

การสกัดอะชาไคแรคตินจากเมล็ดสะเดาและปฏิกิริยากับไลเปส

นางสาวอุมากรณ์ อารณพัฒน์พงศ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-403-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EXTRACTION OF AZADIRACHTIN FROM NEEM SEEDS
AND REACTION WITH LIPASES**



Miss Umakorn Arpornpattanapong

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science**

Programme of Biotechnology

Graduate School

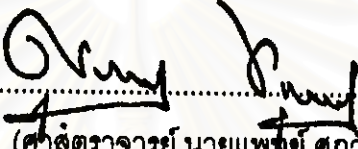
Chulalongkorn University

Academic Year 1996

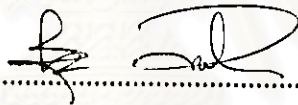
ISBN 974-635-403-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสกัดอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดาและปฏิกิริยากับไลเปส
โดย นางสาว อุมากรณี อากรณีพัฒน์พงศ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

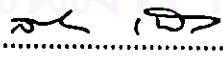

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชูติวงศ์)

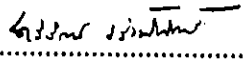
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเสี๋ย)

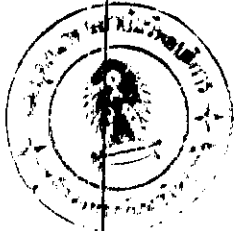

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.โสภณ เรืองสำราญ)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



อนุภรณ์ อารณต์หัตถพงศ์ การสกัดอะซาโคแรกทินจากเมล็ดสะเคาและปฏิกิริยากับไลเปส
(EXTRACTION OF AZADIRACTIN FROM NEEM SEEDS AND REACTION WITH
LIPASES) อ.ที่ปรึกษา ศศ.ดร. อมร เพชรสม, 123 หน้า. ISBN 974-635-403-5

นำเมล็ดสะเคาแห้งและบดละเอียดสกัดสารด้วยวิธีการ 2 วิธี วิธีแรกเป็นการสกัดด้วย Soxhlet โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย แล้วนำกากที่เหลือหลังการสกัดด้วยเฮกเซนสกัดอีกครั้งด้วยเมทานอล แล้วเอาสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดเมทานอลด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ในกรวยแยกก่อนที่จะล้างด้วย เอทิลอะซิเตตและเฮกเซน สารสกัดเอทิลอะซิเตตถูกแยกโดยซิลิกา เจล คอลัมน์ซึ่งถูกบรรจุในโหลอื่น ตัวชะจะเปลี่ยนไปตั้งแต่ 2% ถึง 9% เมทานอลในโหลอื่นตามลำดับ เก็บลำดับส่วนของคอลัมน์ในเครื่อง HPLC ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด วิธีที่ 2 ถูกสกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายร่วม แล้วเอาสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดของตัวทำละลายทั้งสองเช่นเดียวกับวิธีแรก สารสกัดที่ได้ถูกแยกโดยคอลัมน์ เซฟาเค็กซ์ซึ่งถูกบรรจุในเมทานอลในคลอโรฟอร์ม 50% เก็บลำดับส่วนของคอลัมน์ในเครื่อง HPLC ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด การหาสูตรโครงสร้างของสารแต่ละชนิดอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และหลักฐานทาง NMR และ MS ทั้งสองวิธีได้สารอะซาโคแรกทิน เอ แต่วิธีที่ 2 จะทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่า อะซาโคแรกทินวิธีที่ 2 มีความบริสุทธิ์มากกว่าวิธีแรกเล็กน้อย

การศึกษาปฏิกิริยาของอะซาโคแรกทินตัวหนึ่งด้วย ไรโซพิส ไลเปส หรือ แกนคিকা ไลเปส ทดลองโดยการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆ ผลการทดลองไม่สามารถบอกได้ว่าปฏิกิริยาเกิด ใต้หรือไม่ เนื่องจากสารละลายที่มีการควบคุมโดยไม่ใช้เอนไซม์ (control) ก็เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่นเดียวกับที่มีเอนไซม์

ภาควิชา
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา 2539

ลายมือชื่อนิติคุณ อนุภรณ์ อารณต์หัตถพงศ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อมร เพชรสม
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

** C 626972: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: AZADIRACTIN/AZADIRACHTA INDICA/LIPASES

UMAKORN ARPORNATTANAPONG : EXTRACTION OF AZADIRACTIN FROM NEEM SEEDS AND REACTION WITH LIPASES. THESIS ADVISOR : ASSIS.PROF.AMORN BETSOM, Ph.D. 123 pp. ISBN 974-635-403-5

Dried and ground neem seeds were extracted by two methods. The first one was extracted with soxhlet by hexane. The residue left after hexane extraction was reextracted by methanol. The impurity in the crude extract of methanol was eliminated by various kinds of solvents in separatory funnel before washing the crude extract by ethylacetate-hexane. The crude ethylacetate-hexane was chromatographed on a silica gel column packed in toluene. The eluent was changed stepwise from 2% to 9% methanol in toluene, respectively. Two pure components were obtained by HPLC. The second method was extracted by co-extraction solvents, hexane and ethanol. The impurity in the crude extract was eliminated by the same method as the first one. The crude extract was chromatographed on sephadex column packed in 50% methanol-chloroform. Two pure components were obtained by HPLC. The structures of those four components obtained by both methods were established on the basis of physical, chemical properties, NMR. and MS. Both methods obtained Azadirachtin A, but the second extraction was easier, quicker, and the Azadirachtin A obtained was a little purier than Azadirachtin A obtained by the first method.

Reaction of a kind of Azadirachtin with Rhizopus or Candida lipase was studied and carried out by incubating at 37 celsius and various period of time. Result of experiments could not indicate whether the reaction was successful or not since solution with no enzyme (control) did change like solution with enzyme.

ภาควิชา.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....

ปีการศึกษา 2539.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ได้รับความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอกราบ
ขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความ
เป็นกันเองแก่ศิษย์ และกรุณาให้คำแนะนำด้านวิชาการ ตลอดจนปัญหาต่าง ๆ จนสำเร็จไปได้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร เลขาธิการหลักสูตร
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพและประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอด
ภาคการศึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ไสภณ เรืองสำราญ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
สมใจ เพ็งปรีชา ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบและให้คำปรึกษาทางด้าน NMR ตั้งแต่เริ่มศึกษา
วิชานี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ
ปิ่นพานิชการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคส์ตฤศาสน์ ที่กรุณาแนะนำแนวทางวิจัย
ให้สุดมุ่งหมายได้เร็วขึ้น

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาในระหว่างดำเนินงานวิจัย ให้กำลังใจ และช่วยแก้ไข
ปัญหาต่าง ๆ ทุก ๆ ด้านที่ผู้เขียนเป็นกังวล

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ นิสิตอดีตและปัจจุบันในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรม
พันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกทางด้านเครื่องมือ เครื่องใช้ ตลอดจน
กำลังใจ และความเป็นห่วงเป็นใย

ขอขอบคุณ คุณนารินทร์ นิตการ คุณธนารัตน์ แต่งเจริญสุข คุณปราณิน จบกลศึก
และคุณกนิษฐา อุดสี เพื่อนร่วมงาน ที่กรมทรัพย์สินทางปัญญา ที่ให้กำลังใจ และช่วยพิมพ์จน
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง บิดา มารดา น้องหนองและหลานจูนที่ให้ทั้ง
กำลังใจที่อบอุ่นอย่างยิ่ง และกำลังภายในช่วงทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์
ประสาทวิชาแก่ผู้เขียน

สารบัญ

หน้า

| | |
|-------------------------|-----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ซ |
| สารบัญรูป..... | ฅ |
| สารบัญแผนภาพ..... | ญ |
| สารบัญภาพ..... | ฎ-ฏ |
| คำย่อ..... | ฐ |

บทที่

| | |
|--|-----|
| 1. บทนำ..... | 1 |
| 2. การสำรวจเอกสารอ้างอิง..... | 12 |
| 3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง..... | 20 |
| 4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... | 44 |
| 5. สรุปผลการทดลอง..... | 72 |
| รายการอ้างอิง..... | 75 |
| ภาคผนวก..... | 83 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 123 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|----------|--|
| 1 | แสดงสารอินทรีย์ที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของตะไคร่.....4-5 |
| 2 | แสดงความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐาน อะธาไดแรคตินกับพื้นที่ใต้พีคที่ retention time ของอะธาไดแรคติน.....27 |
| 3 | แสดงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ในสภาวะที่ต่างกัน.....29 |
| 4 | แสดงผลการแยกสารสกัดเมล็ดตะไคร่จากน้ำหนักเมล็ดตะไคร่ 4.0 กิโลกรัม.....47 |
| 5 | แสดงผลการแยกสารสกัดเมทธานอล-โทโลอินโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี.....51 |
| 6 | แสดงผลแยกสารลำดับส่วนที่ 160 - 334 โดยวิธี HPLC.....52 |
| 7 | แสดงผลการแยกลำดับส่วนที่ 39-58 โดยวิธี HPLC.....54 |
| 8 | แสดงการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์โดย HPLC.....54 |
| 9 | แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างอะธาไดแรคตินโดย NMR.....56-57 |
| 10 | แสดงผลการสกัดเมล็ดตะไคร่วิธีที่ 2.....60 |
| 11 | แสดงการเก็บลำดับส่วนของสารโดยใช้เซฟาเดกซ์ เป็นตัวดูดจากน้ำหนักสารเริ่มต้น 5.0 กรัม.....61 |
| 12 | แสดงการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีเก็บลำดับส่วน จากเครื่อง HPLC ซึ่งมีสารละลายอะซิโตนในไตรล 30% เป็นตัวพา.....63 |
| 13 | แสดงการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์โดย HPLC.....64 |
| 14 | แสดงการเปลี่ยนแปลงจากโครมาโทแกรม HPLC เมื่อต้ม ไลเปสในสารละลายอะธาไดแรคติน.....69 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 1 | แสดงสารประกอบบางชนิดในสะเดา..... | 6 |
| 2 | แสดงการสังเคราะห์ cyclohexadecanolide..... | 10 |
| 3 | แสดงการสังเคราะห์แอลกอฮอล์..... | 11 |
| 4 | แสดงโครงสร้างอะซาไดแรคติน..... | 12 |
| 5 | แสดงโครงสร้างอะซาไดแรคตินที่ได้รับการค้นพบ..... | 15 |
| 6 | แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน อะซาไดแรคตินกับพื้นที่ใต้พีค..... | 27 |
| 7 | ผลการทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีแต่ละชั้นของการสกัด..... | 48 |
| 8 | ผลการทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีของการแยกสารสกัด ด้วยเอทธิลอะซิเตต-เฮกเซน..... | 50 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภาพ

| แผนภาพที่ | | หน้า |
|-----------|---|------|
| 1 | การสกัดอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 1..... | 58 |
| 2 | การสกัดอะซาไดแรคตินจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 2..... | 66 |



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|--------|
| 1 | แสดงการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด..... | 84 |
| 2 | แสดงโครมาโทแกรมของสารในลำดับที่ 79-84 และ 48-52 และ สารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคตินที่ได้จากการเก็บลำดับส่วน โดยวิธี HPLC..... | 85 |
| 3-4 | แสดงสเปกตรัมโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=10.1 นาที..... | 86-87 |
| 5-7 | แสดงสเปกตรัมบางส่วนที่ขยายของโปรตอน NMR ของสารสกัด สะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=10.1 นาที..... | 88-90 |
| 8 | แสดงแมสสเปกตรัมของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=10.1 นาที..... | 91 |
| 9 | แสดงแมสสเปกตรัมที่ขยายของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=10.1 นาที..... | 92 |
| 10-11 | แสดงสเปกตรัมโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =5.1 นาที..... | 93-94 |
| 12-14 | แสดงสเปกตรัมบางส่วนที่ขยายของโปรตอน NMR ของสารสกัด สะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =5.1 นาที..... | 95-97 |
| 15 | แสดงสเปกตรัมคาร์บอน - 13 NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =5.1 นาที..... | 98 |
| 16-19 | แสดงสเปกตรัม DEPT 90 และ DEPT 135-C-13 NMR ของ สารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=5.1 นาที..... | 99-102 |
| 20 | แสดงโครมาโทแกรมของสารในลำดับส่วนที่ 54-60 และสารละลาย มาตรฐานอะซาไดแรคตินที่ได้จากเก็บลำดับส่วนโดย HPLC..... | 103 |
| 21 | แสดงโครมาโทแกรมของสารในลำดับส่วนที่ 85-89 และสารละลาย มาตรฐานอะซาไดแรคตินที่ได้จากการเก็บลำดับส่วนโดย HPLC..... | 104 |

| | | |
|-------|--|---------|
| 22-23 | แสดงสเปกตรัมโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =10.3 นาที..... | 105-106 |
| 24-26 | แสดงสเปกตรัมบางส่วนที่ขยายของโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดา ที่ทำ HPLC ที่ retention time =10.3 นาที..... | 107-109 |
| 27 | แสดงสเปกตรัมโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =13.9 นาที..... | 110 |
| 28 | แสดงสเปกตรัมบางส่วนโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =13.9 นาที..... | 111 |
| 29-30 | แสดงสเปกตรัมบางส่วนที่ขยายของโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดา ที่ทำ HPLC ที่ retention time =13.9 นาที..... | 112-113 |
| 31 | แสดงสารละลายอะซิดแรคทิน blank เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง..... | 114 |
| 32 | แสดงสารละลายอะซิดแรคทิน blank เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง..... | 115 |
| 33 | แสดงสารละลายอะซิดแรคทิน blank เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง..... | 116 |
| 34 | แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส โรโซพิลล์ เมื่อเวลา 1 ชั่วโมง..... | 117 |
| 35 | แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส โรโซพิลล์ เมื่อเวลา 4 ชั่วโมง..... | 118 |
| 36 | แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส โรโซพิลล์ เมื่อเวลา 24 ชั่วโมง..... | 119 |
| 37 | แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส แคนดิดา เมื่อเวลา 1 ชั่วโมง..... | 120 |
| 38 | แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส แคนดิดา เมื่อเวลา 4 ชั่วโมง..... | 121 |
| 39 | แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส แคนดิดา เมื่อเวลา 24 ชั่วโมง..... | 122 |

คำย่อ

| | |
|------------------|---|
| ช | เซตเขียน |
| กก. | กิโลกรัม |
| ชม. | ชั่วโมง |
| pH | ความเป็น กรด - เบส |
| น.น. | น้ำหนัก |
| λ_{\max} | ความยาวคลื่นสูงสุด (UV - VIS) |
| ν_{\max} | ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุด (อินฟราเรด) |
| nm | นาโนเมตร |
| C - 1 | คาร์บอนอะตอม ตำแหน่งที่ 1 |
| C - 7 | "-----" 7 |
| C - 11 | "-----" 11 |
| C - 20 | "-----" 20 |
| C - 22, 23 | "-----" 22 และ 23 |
| IR | Infrared Spectrophotometry |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| ppm. | part per million |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย