

การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการจำแนกโครงสร้างของอนุพันธ์ที่

แปรรูปจากกรดลิโทโคลิกโดยเชื้อรา Absidia sp. BA16



นางสาวอ้อยทิพย์ กาญจนปัญญาผล

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530


ISBN 974-568-070-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012851

18281396

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

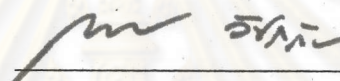
ISBN 974-568-070-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการจำแนกโครงสร้างของ  
อนุพันธ์ที่แปรรูปจากกรดลิโทโคลิก โดยเชื้อรา Absidia  
sp. BA16

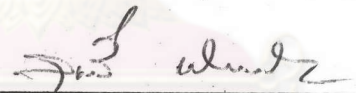
โดย นางสาวอ้อยทิพย์ กาญจนปัญญาผล  
ภาควิชา จุลชีววิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล

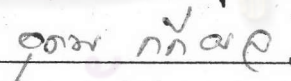


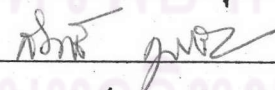
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

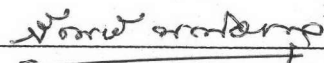
  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรากัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิษuangกูร)

  
กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.อุดม ก๊กนล)

  
กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สังศรี กุลปรีชา)

  
กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัมพันธ์ พิณชัยกุล)

  
กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

หัวข้อวิทยานิพนธ์      การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการจำแนกโครงสร้างของ  
อนุพันธ์ที่แปรรูปจากกรดลิโทโคลิกโดยเชื้อรา Absidia  
sp. BA16

ชื่อนิสิต                      นางสาวอ้อยทิพย์ กาญจนปัญจพล

อาจารย์ที่ปรึกษา          รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล  
รองศาสตราจารย์ ดร.สัมพันธ์ พมิขยกุล

ภาควิชา                        จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา                  2529



บทคัดย่อ

เชื้อรา Absidia sp. BA16 สามารถแปรรูปกรดลิโทโคลิกไปเป็น  
อนุพันธ์กรดลิโทโคลิกหลัก 2 ชนิด ซึ่งมีค่า  $R_f$  และสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นโครมา  
โตกราฟแบบผิวบางใกล้เคียงกับกรดออกซีโคลิกและกรดอินไดออกซีโคลิก  
สกัดแยกอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเอทธิลอะซี  
เตทและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี หลังจากนั้นตก  
ผลึกด้วยสารผสมเอทธิลอะซีเตทและเฮกเซน ได้ศึกษาโครงสร้างของอนุพันธ์  
กรดลิโทโคลิกโดยการวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบอินฟราเรดสเปกตรัม คาร์บอน  
-13 และโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่า อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก  
นี้เป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Isolation, Purification and Structural  
Identification of Lithocholic Acid Deri-  
vative 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  $3\alpha, 15\beta$ -dihydroxy- $5\beta$ -cholanic acid on the basis of elemental analysis, IR,  $^{13}\text{C-NMR}$ ,  $^1\text{H-NMR}$  etc..



## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร.สันต์ พมิขยกุล และรองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุล-ปรีชา ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ Dr. T.Nihira แห่งมหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศ ญี่ปุ่น ที่ได้กรุณาแนะนำวิธีการทำให้นักรณน้ำดีบริสุทธิ์และช่วยตรวจหาโครงสร้างของกรณน้ำดีโดยใช้แมสสเปคโตรมิเตอร์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิษณุางกูร รองศาสตราจารย์ ดร.อุดม กักผล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความสะดวกในการใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟและขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่สถาบันฯ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อน ๆ และที่ ๆ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอขอบคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ตลอดจนสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือ ทั้งกำลังใจ กำลังใจ และกำลังทรัพย์ในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ฅ
สารบัญกราฟ .....	ฉ
คำย่อ .....	ท
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 เริ่มจากสารตั้งต้นคือโคเลสเทอรอล .....	2
2. การสร้างกรดน้ำดีหุติยภูมิในคนโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ .....	3
3. สูตรโครงสร้างของแอลฟาซิมโนล .....	4
4. การสังเคราะห์กรดออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยวิธีทาง อินทรีย์เคมี .....	5
5. การย่อยสลายกรดไกลโคโคลิกเป็นกรดโคลิกและไกลซีน .....	8
6. การเปลี่ยนกรด 3 แอลฟา 5 เบตาโคลานิก เป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตาไดไฮดรอกซี 5 เบตาโคลานิก โดยเชื้อรา <u>Cunninghamella blakesleeana</u> ST-22 .....	9
7. การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรดดีออกซีโคลิกโดย <u>E. coli</u> .....	9
8. การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรด 3 แอลฟา 12 แอลฟาไดไฮดรอกซี 7 ออกโซโคลานิก โดยเชื้อรา <u>Alcaligenes faecalis</u> .....	10
9. การเปลี่ยนกรดโคลิกเป็นกรด 7 แอลฟา 12 แอลฟาไดไฮดรอกซี 3 ออกโซโคล 4 เอนอิก โดยแบคทีเรียในดินสายพันธุ์ CE-1 ...	10
10. การเปลี่ยนกรด 3, 12 ไดออกโซโคลานิกเป็นกรด 3 แอลฟา- ไฮดรอกซี 12 ออกโซโคลานิก โดยยีสต์ .....	11
11. การเปลี่ยนบีสโนโคล 4 เอน 3 ออน 22 ออลเป็น 6 เบตา 11 แอลฟา 22 ไตรไฮดรอกซีบีสโนโคล 4 เอน 3 โอน โดย เชื้อรา <u>Rhizopus arrhiza</u> .....	11
12. การเปลี่ยนกรดดีออกซีโคลิกเป็นกรดดีออกซีไบเลี่ยนิก โดย <u>Arthobacter simplex</u> .....	12



รูปที่	หน้า
13. เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อรา <i>Absidia</i> sp. BA16 ในช่วงเวลาต่าง ๆ (6-120 ชม) กับกรดน้ำดีมาตรฐาน กรดอูโซดีออกซีโคลิก กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง . . . . .	35
14. เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิต โดยเชื้อรา <i>Absidia</i> sp. BA16 ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส กับกรดน้ำดีมาตรฐานคีโนออกซีโคลิก โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง . . . . .	38
15. สรุปลักษณะการทำอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกให้บริสุทธิ์ . . . . .	49
16. แมสสเปกตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา <i>Absidia</i> sp. BA16 . . . . .	56
17. แมสสเปกตรัมของกรด 3 $\alpha$ , 15 $\beta$ -DHC . . . . .	56
18. การดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ . . . . .	58
19. อินฟราเรดสเปกตรัมของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกที่ผลิตโดยเชื้อรา <i>Absidia</i> sp. BA16 . . . . .	60
20. อินฟราเรดสเปกตรัมของกรด 3 $\alpha$ , 15 $\beta$ -DHC . . . . .	60
21. คาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของอนุพันธ์ กรดลิโทโคลิกที่ผลิต โดยเชื้อรา <i>Absidia</i> sp. BA16 . . . . .	63
22. คาร์บอน -13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรด 3 $\alpha$ , 15 $\beta$ -DHC . . . . .	63
23. โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก ที่ผลิตโดยเชื้อรา <i>Absidia</i> sp. BA16 . . . . .	65
24. โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของกรด 3 $\alpha$ , 15 $\beta$ -DHC ..	65
25. ดีคัปปลิงโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของอนุพันธ์ กรดลิโทโคลิกโดยเชื้อรา <i>Absidia</i> sp. BA16 . . . . .	66
26. ดีคัปปลิงโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ กรด 3 $\alpha$ , 15 $\beta$ -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 สารประกอบของน้ำดีของ ประเทศสหรัฐอเมริกา .....	6
3. ความเข้มข้นของกรดลิโทโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก ซึ่งได้จากการเปลี่ยนรูปของกรดลิโทโคลิกโดย <u>Absidia</u> <u>sp. BA16</u> ที่เวลาต่าง ๆ โดยการทำให้เกิดสีตามวิธี 2.5 เทียบกับความเข้มข้นของกรดน้ำดีมาตรฐาน .....	36
4. เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดลิโทโคลิกและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียสและแยกผลิต ภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบผิวบางเทียบกับกรด ดีโนดีออกซีโคลิก .....	39
5. ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์ เป็น 210 องศาเซลเซียส .....	42
6. ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์ เป็น 220 องศาเซลเซียส .....	42
7. ค่าเอชอีทีพีและค่าความสามารถในการแยกเมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์ เป็น 230 องศาเซลเซียส .....	43
8. ระยะทางการเคลื่อนที่ของกรดลิโทโคลิก อนุพันธ์กรดลิโทโคลิก และความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กันบนแผ่น โครมาโตแกรมเมื่อทำการแยกตามวิธีการทดลอง 2.10.1 .....	46
9. ความบริสุทธิ์ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ..	49
10. เวลาที่กรดน้ำดีมาตรฐานและอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกอยู่ในคอลัมน์ และค่ารีเทนชันแฟคเตอร์ ในการตรวจวัดโดยวิธีไฮเพอร์ฟลูออเรสเซนซ์ ลิควิดโครมาโตกราฟี .....	52

ตารางที่	หน้า
11. คุณสมบัติที่สำคัญบางประการของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิกและกรด 3 $\alpha$ , 15 $\beta$ -DHC .....	53
12. ธาตุองค์ประกอบของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก .....	54
13. ตำแหน่งของพีคที่สำคัญของกรด 3 $\alpha$ , 15 $\beta$ -DHC และอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก .....	59
14. เคมีคัลลชีฟต์ (Chemical shift) ของอนุพันธ์กรดลิโทโคลิก โดยวิธีคาร์บอน $-^{13}$ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ .....	62



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

กราฟที่	หน้า
1. ความสัมพันธ์ระหว่างเอชอีทีพีและความดันของแก๊สไนโตรเจนที่ อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส .....	44



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## คำย่อ

UDCA = กรดอุโซดีออกซีโคลิก (ursodeoxycholic acid)

CDCA = กรดคีโนดีออกซีโคลิก (chenodeoxycholic acid)

LCA = กรดลิโทโคลิก (lithocholic acid)

TMeP = ไตรเมทิลเพนเทน (trimethylpentane)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย