หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎี

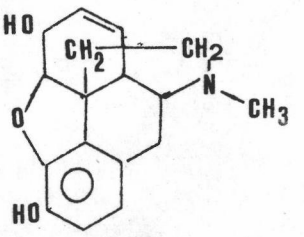
2.1 เรื่องที่เกี่ยวข้องกับใบยาสูบ และนิโคติน

เมื่อปี 1492 โคลัมบัสได้พบชาวอินเดียนแดงใช้ใบยาสูบ ในการสูบ, เคี้ยวและสูดดม ในปี 1550 การสูบได้แพร่เข้าสู่ยุโรป และในปี 1930 มีการศึกษาถึงผลกระทบจากบุหรี่ต่อร่างกาย ในแง่การเป็นมะเร็งที่ปอด โรคหลอดลมอักเสบ โรคหัวใจ เป็นต้น โดยพบว่าบุหรี่ส่งผลต่อสุขภาพผู้สูบ และอัตราการตายสูงขึ้นจากบุหรี่ โดยเฉพาะปี 1962 ได้มีเอกสารแสดงว่าผู้สูบบุหรี่ 2 ซองต่อวัน จะมีอายุน้อยกว่าที่ควรจะเป็นไป 8 ปี จากอายุเดิม ผู้สูบบุหรี่ครึ่งซองต่อวันจะมีอายุลดลงไป 4 ปี เทียบกับอายุที่ควรจะเป็น ต่อมาปี 1610 บุหรี่และยาสูบเป็นที่รู้จักกันทั่วโลก

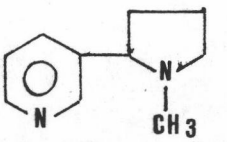
บุคคลส่วนใหญ่กล้วผลกระทบที่เกิดจากการสูบบุหรี่ ทำให้เกิดการต่อต้านการสูบบุหรี่ เนื่องจากการเปลืองงบประมาณค่าใช้จ่าย, เกิดคราบบนฟัน, ผงขี้เถ้าที่สกปรกตามเสื้อผ้า บ้าน และรถยนต์, และรวมทั้งกลิ่นควันของบุหรี่ (1)

เหตุผลที่การสูบบุหรี่เป็นอันตรายเนื่องจากบุหรี่มีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นพิษ และเป็นสารก่อมะเร็ง(Carcinogen) นอกจากนี้ยังมี ไฮโดรเจนไซยาไนด์, ไฮโดรเจนซัลไฟด์, คารบอนโมโนออกไซด์, ไนโตรเจนไดออกไซด์, แอมโมเนียม, ฟอร์มมาดีไฮด์, อะซีทอลดีไฮด์ (acetaldehyde), แอกคอลิน(accolin), เมททานอล, อะซีโตน, ทาร์และแอลคาลอยด์(5)

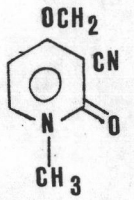
แอลคาลอยด์ค้นพบครั้งแรกโดย Messiner ในปี1818 มีคุณสมบัติคล้าย สารอัลคาไล (alkali) ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และไนโตรเจน โดยจะมีโครงสร้างเป็นแบบ โมเลกุลเฮทเทอโรไซคลิก(Heterocyclic Compound) มีวง(ring)ประกอบไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous bases) และแอลคาลอยด์จะได้จากการสกัดของพืชส่วนใหญ่ ดังรูปที่ 2.1



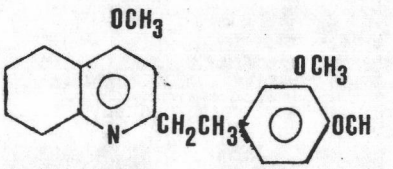
Morphine



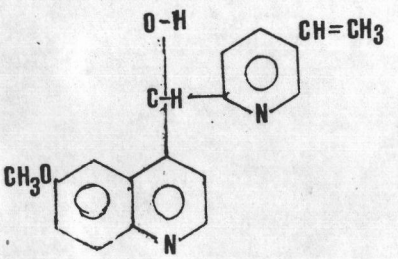
Nicotine



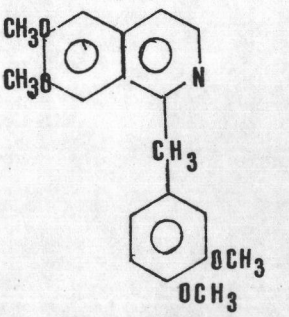
Ricinine



Gulipine



Quinine

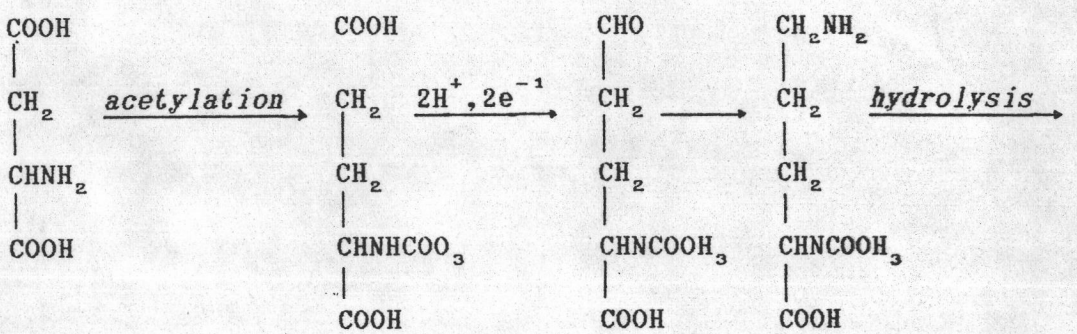


Papaverine

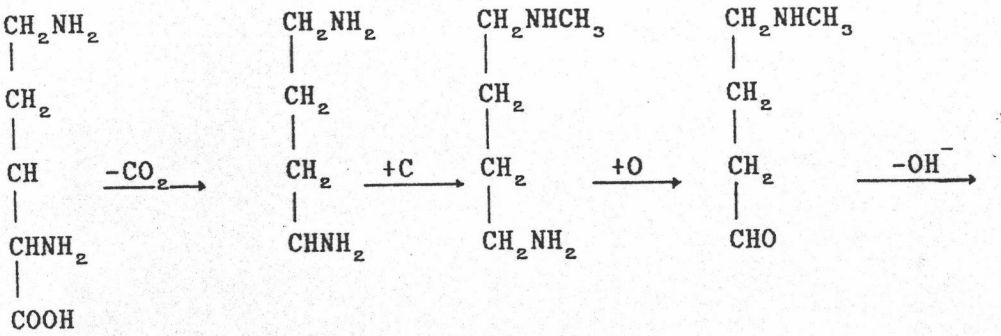
รูปที่ 2.1 แอลคาลอยด์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ

นิโคติน จัดอยู่ในพวกไพรีดีนแอลคาลอยด์(pyridine alkaloid)ที่มีอยู่ในต้นใบยาสูบ เป็นพืชในสกุลSolanceae และอยู่ในจำพวกนิโคติอะนา(Nicotiana)(6) ซึ่งประกอบไปด้วย สารอินทรีย์ส่วนใหญ่คือ สารประกอบคาร์โบไฮเดรตและสารประกอบไนโตรเจน โดยเฉพาะสารประกอบไนโตรเจน อยู่ในหลายรูปแบบ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน แอมโมเนียม เอมีด และแอลคาลอย์ เป็นต้น ในต้นยาสูบประกอบด้วยแอลคาลอยด์ธรรมชาติ เช่น นิโคติน นอร์นิโคติน แอนาเทมิน นิโคติน และนิโคไกริน เป็นต้น ต้นใบยาสูบ นิโคตินอะนา แบ่งออกไป ได้มากกว่า 60 ชนิด ชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมบุหรี่คือ นิโคติอะนาทาแบคคุม ซึ่งสามารถสังเคราะห์ไพรีดีนแอลคาลอยด์ขึ้นได้ โดยไพรีดีนจะสะสมและ เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเจริญเติบโตของต้นใบยาสูบ จากการศึกษาของ TSO ในปี 1828 และจากการทดลองของ Drawson ในปี 1942-1945 รายงานว่านิโคตินปรากฏขึ้นภายในต้นใบยาสูบ โดยนิโคตินสังเคราะห์ขึ้นที่รากแล้วเคลื่อนที่ไปสะสมในใบยา ต่อมา Iljin ได้รายงานว่านิโคตินปรากฏขึ้นเมื่อเมล็ดเริ่มงอก แล้วโดยการสังเคราะห์ที่บริเวณรากร่วมกับอาหารต่างๆ ที่ดูดเข้าไป โดย คาร์บอนไดออกไซด์ และชีวสารที่มีปฏิกริยาว่องไวได้สารประกอบแอลคาลอยด์ ส่วนนอร์นิโคตินได้จากการถ่ายทอดหมู่เมทิลของนิโคติน ซึ่งเป็นปฏิกริยาทรานสเมทีเลชั่นของนิโคติน (7)

จากการศึกษาทางด้านชีวสังเคราะห์ของนิโคติน การถ่ายเทเปลี่ยนไปเพื่อให้ได้สารนิโคติน ยังไม่สามารถทราบกลไกแน่นอนแต่คาดว่าดังนี้ จากรูป 2.2, 2.3, 2.4

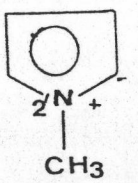


กรด กูลตามิก



ออร์นิทีน เพียวทรีซีน เอ็นเมททิลเพียวทรีซีน

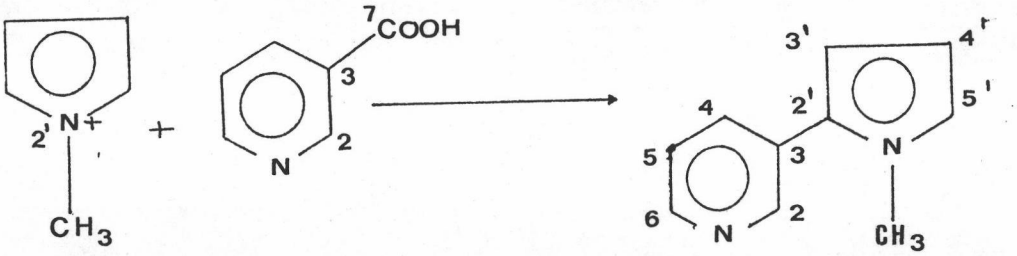
Non-enzymatic Spontaneous



เกลือ เอ็นเมททิลไพโรลิเนียม

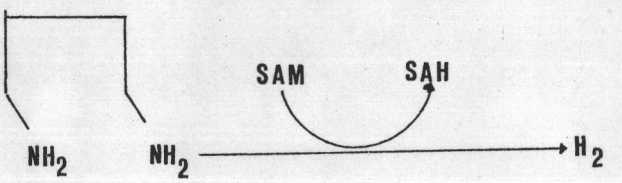
รูปที่ 2.2 การเปลี่ยน ออร์นิทีน(Ornithine)เป็น เกลือเอ็นเมททิลไพโรลิเนียม (N-Methylpyrroliniums salt)

รูปที่ 2.3 กรดควิโนลินิก(Quinolinic acid)กลายเป็นกรดนิโคตินิก(Nicotinic acid)



รูปที่ 2.4 การสังเคราะห์นิโคติน

จากรูปที่ 2.2 ปรากฏว่าในการเปลี่ยนออร์นิทีนไปเป็นเกลือเอ็นเมททิลไพรโรลิเนียม โดยอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกริยา คือออร์นิทีนดีคาบอกซิเลส(Ornithinedecarboxylase เป็นเอมไซน์แรกที่เปลี่ยน ออร์นิทีนไปเป็น เพียวทรีซีน [Putrecine]), เพียวทรีซีนเอ็นเมททริว ทรานเฟอร์เรส(N-methyltransferase(พีเอ็มที(PMT)) และเอ็นเมททไทเพียวทรีซีนออกซิเดส(N-methy-putrecine oxidase) โดยเฉพาะพีเอ็มทีเป็นตัวเร่งปฏิกริยาเมททไทเลชั่น (methylation)ของ เพียวทรีซีน กับเอสเอเอ็ม;SAM (เอสอะดีโนซิลแอลเมททไทโอนีล [S-adenosyl-l-methionine] หรือแอคทีฟเมททไทโอนีล[active methionine]) ซึ่งมีโมเลกุลซัลโฟเนียม[sulfonium compound]ปริมาณสูง) โดย เอสเอเอ็มจะทำกระบวนทรานสเมทีเลชั่น(transmethylation reaction) ด้วยการเคลื่อนย้ายกลุ่มเมททิล (methyly group)จากตัวให้(donor)ไปยัง ไนโตรเจน, ออกซิเจน, ซัลเฟอร์ หรือโมเลกุลตัวรับ (acceptor molecule) หลังการถ่ายเทเอสเอเอ็มจะกลายเป็นเอสเอเฮช[SAH (เอสอะดีโนซิลแอลโฮโมไซสทีน[S-adenosyl-l-homocysteine)(8,9) ดังรูป 2.5

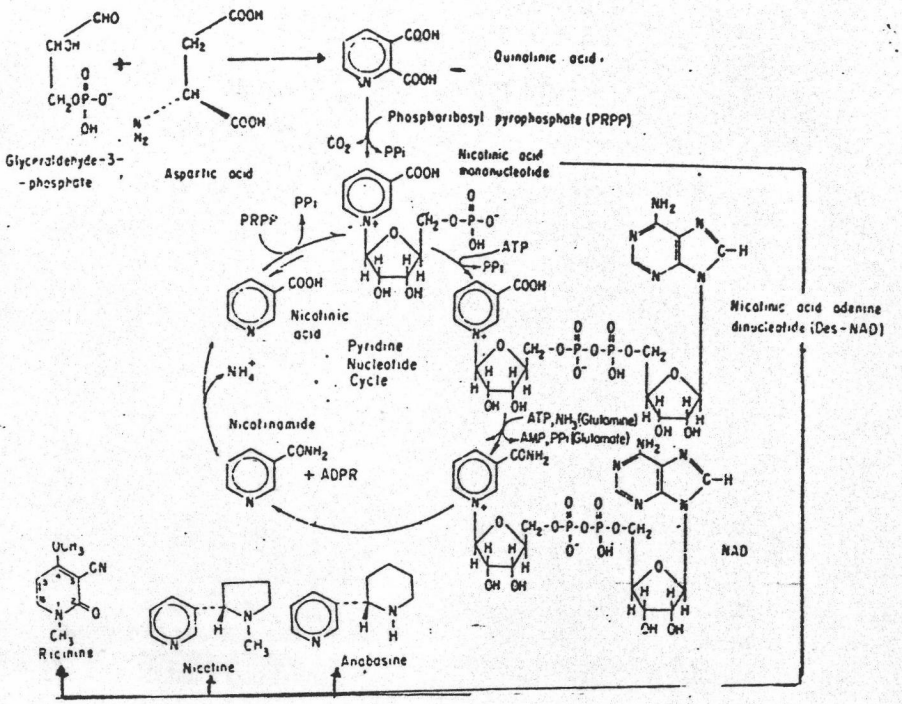


รูปที่ 2.5 กระบวนการทรานสเมทีเลชัน

จากรูปที่ 2.5 เอนไซม์พีเอ็มทีทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 8-9 นอกจากนี้ อัตราการเกิดปฏิกริยาเพียวทรีซีนเมทไทเลชั่น(Putrecine methylation) จะไม่มีผลต่อนิโคติน หรือเกลือเอ็นเมทธิลไพโรลิเนียม และพบว่าฮอร์โมนออกซิน(auxin) 2,4 D(กรดไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติค[Dichlorophenoxyacetic acid])และ IAA(กรดเบตาอินโดลอะซีติก[β-indole acetic acid]) จะส่งผลต่อการลดปริมาณนิโคตินในใบยาสูบ แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อความว่องไว (activity) ของพีเอ็มทีในภายนอกแต่ขณะนั้นยังไม่สามารถแยกเอาเอ็นเมทธิลเพียวทรีซีน (N-Methylputrecine) ออกมาได้ (8,9)

ส่วนปฏิกริยาออกซิเดชันของเอ็นเมทธิลเพียวทรีซีนไปเป็นสี่เมทธิลอะมิโนบูทานอล (4-(methylamino)butanal) นั้นใช้ เอ็นเมทธิลเพียวทรีซีนออกซิเดส(N-Methylputrecine oxidase) เป็นเอนไซม์ที่ทำการเร่งปฏิกริยานี้ นอกจากนั้นสี่เมทธิลอะมิโนบูทานอล จะกลายเป็นเกลือเอ็นเมทธิลไพโรลิเนียม(spontaneously cyclizes)

โดยเอนไซน์เอ็นเมทธิลเพียวทรีซีนทำงานได้ดีที่พีเอช 8 และสามารถส่งผลกระทบถ้ามีปริมาณมากต่อกัมตภาพ(activity)ของเพียวทรีซีน และ คาเดอเวอร์รีน(cadaverine) แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อนิโคติน และอัลคาลอยด์ที่เกี่ยวข้อง นอกจากนี้พบว่าปริมาณนิโคตินจะส่งผลต่อออร์นิทีนดีคาบอกซิเลสด้วย ผลที่ได้คือจะได้สารประกอบวงไพรโรลิดีน (pyrrolidine ring) จากรูปที่ 2.3 สามารถแสดงเป็นแผนภาพวัฏจักรไพริดีนนิวคลีโอไทด์ (pyridineclotide cycle)(8,9) ดังรูปที่ 2.6

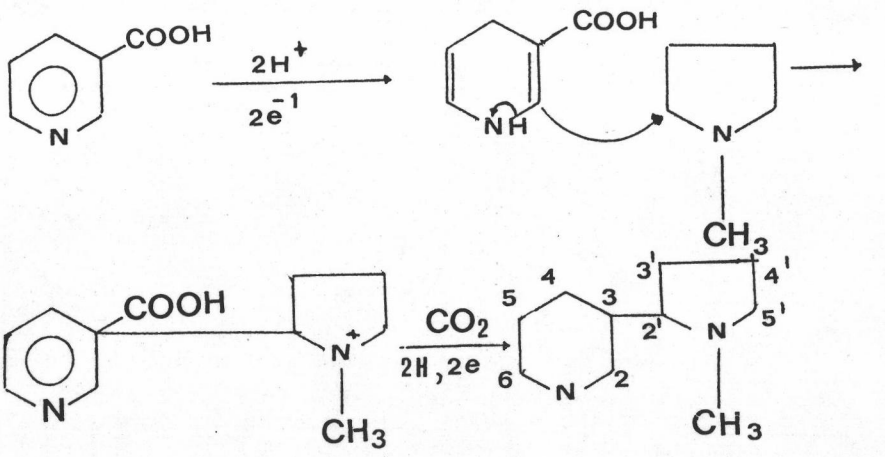


รูปที่ 2.6 วัฏจักร ไพรีดินนิวคลีโอไทด์

จากรูปที่ 2.6 กรดนิโคตินิกโมโนนิวคลีโอไทด์ได้จากปฏิกิริยาทางชีวเคมีระหว่าง PRPP และกรดควิโนลินิก ส่วนกรดนิโคตินิกได้จากปฏิกิริยาชีวเคมีของกรดนิโคตินิกโมโนนิวคลีโอไทด์(8,9)

การที่กรดนิโคตินิกโมโนนิวคีลโอไทด์(Nicotinic acid mononucleotide) กลายเป็นกรดนิโคตินิกอะดีนีนไดนิวคีลโอไทด์(Nicotinic acid adenine dinucleocide (Des-NAD))แล้วเปลี่ยนเป็น นิโคติน, ไรซีนิน(Ricinine), ยะนาเบซีน(Anabasine)และกรดควิดโนรีนิก มาเป็นไรซีน(ricine) ไม่ทราบกลไกที่แน่นอนแต่ผลที่ได้คือ สารประกอบวงไพรีดีน(pyridine ring) (8)

จากรูปที่ 2.4 สามารถแสดงปฏิกริยาที่คาดว่าจะเกิดขึ้นได้ดังในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาที่คาดว่าจะเกิดนิโคติน

จากกระบวนทางเคมีในรูปที่ 2.7 คือ วงไพโรลิดีนจับกับนิวเคลียสไพรีดีนแบบตัวจับนิวเคลียส(nucleophilic) เชื่อมกับอนุพันธุ์พันธะคู่ของไพโรลินน์(pyrroline) ณ ตำแหน่ง C-3 ของไพรีดีน(pyridine) และC-2' ของวงไพโรลิดีน แต่อาจอธิบายได้อีกรูปแบบคือ NADH ทำปฏิกริยากับกรดนิโคตินิกโดยให้ $2H^+$ ตัวแรกทำปฏิกริยากับ N และทำลายพันธะคู่ สร้างพันธะ N-H จากนั้นพันธะคู่เคลื่อนย้ายตัวลงมาขนานกันทำให้ตำแหน่ง C-4 มีประจุเป็นบวกจึงรับ $2H^+$ และ $2e^{-1}$ เข้ามาเพื่อให้พันธะแตกออกแล้วเชื่อมที่ตำแหน่ง C-2 ปฏิกริยานี้จะใช้เอนไซม์ 2 ตัว แต่ไม่ทราบชนิดของเอนไซน์ที่ควบคุมปฏิกริยา จากนั้นจะถูกเอมไซน์นิโคตินิกดีคาร์บอกไซเลสทำปฏิกริยาดีคารบอกซิเลททิง จะได้นิโคติน และ $2H^+$, $2e^{-1}$ และ CO_2 (10)

2.1.1 จากปฏิกริยาเคมีในรูปที่ 2.1 ถึง 2.7 จะได้ว่า

2.1.1.1 กรดนิโคตินิก และออร์นิทีน เป็นสารตั้งต้นของวงไพรีดีน และวงไพโรลิดีน

2.1.1.2 กรดควิโนลินิก เป็นสารตั้งต้นของวงไพรีดีนของกรดนิโคตินิก

2.1.1.3 เพียวทรีซีน, เอ็นเมททิลเพียวทรีซีน และ สี่เมททิลอะมิโนบูทา

นอล จะเป็นตัวทำให้เกิดวงไพโรลิดีนของนิโคติน

2.1.1.4 กลุ่มคาร์บอกซีลิกของกรดนิโคตินิกจะไม่อยู่ในนิโคติน

2.1.2 ปริมาณนิโคตินถูกสังเคราะห์มาจากรากและสะสมปริมาณจะมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับ ตัวแปรในธรรมชาติที่มีผลต่อนิโคตินที่สะสมในใบยาสูบ (11)

2.1.2.1 พันธุ์ยาสูบ ซึ่งแต่ละพันธุ์ให้ปริมาณนิโคตินที่แตกต่างกันไป

2.1.2.2 ธาตุอาหารไนโตรเจนที่ต้นยาสูบได้รับ ถ้ามีมากปริมาณนิโคตินก็มากขึ้น

2.1.2.3 ความเสียหายของรากยาสูบอันเนื่องมาจากน้ำมากเกินไปทำให้เกิดโรคต่อราก ทำให้ปริมาณนิโคตินน้อยลง

2.1.2.4 การตอนยาสูบเร็ว(ก่อนดอกบาน) และตอนให้ต่ำกับการกำจัดหน่อยาสูบที่เกิดขึ้นช่วยให้นิโคตินเพิ่มขึ้น

2.1.2.5 ความชื้นในดิน ถ้าความชื้นต่ำจะได้อัตราการเจริญเติบโตต่ำ ขนาดใบเล็กลง ปริมาณนิโคตินในใบยาสูบเพิ่มขึ้น แต่ถ้าระดับความชื้นสูงจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตขนาดใบโต และอาจเป็นไปได้ที่ไนโตรเจนในดินน้อยลง เพราะถูกชะไปเสีย ทำให้ปริมาณนิโคตินลดลง

2.1.2.6 ระดับความสุกของใบยา ใบยาแก่จะมีปริมาณนิโคตินสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย

2.1.2.7 ตำแหน่งของใบยาบนกิ่ง

2.1.2.8 ระยะการปลูก การพรวนดิน การถ่ายเทอากาศในดิน ความลึกของดิน ผลผลิตต่อไร่ แสงสว่างและอุณหภูมิ

2.2 <u>การสังเคราะห์สารติดฉลากด้วยธาตุกัมตภาพรังสี(12)</u> คือกระบวนการการติดฉลากด้วยธาตุกัมตรังสีเพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นในการติดฉลากจำเป็นต้องเลือกตัวอย่างเป้า

(target)ที่มีคุณลักษณะดังนี้

2.2.1 ให้ได้ผลผลิตไอโซโทปกัมตภาพรังสีที่ต้องการสูงในแง่ปริมาณสาร

2.2.2 มีกระบวนการสังเคราะห์ง่าย และรวดเร็ว หลังการอาบรังสีซึ่งส่งผลให้ใช้แรงงานน้อยและผู้ปฏิบัติงานได้รับรังสีปริมาณน้อย และหลังจากกระบวนการสังเคราะห์ ผลผลิตที่ได้จะมีความแรงรังสีสูง โดยเฉพาะพวกที่มีค่าครึ่งชีวิตสั้น

2.2.3 ความบริสุทธิ์ของผลผลิตมีสูง ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของไอโซโทปรังสี(radio isotopic purity), ความบริสุทธิ์ของทางเรดิโอ(radiochemical purity) และ ความบริสุทธิ์ทางเคมี(chemical purity) สูง

เมื่อได้ตัวอย่างเป้าที่มีลักษณะตามข้อ 2.2.1-2.2.3 จำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติของตัวอย่างเป้าหมายดังนี้ เช่น ตัวอย่างเป้าทนต่อความร้อน และความเข้มรังสีที่อาบสูง โดยเฉพาะตัวอย่างที่ระเหิดให้สารอนินทรีย์ หรือเกลือไนเตรทไม่ควรใช้ ควรใช้ตัวอย่างพวกออกไซด์ โลหะ และคาบอรเนทบางตัว และยังต้องคำนึงถึงความบริสุทธิ์ของตัวอย่างที่นำมาใช้เพื่อไม่ให้เกิดความไม่บริสุทธิ์ของไอโซโทปรังสีน้อยโดยมีภาคตัดขวางการดูดกลืนนิวตรอน (cross section neutron capture) ของตัวอย่างสูง เช่น ตัวอย่างการสังเคราะห์สารกัมตภาพรังสี ได้แก่ ทริเทียม ,คาร์บอน 14 ฯลฯ(12)

ทริเทียม สามารถเขียนเป็น ^{3}H หรือ T โดยมีค่าครึ่งชีวิต 12.23 ปี และให้รังสีเบตา 0.0186 MeV สามารถเตรียมได้จากตัวอย่างเป้า คือ LiF, โลหะผสม Li-Al และโลหะผสม Li-Mg เป็นต้น ถ้าต้องการให้ ^{3}H มีปริมาณสูงต้องใช้ Li-6 ที่ทำให้เข้มสูง ส่วนปฏิกริยาทางนิวเคลียร์ที่เกิดที่ตัวอย่างเป้า คือ $^{6}Li(n,\alpha)^{3}H$ โดยกำหนดให้นิวตรอนครอสเซคชัน 940 บาห์น หรือ $^{3}He(n,p)^{3}H$ เมื่อนิวตรอนครอสเซคชัน 5.33×10^{3} บาห์น(12)

การที่ ^{3}H ถูกนำมาสังเคราะห์เป็นสารติดฉลาก เนื่องจากการแลกเปลี่ยนระหว่าง ^{1}H กับ ทริเทียม เกิดได้ง่ายทั้งในสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์มาจาก

017742

โครงสร้างคาร์บอน รูปต้นแบบของทริเทียม คือ T_2 หรือ T_2O ที่มี ไอโซโทปิคอับแดนซ์ (isotopic abundance)เกือบ 100% ทำให้ผลผลิตมีค่ากัมตภาพรังสีจำเพาะสูง ทริเทียมให้เฉพาะรังสีเบต้าพลังงานต่ำ ทำให้ปฏิบัติงานง่ายและค่าครึ่งชีวิตของทริเทียมพอเหมาะการเตรียมสารประกอบติดฉลากทริเทียมมี 4 วิธีคือ

ก) การแลกเปลี่ยนไอโซโทป(isotope exchange) คือเป็นปฏิกริยาแลกที่กันของไอโซโทปซึ่งมีลักษณะเป็นปฏิกริยาผกผันที่ไอโซโทปธาตุเดียวกันแลกที่กันเช่น

$$AZ^m + BZ^n \rightleftharpoons AZ^n + BZ^m$$

กำหนด m และ n เป็นเลขมวลของธาตุเดียวกัน

ข) การสังเคราะห์ทางเคมีโดยตรง(Directchemical Synthesis) คือการสังเคราะห์สารติดฉลากจากสารเคมีติดฉลากทริเทรียม(tritiated reagent) กับสารตั้งต้นที่เหมาะสมซึ่งข้อดีจะได้ความแรงรังสีจำเพาะสูง แต่การสังเคราะห์ทำได้ยาก

ค) การสังเคราะห์ทางชีวเคมี(Biochemical Synthesis) จะเกิดขึ้นได้ในสารประกอบโมเลกุลเชิงซ้อน เป็นกระบวนการที่เกิดได้ง่าย แต่ต้องหาสารตั้งต้น(substrate) ที่เหมาะสมโดยสามารถแบ่งกระบวนการได้ 3 แบบ

1) ปฏิกริยาที่เกิดจากเอนไซม์ชี้เฉพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น ดังนี้

(ก) สารตั้งต้นอินทรีย์ เป็นการติดฉลากโครงสร้างโมเลกุลโดยอาศัยการแปลงเอมไซน์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกริยา(emzyne-catalyzed transformation)

(ข) สารตั้งต้นอนินทรีย์ ใช้ T_2Oเป็นสารตั้งต้นโดยอาศัยเอมไซน์ออกซิเดส(emzyme oxidase) หรือรีดักเตส(reductase)กับกรดบางตัว

2) ใช้โมเลกุลที่ติดฉลากด้วยทริเทียมเป็นสารตั้งต้น โดยโมเลกุลอยู่ในรูปกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต เพียวรีน เป็นต้น และจะอาศัยเนื้อเยื่อที่มีการเจริญสูงเป็นตัวสังเคราะห์

3) ใช้น้ำติดฉลากทริเทียม(Tritiated water) เป็นสารตั้งต้นโดยจะผสมในอาหารเพาะเลี้ยง และใช้สิ่งมีชีวิตทำการสังเคราะห์ขึ้น

แต่ผลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวเคมีจะได้ผลผลิตต่ำ และมีผลผลิตข้างเคียงสูง

ง) การติดฉลากแบบรีคอล์ย คือปฏิกิริยาที่ทำให้เกิด อะตอมทริเทียมที่รีคอลย์หรือ ไตรตรอน(tritron) โดยอาศัยปฏิกิริยานิวเคลียร์คือ $^{6}Li(n,\alpha)^{3}H$ และ $^{3}He(n,p)^{3}H$ ซึ่งไตรตรอนที่ได้จะมีพลังงานจลน์สูง ถ้าชนโมเลกุลจะเปลี่ยนรูปเป็นโมเลกุลที่มีพันธะ ปฏิกริยานี้เรียกว่าปฏิกริยาอะตอมร้อน(Hot-atom reaction) มี 2 แบบ

1) ปฏิกริยาวัฏภาคควบแน่น(Condensed Phase Reaction) คือให้สารประกอบที่จะติดฉลากอยู่ในรูปสถานะของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซเหลว ผสมกับเกลือลิเทียมประมาณ 10% ต่อน้ำหนัก นำไปอาบรังสีนิวตรอน โดยต้องให้เกิดการแตกตัวด้วยรังสี(radio lysis)น้อยที่สุด นอกจากนั้นขนาดของเม็ดของเกลือลิเทียมยิ่งละเอียด จะทำให้ผลได้(yiled) และความแรงรังสีจำเพาะสูงขึ้น แต่ปฏิกิริยานี้จะเกิดผลผลิตข้างเคียงได้หลายแบบ และปริมาณมาก

2) ปฏิกิริยาวัฏภาคก๊าซ(Gas Phase Reaction) โดยผสม He กับสารประกอบที่จะติดฉลากในหลอดแก้วควอซท์ และนำไปอาบรังสี

คารบอนสิบสี่ หรือ C-14 มีค่าครึ่งชีวิต 5730 ปีให้รังสีเบต้าพลังงาน 0.156 MeV ได้จากปฏิกิริยานิวเคลียร์ $^{14}N(n,p)^{14}C$ และการติดฉลากด้วย C-14 แบ่งเป็น 3 วิธี

ก) การติดฉลากแบบริคอล์ย คือการแทนที่ ^{12}C หรือเพิ่ม ^{14}C เข้าไปในโมเลกุลของสารประกอบ โดยโมเลกุลนั้นจะต้องมี ^{14}N หรือเติม ^{14}N เข้าไปก่อนจะไปอาบรังสีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยานิวเคลียร์ $^{14}N(n,p)^{14}C$ โดย C^{14} จะเป็นอะตอมที่ถูกรีคอล์ย(recoil atom) ที่มีพลังงานจลน์สูงถูกทำให้ช้าลงด้วยการทำปฏิกริยากับโมเลกุลของสารอินทรีย์ที่ไม่ติด

ฉลาก ซึ่งจะได้สารติดฉลาก ^{14}C แทนที่ ^{12}C หรือเพิ่มเข้าไปอีก ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่ความแรงรังสีจำเพาะต่ำไม่เหมาะไปใช้เป็นสารติดตาม แล้วเกิดผลผลิตข้างเคียงปริมาณมาก

ข) การสังเคราะห์ทางเคมีโดยตรง คือการสังเคราะห์แบบเดียวกับการสังเคราะห์สารเคมีทั่วไปให้ได้โมเลกุลที่ขนาดใหญ่ หรือตำแหน่งที่ต้องการ โดย ^{14}C ตั้งต้นส่วนใหญ่อยู่ในรูป CO_2

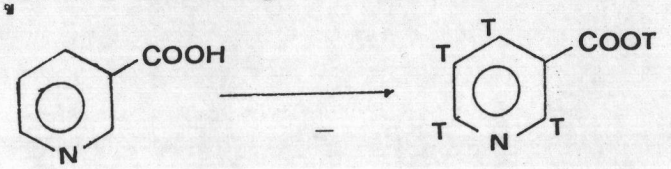
ค) กระบวนการติดฉลากทางชีวเคมี คือเป็นกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวเคมีของโมเลกุลเชิงซ้อน(complex molecule) โดยใช้สารตั้งต้นอนินทรีย์ในรูป CO_2 หรือ $CO_3^=$ เช่น ในการสังเคราะห์แสงของพืชหรือการสังเคราะห์ในรูปกรด อะมิโน ติดฉลากได้จากการให้สัตว์รับเอาพืชที่สัมผัส CO_2 บางทีอาจใช้โมเลกุลเชิงซ้อนที่ติดฉลากกับ ^{14}C มาทำการสังเคราะห์ให้เกิดสารติดฉลากใหม่

2.3 <u>รายงานเอกสารอ้างอิงการสังเคราะห์กรดนิโคตินิกรังสีและกรดนิโคตินิก</u>

จากที่ได้ทราบว่ากรดนิโคตินิกเป็นสารตั้งต้นของนิโคตินนั่นคือกรดนิโคตินนิกมันตรังสีเป็นสารตั้งต้นของนิโคตินกัมมันตรังสี ได้แก่

2.3.1 รายงานผลการวิจัยของ Drawnson และคณะ (13) ได้แก่

2.3.1.1 การสังเคราะห์กรดนิโคตินิก $-T_4$ ได้จากการนำกรดนิโคตินิกผสมกับ Li_2CO_3 ในอัตราส่วน 18:1 ต่อน้ำหนักนำไปอาบรังสีนิวตรอนช้าเพื่อให้เกิดปฏิกิริยานิวเคลียร์ $^1n+^6LI \quad ^3H+^4He$ โดยไตรตรอน(^3H) จะชนพันธะเคมีในกรดนิโคตินิกให้แตก และเข้าไปแทนที่ดังรูปที่ 2.8 โดยอาศัยปฏิกิริยาอะตอมร้อนของปฏิกิริยาวัฏภาคควบแน่น



กรดนิโคตินิกทริเทียม

รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาวัฏภาคควบแน่นของกรดนิโคตินิก

หลังจากการอาบรังสีทำให้บริสุทธิ์โดยการทำระเหิดภายใต้สูญญากาศ และตกผลึกด้วยน้ำ และอัลกอฮอล์และนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงคัลลัส(callus)ได้ อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มปริมาณกัมตภาพรังสีได้ด้วยการรีฟลักซ์ด้วยเมททานอล และกรดเข้มข้นซัลฟูริก แล้วลดปริมาตร และทำให้เป็นด่างด้วยโซเดียมคาบอเนต(sodium carbonate) และทำการสกัดต่อด้วยอีเทอร์ ทำให้แห้งด้วย Drierite($CaSO_4$) และขจัดอีเทอร์ออกภายใต้สูญญากาศ ละลายสารในรูปน้ำมันด้วย 50 มิลลิลิตร ของเฮกเซน(Hexane) 2 มิลลิลิตรของเมททานอลร้อน และทิ้งให้เย็นในช่องแช่แข็งตู้เย็นแล้วนำตะกอนไปรีฟลักซ์ด้วยNH_4OHเข้มข้นและทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ และตกผลึกด้วยเบนซิน จะได้นิโคตินามีดกัมตภาพรังสี แล้วนำมาไฮโดรไลซ์โดยใช้การรีฟลักซ์ด้วย 20%โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 50 มิลลิลิตรเวลานาน 15 ชั่วโมง จะได้สารละลายที่เป็นเบส นำมาสกัดด้วยอีเทอร์ 4 ชั่วโมง จากนั้นปรับเป็นกรดด้วย 50 มิลลิลิตร 6 N HCL และทำการสกัดด้วยอีเทอร์ข้ามคืน และทำการสกัดด้วยอีเธอร์เมื่อสารละลายมีพีเอช 3 นาน 3 วันจากนั้นขจัดอีเทอร์ และตกผลึกด้วยน้ำจะได้กรดนิโคตินิกทริเทียมบริสุทธิ์

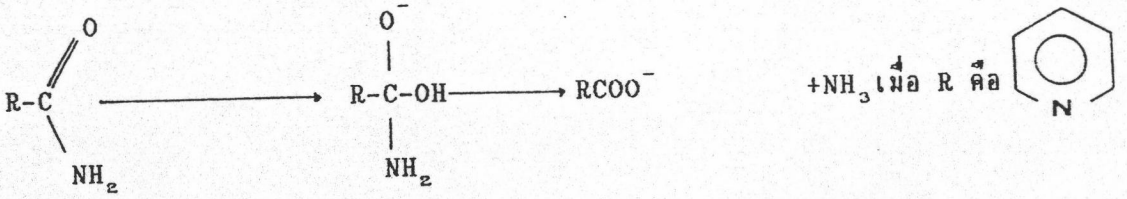
2.3.1.2 กรดนิโคตินิก 2-t อาศัยปฏิกิริยาดีคารบอกไซเลท(decaboxylate) กับกรดควิโนรีนิกติดฉลากทริเทียม(tritiated quinolinic acid) โดย นำกรดควิโนรีนิกทำการรีฟลักซ์ 3 ชั่วโมงร่วมกับ 1 มิลลิลิตรทริเทียมออกไซด์(tritium oxide) ณ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสและนำกากที่ได้นำไปละลายในเบสและสกัดด้วยอีเทอร์ 24 ชั่วโมง แล้วปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 1 และสกัดด้วยอีเทอร์ซ้ำเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้แห้งแล้วระเหิดที่ 150 องศาเซลเซียส ที่ 3 มิลลิเมตรปรอทหลังจากการตกผลึกด้วยเมททานอล

2.3.1.3 กรดนิโคตินิก 6-t มีกระบวนการเตรียมเช่นเดียวกับกรดนิโคตินิก 2-t ยกเว้นใช้ 6-โบรโม-3-พิคโคลิน(6-bromo-3-picoline)

2.3.1.4 การสังเคราะห์กรดนิโคตินิกจากนิโคตินามีด อาศัยปฏิกิริยาเคมี

ระหว่างสารประกอบอามีด กับสารละลายกรดหรือเบสเมื่อให้ความร้อนเข้าไป ผลผลิตที่ได้คือ แอมโมเนีย และกรดคาร์บอกซิลิก บางครั้งอาจได้ผลผลิตออกไปในรูปสารประกอบเกลือ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณกรดและเบสที่ใช้ทำปฏิกิริยา (1,13)

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของอามีดเป็นปฏิกริยาเกิดบนอนุพันธุ์คาร์บอซิลิกที่ทำตัวเป็นตัวจับนิวเคลียส(nucleophillic)ทำให้กลุ่ม-OH เข้าแทนที่ $-NH_2$ ภายใต้สภาวะอัลคาไลน์โดยกระบวนการไฮโดรไลซีส (1)

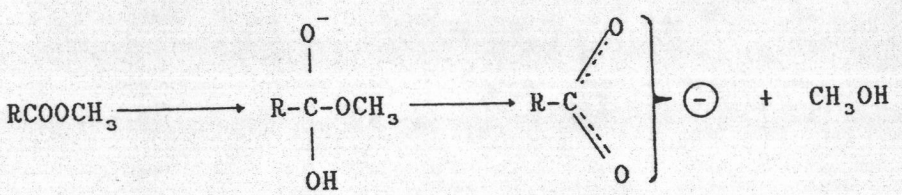


(สารประกอบอามีด) (สารประกอบกรด) (สารประกอบเกลือ)

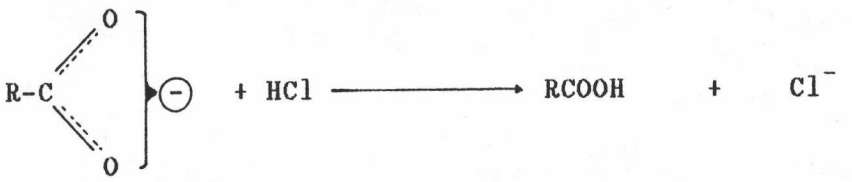
ผลผลิตสามารถทำบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ปฏิกริยาเอสเทอร์ ที่เกิดจากปฏิกริยาเอสเทอร์ หรือ ฟีนอล กับกรดหรืออนุพันธุ์ของกรดดังนี้ (1)

(เอสเทอร์)

เมื่อนำคาร์บอกซีลิกเอสเทอร์(Carboxylic ester) นำมาไฮโดรไลซ์จะได้กรดคาร์บอกซิลิก และแอลกาฮอล์หรือฟีนอล เมื่อให้ความร้อนกับสารละลายกรดหรือเบสภายใต้สภาวะอัลคาไลน์กรดคาร์บอกซิลิกอาจอยู่ในรูปของเกลือก็ได้ (1)

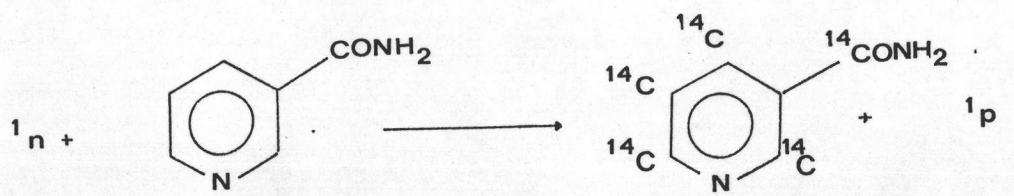


(เกลือ)



(สารประกอบกรด)

กรดนิโคตินิกC-14 สังเคราะห์ขึ้นจากนิโคตินามีดC-14 โดยใช้กระบวนการทางเคมีแบบเดียวกันกับการสังเคราะห์ที่ไม่ติดฉลาก และนิโคตินามีดC-14 ได้มาจากการอาบรังสีเกิดปฏิกริยานิวเคลียร์ $^{14}N+^{1}n \longrightarrow ^{1}p+^{14}C$ และ ^{14}C ที่มีพลังจลน์สูงและเข้าแทนที่ ^{12}C ในสารนิโคตินามีดดังนี้



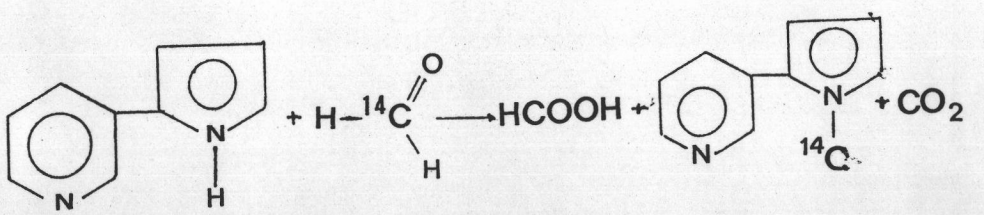
(นิโคตินามีด) (นิโคตินามีดC-14)

2.3.2 รายงานผลการวิจัยของ Gumbley และWillson (14) พบว่าไฮโดรเจนของอะโรเมติคริง(aromatic ring)จะเคลื่อนย้ายตำแหน่งได้(lalibe) ในกรดซัลฟูริก แต่จะไม่เคลื่อนย้ายภายใต้สภาวะชีวะทั่วไป ดังนั้นเป็นการง่ายที่จะติดฉลากวงอะโรเมติคโดยทำให้เสถียรใน H_2SO_4 เข้มข้น

นำกรดนิโคตินิกใส่ในหลอดทดลองแห้ง และแช่เย็นไว้แล้วเติม $^{3}H_2SO_4$(0.05-0.01 มิลลิลิตร โดย $^{3}H_2SO_4$ ได้จากควันของกรดซัลฟุริกผสมกับ $^{3}HO_2$ (4 คูรี/มิลลิลิตร) โดยใช้ H_2SO_4 10 โมล ทำปฏิกริยากับกรดนิโคตินิก 1 โมล การทดลองนี้ต้องปิดหลอดให้มิดชิด (sealed)และเก็บภายใต้อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานถึง 3-5 สัปดาห์ เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนมากที่สุด จากนั้นนำมาเจือจางด้วย NH_4SO_2 และน้ำ การเจือจางจะทำให้

ปฏิกริยาแลกเปลี่ยนใน H^+ มีน้อย ดังนั้นเมื่อนำสารละลายไหลผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange column (ซึ่งทำมาจาก cation exchange Zeo-Crab 225)) H^+ จะติดอยู่ที่เรนชินน้อยมากสิ่งที่คอลัมน์จะจับไว้คือ SO_4 และ ^3H บางส่วนจากกลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl group) และนำกรดนิโคตินิกที่ได้จากคอลัมน์ ทำปฏิกิริยากับ 6N NH_4OH แล้วจึงกำจัด NH_3 โดยใช้เครื่องระเหย(evaporator)จากนั้นนำกากมาหาปริมาณกัมตภาพรังสีและความบริสุทธิ์ของกรดนิโคตินิกกัมมันตรังสี

2.3.3 การสังเคราะห์กรดนิโคตินิกสามารถผลิตจากไพรีดีน ได้ดังรูปที่ 2.9 คือ นำ3-picoline(99% บริสุทธิ์)100 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตรแล้วทำปฏิกริยาออกซิไดซ์ด้วย 450 กรัมของโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตโดยแบ่งออกเป็น 10 ส่วนจากนั้นนำไปรีฟลักซ์ 3-4 ชั่วโมง กำหนดให้การเติมในห้าช่วงแรกของโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตใช้อุณหภูมิ ณ 70 องศาเซลเซียส และในการเติมภาย 5 ช่วงหลัง ณ ที่ 85-90 องศาเซลเซียส ในการเติม $KMnO_4$ แต่ละครั้งจะต้องให้ปฏิกริยานั้นไม่มีสีจึงเติมสารได้ ในการเติมแต่ละครั้งจะต้องละลายด้วยน้ำปริมาณ 20-25 มิลลิลิตรหลังจากปฏิกริยาสุดท้ายไม่มีสีจึงปรับอุณหภูมิ ถึง 95 องศาเซลเซียส (15)



รูปที่ 2.9 กรดนิโคตินิกผลิตจากไพรีดีน

แล้วกรองสารละลายร้อนภายใต้สูญญากาศจะได้ก้อนแมงกานีสไดออกไซด์(manganese dioxide cake) จากนั้นล้างก้อนแมงกานีสไดออกไซด์ด้วยน้ำแบ่งออกเป็น 4 ชุดชุดละ 500 ซีซี. แต่ละชุดนำมากรอง และลดปริมาตรจนแห้ง จากนั้นเติมน้ำลงไป 1250 ซีซี. แล้วปรับพีเอชเป็น 3.4

ด้วยกระดาษพีเอช โดยใช้กรด HCl เข้มข้น 120-130 มิลลิลิตรในการปรับพีเอชจากนั้นแช่เย็นสารข้ามคืน และเก็บตะกอนของกรดนิโคตินิกโดยอาศัยการกรองภายใต้สุญญากาศ แล้วทำการล้างผลิกด้วยน้ำเย็น 3 ครั้ง ครั้งละ 55 ซีซี. และอบแห้งที่ 90-100 องศาเซลเซียส จะได้กรดนิโคตินิก 90 กรัม ความบริสุทธิ์ 90 % หรือ อาจเอาก้อนแมงกานีสไดออกไซด์ นำมาละลายน้ำ 650 ซีซี. แล้วทำให้เย็นลงอย่างช้าจนถึง 5 องศาเซลเซียสเพื่อลดการปนเปื้อนของ KCl จะได้ว่าสาร 10 กรัม มีความบริสุทธิ์ในการนี้ 80% และจะนำสารมาตกผลิกด้วยน้ำร้อนและอบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส จะได้กรดนิโคตินิกบริสุทธิ์ 67 กรัม จากสารประกอบกรด 90 กรัม คิดเป็น 51% (15)

2.4 <u>รายงานเอกสารอ้างอิงการสังเคราะห์นิโคตินและนิโคตินกัมมันตรังสี</u>

2.4.1 รายงานผลการวิจัยของ Lockwood และ คณะ (16) ทำการศึกษาโดยใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เกิดบนอาหารเพาะเลี้ยง M&S ผสมกับ วิตามินบี 0.5 ppm. ที่ประกอบด้วยออกซิน NAA หรือ 2,4-D จะทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ที่ 27 องศาเซลเซียสให้แสงสว่างแก่พืช 12 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ออกซิน NAA 0.2 ppm จะได้นิโคติน 12 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ได้ศึกษาถึงผลกระทบของสารตั้งต้น(precursor) ที่เติมลงไปเพื่อดูผลกระทบระดับปริมาณนิโคติน และสารประกอบอัลคาลอยด์ที่เกี่ยวข้อง โดยสารตั้งต้นคือสารประกอบกรดอะมิโนอย่างเดียว หรือรวมกับกรดนิโคตินิก หรือนิโคตินามีดจะได้ว่านิโคตินามีด 100 ppm จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และปริมาณนิโคตินจะมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับหลอดควบคุมปกติ และพบว่าถ้าใส่กรดนิโคตินิก 10-30 ppm จะยับยั้งหรือมีผลเล็กน้อยต่อปริมาณนิโคติน

2.4.2 รายงานผลการวิจัยของ Tabata และคณะ (17) การเพาะเลี้ยงคัลลัสจาก เมล็ด ราก และใบของ <u>Nicotiana rustica L.</u> พันธุ์ Brasilia บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Linsmaier-Skoog กับ 1 μM 2,4-D และ1 μM ไคนีติน(kinetin) จะได้

ปริมาณนิโคติน 0.25-0.58% ต่อนน.แห้งโดยคัลลัสจากรากในลำดับที่ 4 มีปริมาณนิโคตินสูงสุด 0.587% ต่อ น้ำหนักแห้งเมื่อเทียบกับในธรรมชาติ 0.25% ที่รากและ 0.35% ที่ใบ แต่รายงานของJeffery ในปี 1959 จากใบยาบ่มอย่างน้อย 2.5% และหลังจากนั้น ลำดับที่ 5 หรือ 6 ปริมาณนิโคตินลดลง เนื่องจากการก่อกำเนิดของราก แล้วนำคัลลัสยาสูบไปเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ basal และ ทำการแปรผันปริมาณ 2,4-D จะได้ว่า 2,4-D เท่ากับ 1μM จะยับยั้งการผลิตนิโคตินเกือบสมบูรณ์ และพบว่าถ้าค่า 2,4-D มีมากปริมาณนิโคตินจะลดลง แต่การเจริญเติบโตของคัลลัสมีปริมาณมากขึ้น แต่จากผลการทดลองของ Tabataและคณะ ในปี 1971 ถึง 1976 2,4-D จะยับยั้งการผลิตนิโคตินที่ 0.1μM และจากการศึกษา 2,4-Dไม่สามารถทำให้เกิดอวัยวะขึ้นนอกจากนี้ M.Tabata ได้ศึกษาว่าเมื่อนำคัลลัสจากรากมาแบ่งเป็นส่วนแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ basal 1 μM 2,4-D และ 1 μM ไคนิติน 6 สัปดาห์ ได้ผลว่าปริมาณนิโคตินที่คัลลัสจากรากที่ถูกแบ่งเป็นส่วนไม่เท่ากันโดยพบว่าต่ำสุดได้3.98×10^{-3}% ต่อนน.แห้ง และมากสุด 86.6×10^{-3}% ต่อ นน.แห้ง นั่นคือพบว่าcloneที่ผลิตนิโคตินสูงสุดคือคัลลัสที่มีลักษณะเนื้อเยื่อร่วน สีขาว ถ้านำโคลนไปเพาะต่ออีก 3 สัปดาห์ จะได้ปริมาณนิโคติน 0.29% ต่อน้ำหนักแห้ง

2.4.3 รายงานผลการวิจัยของ Pinol และคณะ (18) พบว่าการเจริญเติบโตและ การผลิตนิโคตินจากเนื้อเยื่อคัลลัสที่ไม่เปลี่ยนเป็นอวัยวะ โดยคัลลัสนี้ได้จากก้านใบยาสูบ Nicotiana tabacum พันธุ์ Burlley 21 เพาะลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ M&S ที่มีออกซินNAA 11.5 μM,ไคนิติน 1 μM เพื่อเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดคัลลัสจากนั้นนำคัลลัสมาเพาะลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ MS NAA 1 μM และ ไคนิติน 1 μM จะได้คัลลัสมีสีน้ำตาลแกมเหลือง ลักษณะร่วน และเมื่อสัปดาห์ที่ 6 ปริมาณนิโคตินจะมีปริมาณสูงสุดคือ 0.16% ต่อ น้ำหนักแห้ง เมื่อดูกราฟการเจริญเติบโตที่วัดในรูปน้ำหนักสดและ น้ำหนักแห้ง จะเห็นว่าการเจริญเติบโตเป็นเช่นเดียวกัน และลดลงหลังสัปดาห์ที่ 6 เนื่องจากอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ลดลง

นอกจากนี้ปริมาณนิโคตินได้ลดลงเนื่องจากนิโคตินในคัลลัสได้ถ่ายเทไปยังอาหารเพาะเลี้ยง และการสร้างเนื้อเยื่อเจริญ(metabolized) การที่ใช้ปริมาณออกซิน NAA ระดับต่ำเพื่อให้การผลิตนิโคตินมีค่าสูงขึ้น เนื่องจากรากของพืชใบยาสูบ ในธรรมชาติมีปริมาณออกซินระดับต่ำเช่นเดียวกัน ในการทดลองนี้จะได้ปริมาณนิโคตินในการทดลองสูงกว่าในธรรมชาติ(ก้านใบมีปริมาณนิโคติน 0.04% และใบ มีปริมาณนิโคติน 0.15 +0.02% ต่อนน.แห้ง นั่นคือ ออกซินส่งผลกระทบต่อปริมาณนิโคติน จากนั้นทำการศึกษาวิทยาเซลโดยการตรวจสอบเนื้อเยื่อเจริญ ได้ผลคือเนื้อเยื่อเจริญเมื่อเจริญขึ้นจะส่งผลทั้งอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณนิโคตินและสารประกอบอัลคาลอยด์ที่เกี่ยวข้อง โดยจะพบว่าถ้า NAA มีปริมาณสูงจะทำให้พื้นที่ของเนื้อเยื่อเจริญภายในเซลล์ลดลงและเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์รูปแบบใหม่เช่น เซลล์ท่อลำเลียงน้ำ(tracheas), เซลล์หลอดตะแกรง(sieve) และเซลล์เวสเซล(vessle elements) เป็นต้น นอกจากนี้ยังยับยั้งการผลิตนิโคติน หมายความว่าการผลิตนิโคตินจะเกิดขึ้น ณ บริเวณเนื้อเยื่อเจริญของเซลล์ของเนื้อเยื่อคัลลัส

2.4.4 รายงานผลการวิจัยของ Robins และคณะ (19) ได้ศึกษาและตรวจสอบถึงผลกระทบของกรดนิโคตินิก, นิโคตินามีด และนิโคตินต่อการเจริญเติบโตของการเพาะเลี้ยงรากฝอยของ Nicotiana rustica ซึ่งเลี้ยงผสมกับ Angrobacterium rhizogen เลี้ยงลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อGramborg'sB5 ซึ่งมีน้ำตาลซูโคส(sucrose) 80 mM และ Mes หรือกรด 2-เอ็นมอร์โฟลิโนซัลโฟนิก(2-(N-morpholino) sulphonic acid) 50 mM พีเอชอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 5.6 และทำการเพาะรากน้ำหนัก 0.25 กรัม ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหลว 50 ซีซี. ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน โดยศึกษาว่ากรดนิโคตินิก และนิโคตินามีด มีผลต่อการเจริญเติบโตเมื่อทำการเพาะเลี้ยงราก โดยการเติมกรดนิโคตินิก 1 ถึง 5 mM ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่ากรดนิโคตินิก 1.0 mM ยับยั้งการเจริญเติบโต 50% และกรดนิโคตินิก 2.5 mM จะยับยั้งการเจริญเติบโตโดยเด็ดขาด และถ้าเปลี่ยนเป็นนิโคติ

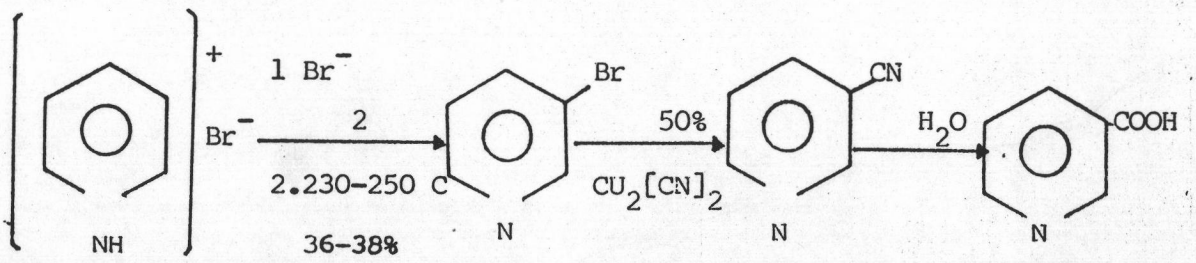
นามามีด 1.5 mM ยังยั้งการเจริญเติบโต 60% และนิโคตินามีด 10 mM ยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งหมด ผลกระทบของกรดนิโคตินิกและนิโคตินนามีด กับผลผลิตอัลคาลอยด์ จากการศึกษาของ Ohata และคณะ ในปี 1978 และ Lockwood และ Essa ในปี 1984 ปริมาณกรดนิโคตินิกสูงสุดไม่เกิน 1.5 เท่าของที่รากต้องการและไม่ควรมีปริมาณนิโคตินมามีดเกิน 2 เท่าของรากต้องการ โดยพบว่าปริมาณกรดนิโคตินิก 1.5 เท่าจะยับยั้งเจริญเติบโต 50% และปริมาณนิโคตินามีดจะยับยั้งการเจริญเติบ 30-40% แต่จากการทดลองของ Robins และคณะ ถ้าใช้กรดนิโคตินิก 2.2 mM จะได้นิโคตินที่ผลิตได้ 16% จากปริมาณของสารตั้งต้น ถ้าปริมาณกรดนิโคตินิกสูงกว่านี้ปริมาณนิโคตินจะต่ำลงและถ้าใช้นิโคตินามีด 10 mM จะได้นิโคติน 1.9% ของ สารตั้งต้น และถ้าใช้นิโคตินามีด 1.5 mM จะได้นิโคติน 6.5% แสดงว่าถ้าใช้นิโคตินนามีดระดับต่ำจะผลิตนิโคตินดี(19)

2.4.5 รายงานผลการวิจัยของ Robins และคณะ (20) การผลิตนิโคติน โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงรากขนอ่อนของนิโคตินารัสติกาด้วยขบวนการการหมัก(Fermentation) การทดลองนี้ คือการเพาะรากขนอ่อน กับ Agrobacterium rhizogenes (Amberlite) XAD-4 ทำการเลี้ยงในถังหมักโดยมีการเลี้ยงสองแบบคือ แบบแบช(batch) และ แบบการไหลอย่างต่อเนื่อง(continuous flow) พบว่าในช่วงเลี้ยงแบบแบช 11 วันแรกจะได้นิโคติน 5.9 มิลลิกรัม/ลิตร และเมื่อเข้าสู่ระยะสุดท้าย ในช่วงการไหลอย่างต่อเนื่อง 2.05 มิลลิกรัม/ลิตร และในช่วง 16 วันของช่วงการไหลอย่างต่อเนื่องจะมีนิโคตินออกมาจากรากสู่อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะได้นิโคตินรวมทั้งในสภาวะ แบช และช่วงการไหลอย่างต่อเนื่องได้ 32.7 มิลลิกรัม โดยมีนิโคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อคิดเป็น 76% ของนิโคตินทั้งหมด และเฉลี่ยผลผลิตนิโคติน 1.54 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน

2.4.5 รายงานผลการวิจัยของ Decker (21) การสังเคราะห์นิโคตินกัมมันตรังสี คือการติดฉลาก C-14 ณ ตำแหน่ง C-2' ของวงไพโรลิดีน หรือในกลุ่มเอ็นเมททริล

(N-methyl group) แล้วนำมาเชื่อมกับ C-3 ในตำแหน่งไพรีดีนนิวเคลียส ซึ่งเป็นการหาได้ว่ากรดนิโคตินิกไปเป็นนิโคตินได้ เช่น

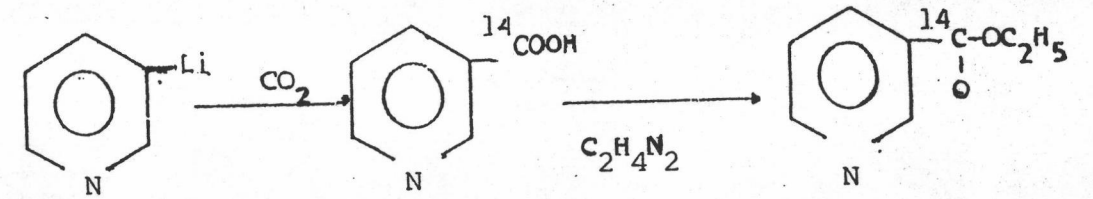
2.4.5.1 การสังเคราะห์ $^{14}CH_3$ ติดฉลากนั้นทำได้ง่ายโดยใช้ปฏิกริยาวอลแลชเลอกรัท(Wallach-Leukart) ทำการกลั่นด้วยไอน้ำและตกตะกอนด้วยกรดพิคริก (picric)จะได้สารไดพิเครต ในรูป $^{14}CH_3$-L-นิโคติน นำไปสกัดด้วยอีเทอร์เพื่อเอากรดพิคริกออกจากสารละลายกรด และทำให้กลายเป็นอัลคาไลน์แล้วขจัดด้วยคลอโรฟอร์ม หรืออีเทอร์ จะได้นิโคตินดังในรูปที่ 2.10



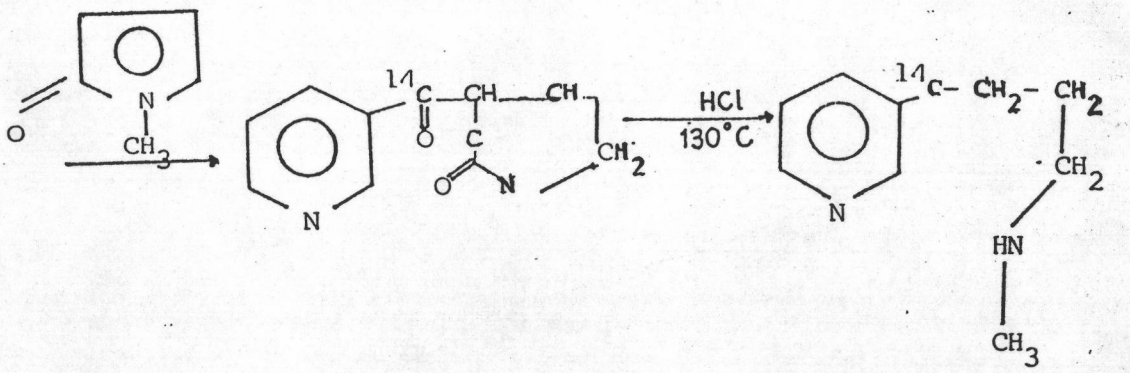
รูปที่ 2.10 การสังเคราะห์ [$^{14}CH_3$]-L-นิโคติน

2.4.5.2 การสังเคราะห์ 2'-^{14}C-DL-นิโคติน โดยเริ่มต้นจากกรด [7-^{14}C]-กรดนิโคตินิก (ซึ่งได้มาจาก $^{14}CO_2$ ทำปฏิกริยากับไพริดีนลิเธียม(pyridine lithium) [โดยใช้วิธีการของ Murray] 29 มิลลิกรัม (4.2 มิลลิคูรี)) ทำการระเหิด 2 ครั้ง แล้วทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ กับไดอะโซมีเทน(diazomethane) ที่ละลายในอีเทอร์ จากนั้นทำให้เจือจางด้วย 239 มิลลิกรัม ของเอทธิลนิโคติเนต(ethyl nicotinate) ที่ไม่ติดฉลาก และกลั่นที่ 120 องศาเซลเซียส ณ ความดัน 12 ทอรร์ นำสารเอสเทอร์(3.7 มิลลิคูรี)ทำปฏิกิริยากับ 0.5 มิลลิลิตร เอ็นเมทธิลไพโรลิโดน(N-methylpyrrolidone) นำเอา 2 มิลลิลิตร ของโซเดียมเอทไทเลท(soduium ethylate)แขวนลอยในเบนซิน นำมาปั่นภายใต้ก๊าซN_2 แล้วเอาเอทธิลนิโคติเนทเมทไทไพโรลิโดน(ethyl nicotinate methyl pyrrolidone) ผสมรวมกันให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยเขย่าภายใต้ก๊าซ N_2 15 ชั่วโมง ณ

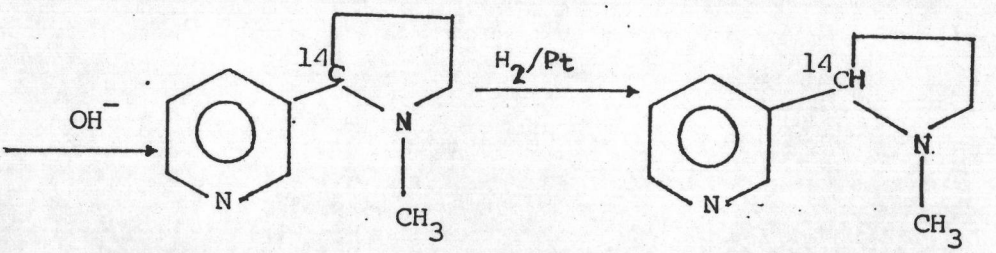
อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 0.5 มิลลิลิตร เบนซินโดยทำปฏิกริยาให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และแช่ลงในถาดน้ำแข็ง จากนั้นเติม 40%กรดอะซิติกแช่เย็น 2.5 มิลลิลิตร แล้วมาสกัดด้วย$CHCl_3$ 5 มิลลิลิตร 4 ครั้งจะได้ไพริดิล-3-เอ็นเมทไทไพโรลิโดนีน-คีโตน (pyridyl-(3)-N-methylpyrrolidony-ketone) ซึ่งหาความเข้มข้นได้จากการเทียบสี (colorimetry) นำสารละลาย 0.02 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย 2 มิลลิลิตรของ 5% $FeCl_3$ ที่ละลายใน 0.01 N HCl เขย่ารวมกัน 15 นาที จนกระทั่งได้สีฟ้า แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นและตกผลึก จากนั้นนำมาสกัดด้วย$CHCl_3$ และทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ แล้วนำเอากากมาละลายใน HClเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 130-135 องศาเซลเซียส 7 ชั่วโมง โดยขวดที่บรรจุต้องปิดสนิท แล้วทำการเปิดภายใต้อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้แห้งแล้วละลายด้วย 3 มิลลิลิตร แอลกอฮอล์ และกรองจะได้ผลึกของไพรีดิล-3-เมทธิลอะมิโนโพรพิลคีโตน(pyridyl-(3)]-[methyl-amino-propyl]-ketone)ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และล้างผลึกด้วยแอลกอฮอล์จะได้สาร 0.73 มิลลิคูรี นำผลึกมาละลาย 5 มิลลิลิตร CH_3OH และปรับพีเอชเป็น 7-8 ด้วยเมททาโนลิคโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์(metha nolic KOH) และตกตะกอนด้วย KClจากนั้นเติม 50 มิลลิกรัม PtO_2 เพื่อเกิดปฏิกริยารีดักชันต่อด้วยเมทธิลไมโยสไมน์(methyl myosmine) เอา H_2 ออกจากนั้นนำผลึกไปกรองและล้างด้วยน้ำแล้วนำไปกลั่นภายใต้ความดันต่ำ เพื่อกำจัดเอากรด และเมททานอล ออกจะได้สารละลายในรูปอัลคาไลน์ แล้วนำมากลั่นด้วยไอน้ำและตกตะกอนให้อยู่ในรูป ไดพิเคต และตกผลึกอีก 2 ครั้ง และอบที่อุณหภูมิ 218-220 องศาเซลเซียส จะได้ [2'-^{14}C]-DL-นิโคติน 134.5 มิลลิกรัม มีความแรงรังสี 0.465 มิลลิคูรี หรือมีกัมตภาพรังสีจำเพาะ 2.15 มิลลิคูรี/มิลลิโมล ซึ่งแสดงปฏิกริยาเคมีที่เกิดขึ้นดังรูปที่ 2.11



radiochemical yiled 42% (90%)

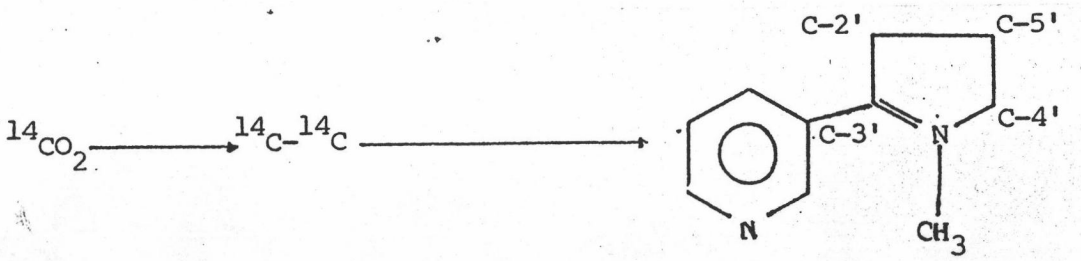


(40%) (75%)



รูปที่ 2.11 การสังเคราะห์ [2'-^{14}C]-DL-นิโคติน

2.4.6 รายงานผลการวิจัยนิโคตินกัมมันตรังสีของ Edward (22) โดยนำก๊าซคาร์บอน[^{14}C, ^{13}C]ไดออกไซด์กัมมันตรังสีให้แก่ต้นใบยาสูบ จะพบว่าตำแหน่งที่คาร์บอนกัมมันตรังสีไปเกาะอยู่ ณ ตำแหน่ง C-2' และ C-3' ซึ่งมีความเสถียรกว่า C-4' และC-5' เนื่องจาก C-2' และC-3'ได้มาจาก 2 หน่วยคาร์บอน(two-carbon unit) ดังรูปที่ 2.12 และ Leete ได้พบว่าปริมาณกัมมันตภาพรังสีที่ C-2' เท่ากับ C-5'(22)

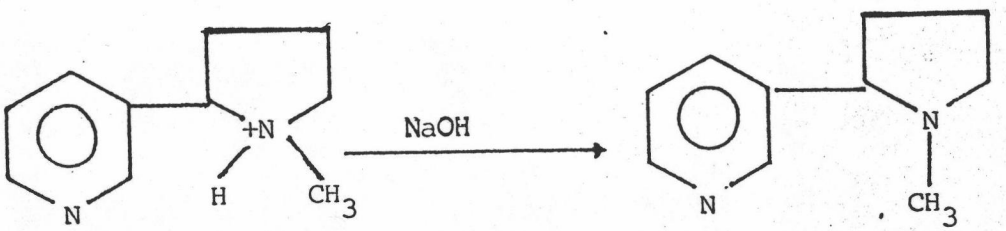


รูปที่ 2.12 ก๊าซ $^{14}CO_2$ เมื่อเข้าไปในนิโคติน

2.5 <u>รายงานเอกสารอ้างอิงการสกัดนิโคติน และนิโคตินกัมมันตรังสี</u> ได้แก่

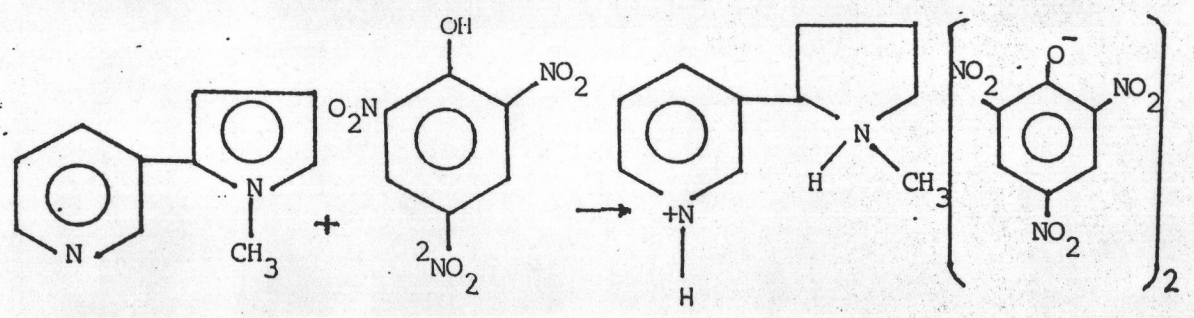
2.5.1 รายงานผลการวิจัยของ Eaton (1) และ Drawson (13) การสกัดนิโคตินจากยาสูบจะต้องศึกษาโครงสร้างโมเลกุลนิโคติน โดยจะพบว่านิโคตินเป็นไดไซคลิก (dicyclic) โมเลกุลโดยแต่ละวงจะมีไนโตรเจนอะตอมอยู่ เนื่องจากไนโตรเจนอะตอมแตกต่างจากคาร์บอนอะตอมทำให้เรียกโมเลกุลนี้ว่า โมเลกุลเฮทเทอโรไซคลิก(Heterocyclic molecule) และไนโตรเจนอะตอมยังทำให้แต่ละวงมีความเป็นเบสสูง นอกจากนี้นิโคตินมีความสมมาตรของไชรอล(chiral asymmetric center) และนิโคตินเป็นลักษณะปิดระนาบแสงไปทางซ้าย(levorotatory compound) แม้ว่าสองวงมีลักษณะความเป็นเบสสูง แต่วงไพโรลิดีนมีค่าความแตกตัวของเบส (k_b) คือ 10^{-4} สามารถจะละลายได้ดีในน้ำ คือรับโปรตอนจากน้ำได้ดี ส่วนวงไพริดีนรับโปรตอนได้ดีจากกรดเจือจาง จากค่า K_b เมื่อนำใบยาสูบไปละลายน้ำไพโรลิดีนจะละลายน้ำอย่างรวดเร็ว นั่นคือการแยกเอานิโคตินออกจากยาสูบ จากนั้นทำให้สารละลายเป็นด่างเพื่อเกิดประจุลบอิสระมากมาย โดยใช้ NaOH ทำให้นิโคตินละลายในน้ำได้น้อยลง ดังรูปที่ 2.13 แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเทอร์ (แต่อีเทอร์ไม่ใช่ตัวสกัดที่ดีเนื่องจากจะนำเอาสารอื่นปะปนมามากมาย) จากนั้นทำการขจัดอีเทอร์ออกจะได้สารในอยู่ในสภาพน้ำมัน ซึ่งมีปริมาณน้อย และไม่สะดวกในการใช้งาน และทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก นอกจากนั้นยังมีสภาพไวต่อความร้อน และถ้าตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นิโคตินโดยปกติจะไม่มีสีจะกลายเป็นสี

สีเหลืองแล้วกลายเป็นน้ำมันสีน้ำตาล เนื่องจากสัมผัสกับอากาศ ,ความร้อน และแสงสว่างดังนั้น จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนนิโคตินให้อยู่ในรูปเกลือพิกเครต



รูปที่ 2.13 นิโคตินในสภาวะอัลคาไล

การเปลี่ยนนิโคตินให้อยู่ในรูปเกลือพิกเครต ต้องใช้กรดพิกริกโดยนิโคตินทำปฏิกริยากับกรดพิกริก(ที่มีโมเลกุลพิกเครตบวกขนาดใหญ่) ทำให้ได้ผลผลิตรูปเกลือที่มีขนาดใหญ่เป็น 4 เท่า หรือมากกว่า 4 เท่าของนิโคตินในรูปที่ 2.14



นิโคติน กรดพิกริก นิโคตินไดพิกเครต

รูปที่ 2.14 การสังเคราะห์นิโคตินไดพิกเครต

2.5.2 รายงานผลการวิจัยของ Lockwood และ Essa (16) นำคัลลัส หรือเซลผสมกับ 5% กรดอะซีติก แล้วบด และกรอง นำน้ำที่กรองได้ทำให้เป็นเบสด้วย 10% NH_4OH จนได้พีเอช 9 จากนั้นทำการสกัดด้วย 50 มิลลิลิตร คลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง และทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ แล้วนำมาไฮโดไลซด้วย 2 M KOH ในแอลกอฮอล์ ณ 60 องศาเซลเซียส นาน 2

2 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดตามลำดับอีกครั้งก็จะได้นิโคติน(16)

2.5.3 รายงานผลการวิจัยของ Tabata และ คณะ (17) นำเอาเซลผงที่ทำให้แห้งด้วยการเยือกแข็ง 200-800 มิลลิลิตร ผสมกับ MgO 9.5 กรัม แล้วกลั่นด้วยไอน้ำ ลงในขวดรูปชมภู่ที่บรรจุ 0.5 N HCl 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายที่กลั่นไป 90 มิลลิตร วัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 236, 259, 282 นาโมเมตร เพื่อหาปริมาณนิโคติน

2.5.4 รายงานผลการวิจัยของ Pinol และ คณะ (18) โดยนำเอาเซลผงที่ทำให้แห้งด้วยการเยือกแข็งแห้ง 0.03 กรัม ผสมกับ 15 มิลลิกรัม 5% $NaCO_3$ และทำให้อิ่มตัวด้วย NaCl แล้วกลั่นที่ 180 องศาเซลเซียสนำสารละลายที่กลั่นได้ 7 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอะนินลิน(anilin) 2 มิลลิลิตร และบัฟเฟอร์ฟอสเฟต(phosphate buffer)ฌ พีเอช 6.1 1% และ 10% 1โมล CNBr และตั้งทิ้งไว้ 7-10 นาทีทำการวัดค่าดูดกลืน 460 นาโมเมตร เพื่อหาปริมาณนิโคติน

2.6 <u>รายงานเอกสารอ้างอิงวิธีการตรวจสอบนิโคตินในด้านคุณภาพ</u> ได้แก่

2.6.1 รายงานผลการวิจัยของ สุนทร วรผนิก (5) โดยนำตัวอย่างใบยาสูบ 0.25 ถึง 0.50 กรัม ผสมกับ 50% อะซีโตนปิดผนิก แล้วเขย่า 30 นาที ทำการกรอง และนำน้ำยาที่กรองได้จุดบนกระดาษกรอง(pH 5.65) แล้วจุ่มลงในน้ำยาเดวลอฟ 18 ชั่วโมง แล้วจึงไปใส่ในหม้อไซยาโนเจนโบรไมด์ ก็จะเกิดสีของแอลคาลอยด์(จะปรากฏนาน 2 ชั่วโมง) ดังนี้

ชนิด	ค่าRf	สี
นิโคติน	0.44	เหลืองส้ม
นอร์นิโคติน	0.09	เหลืองส้มแก่
แอนาเบซิน	0.17	เหลืองปนชมภู

2.6.2 รายงานผลการวิจัยของ Lockwood และคณะ (16) ตรวจสอบด้วย

ก๊าซโครโมโตกราฟฟี โดยใช้ 3% OV-17 packed columm ณ ที่ 140 องศาเซลเซียส โดยใช้ควินโนลิน(Quinoline) เป็นสารตั้งต้นใช้ในการตรวจสอบปริมาณ และส่วนการตรวจสอบคุณภาพจะใช้ OV-1 20 เมตร คลอลัมน์แก้วแบบรูเล็ก(glass capillary) ต่อกับ Carlo Erba Strumentazione 4230 GC และวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยใช้ KratoMS25 สเปกโตรมิเตอร์ ณ 70 อิเล็กตรอนโวล์ทโดยต่อเชื่อมกับ Perkin Elmer GC.

2.6.3 รายงานผลการวิจัยของ Pinol และคณะ (18) โดยนำสารละลายที่ได้จากการกลั่นไอน้ำทำให้แห้งและละลายในเมททานอล 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย 50 ไมโครลิตร หยดบนแผ่นซิลิกาเจล G ซึ่งจะใช้ตัวทำละลาย คือ คลอโรฟอร์ม, เมททานอล และแอมโมเนียม (60:10:1 ปริมาตร/ปริมาตร)แล้วตรวจสอบด้วยสเปรย์สารละลายดราเกนดรอฟ (Dragendorff) บนแผ่นเจล จะได้ R_f นิโคตินเป็น 0.68(18)

2.6.4 รายงานผลการวิจัยของ Robins และคณะ (19) ตรวจสอบโดยใช้สารละลาย 20 ถึง 50 ไมโครลิตร ถ้าเป็นมาจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใช้ 50 ถึง 100 ไมโครลิตร จะใช้ HPLC ซึ่งต่อร่วมกับคลอลัมน์ μBondapack C18(water) ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยปล่อยออกมาทุกๆ 1 มิลลิลิตร/นาที พร้อมกับน้ำ:กรดอะซีโทนิไทร์อะซีติก (acetonitrile acetic acid):เตทตราไฮโดรฟูราน(tetrahydrofuran)(430:12:3:1) ณ พีเอช 4 การตรวจสอบคือ Hplc/MS โดยนำสารละลายที่ได้ไปฉีดสเปร์ย ณ อุณหภูมิผ่านแมสสเปกโตรมิเตอร์ Kratos 50(19)