อรา Rhizopus arrhiza 11
12. การเปลี่ยนกรดดีออกซีโคลิกเป็นกรดดีออกซีไบเลียนิก โดย Arthobacter simplex 12

รูปที่ หน้า

13. เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 ในช่วงเวลาต่าง ๆ (6-120 ชม) กับกรดน้ำดีมาตรฐาน กรดอูโซดีออกซีโคลิก กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง 35
14. เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส กับกรดน้ำดีมาตรฐานคีโนออกซีโคลิก โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง 38
15. สรุปขั้นตอนการทำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกให้บริสุทธิ์ 49
16. แมสสเปคตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 56
17. แมสสเปคตรัมของกรด 3α, 15β-DHC 56
18. การดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลทของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ 58
19. อินฟราเรดสเปคตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 60
20. อินฟราเรดสเปคตรัมของกรด 3α, 15β-DHC 60
21. คาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิต โดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 63
22. คาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรด 3α, 15β-DHC 63
23. โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 65
24. โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรด 3α, 15β-DHC .. 65
25. ดีคับปลิ้งโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16 66
26. ดีคับปลิ้งโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรด 3α, 15β-DHC 66

รูปที่ หน้า

27. การเปลี่ยนรูปกรด 3 แอลฟา 5 เบตาโคลานิกเป็น
กรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก 66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ปริมาณน้ำดีที่ได้จากสัตว์ในประเทศสหรัฐอเมริกา 6
2. ปริมาณการนำเข้าน้ำดี สารประกอบของน้ำดีของประเทศสหรัฐอเมริกา 6
3. ความเข้มสีของกรดลิโทโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกซึ่งได้จากการเปลี่ยนรูปของกรดลิโทโคลิกโดย Absidia sp. BA16 ที่เวลาต่าง ๆ โดยการทำให้เกิดสีตามวิธี 2.5 เทียบกับความเข้มสีของกรดน้ำดีมาตรฐาน 36
4. เปรียบเทียบความเข้มสีของกรดลิโทโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียสและแยกผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบางเทียบกับกรดดีไนดีออกซีโคลิก 39
5. ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 210 องศาเซลเซียส 42
6. ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 220 องศาเซลเซียส 42
7. ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 230 องศาเซลเซียส 43
8. ระยะทางการเคลื่อนที่ของกรดลิโทโคลิก อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กันบนแผ่นโครมาโตแกรมเมื่อทำการแยกตามวิธีการทดลอง 2.10.1 46
9. ความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ .. 49
10. เวลาที่กรดน้ำดีมาตรฐานและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกอยู่ในคอลัมน์และค่ารีเทนชันแฟคเตอร์ ในการตรวจวัดโดยวิธีไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี 52

ตารางที่ หน้า

11. คุณสมบัติที่สำคัญบางประการของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและกรด 3α, 15β-DHC 53

12. ธาตุองค์ประกอบของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 54

13. ตำแหน่งของพีคที่สำคัญของกรด 3α, 15β-DHC และอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก 59

14. เคมิคัลชิฟท์ (Chemical shift) ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก โดยวิธีคาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ 62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญกราฟ

กราฟที่ หน้า

1. ความสัมพันธ์ระหว่างเอชอีทีพีและความดันของแกสไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส 44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

UDCA = กรดอูโซดีออกซีโคลิก (ursodeoxycholic acid)

CDCA = กรดคีโนดีออกซีโคลิก (chenodeoxycholic acid)

LCA = กรดลิโทโคลิก (lithocholic acid)

TMeP = ไตรเมทธิลเพนเทน (trimethylpentane)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย