การสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดาและปฏิกิริยากับไลเปส

นางสาวอุมากรณ์ อาภรณ์พัฒนพงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-403-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17199414

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	การสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดาและปฏิกิริยากับไลเปส
โดย	นางสาว อุมากรณ์ อาภรณ์พัฒนพงศ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวิภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

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

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

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

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อุมากรณ์ อาภรณ์พัฒนพงศ์ การสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดาและปฏิกิริยากับไลเปส (EXTRACTION OF AZADIRACHTIN FROM NEEM SEEDS AND REACTION WITH LIPASES) อ.ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อมร เพชรสม, 123 หน้า.ISBN 974-635-403-5

นำเมล็ดสะเดาแห้งและบดละเอียดสกัดสารด้วยวิธีการ 2วิธี วิธีแรกเป็นการสกัดด้วยSoxhlet โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย แล้วนำกากที่เหลือหลังการสกัดด้วยเฮกเซนสกัดอีกครั้งด้วยเมทธานอล แล้วเอาสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดเมทธานอลด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ในกรวยแยกก่อนที่จะล้างด้วยเอทธิลอะซิเตดและเฮกเซน สารสกัดเอทธิลอะซิเตดถูกแยกโดยซิลิกา เจล คอลัมน์ซึ่งถูกบรรจุในโทลูอีน ตัวชะจะเปลี่ยนไปตั้งแต่ 2% ถึง 9% เมทธานอลในโทลูอีนตามลำดับ เก็บลำดับส่วนของคอลัมน์ในเครื่อง HPLC ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด วิธีที่ 2 ถูกสกัดด้วยเฮกเซนและเอทธานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายร่วม แล้วเอาสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดของตัวทำละลายทั้งสองเช่นเดียวกับวิธีแรก สารสกัดที่ได้ถูกแยกโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ซึ่งถูกบรรจุในเมทธานอลในคลอโรฟอร์ม 50% เก็บลำดับส่วนของคอลัมน์ในเครื่อง HPLC ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด การหาสูตรโครงสร้างของสารแต่ละชนิดอาศัยคุณสมบัติทางภายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และหลักฐานทาง NMR และ MS ทั้งสองวิธีได้สารอะซาไดแรคทิน เอ แต่วิธีที่ 2 จะทำได้ง่ายและรวดร็วกว่า อะซาไดแรคทินวิธีที่ 2 มีความบริสุทธิ์มากกว่าวิธีแรกเล็กน้อย

การศึกษาปฏิกิริยาของอะซาไดแรคทินตัวหนึ่งด้วย ไรโซพัส ไลเปส หรือ แคนดิดา ไลเปส ทดลองโดยการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสที่เวลาต่าง ๆ ผลการทดลองไม่สามารถบอกได้ว่าปฏิกิริยาเกิดได้หรือไม่ เนื่องจากสารละลายที่มีการควบคุมโดยไม่ใช้เอนไซม์ (control) ก็เกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับที่มีเอนไซม์

ภาควิชา .....
สาขาวิชา .....เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....
ปีการศึกษา .....2539.....

ลายมือชื่อนิสิต อุมากรณ์ อาภรณ์พัฒนพงศ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C 626972 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: AZADIRACHTIN/AZADIRACHTA INDICA/LIPASES

UMAKORN ARPORNPATTANAPONG : EXTRACTION OF AZADIRACHTIN FROM NEEM SEEDS AND REACTION WITH LIPASES. THESIS ADVISOR : ASSIS.PROF.AMORN PETSOM, 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 of not since solution with no enzyme (control) did change like solution with enzyme.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้ความเป็นกันเองแก่ศิษย์ และกรุณาให้คำแนะนำด้านวิชาการ ตลอดจนปัญหาต่าง ๆจนสำเร็จไปได้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร เลขานุการหลักสูตรสาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพและประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษาตลอดภาคการศึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เริงสำราญ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบและให้คำปรึกษาทางด้าน NMR ตั้งแต่เริ่มศึกษาวิชานี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ที่กรุณาแนะนำแนวทางวิจัยให้สู่จุดมุ่งหมายได้เร็วขึ้น

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

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ นิสิตอดีตและปัจจุบันในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกทางด้านเครื่องมือ เครื่องใช้ ตลอดจนกำลังใจ และความเป็นห่วงเป็นใย

ขอขอบคุณ คุณนารีรัตน์ นิติการ คุณธนารัตน์ แต่งเจริญสุข คุณปธาณิน จบกลศึก และคุณกนิษฐา อุตชี เพื่อนร่วมงาน ที่กรมทรัพย์สินทางปัญญา ที่ให้กำลังใจ และช่วยพิมพ์จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง บิดา มารดา น้องหน่องและหลานจูนที่ให้ทั้งกำลังใจที่อบอุ่นอย่างยิ่ง และกำลังกายในช่วงทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาแก่ผู้เขียน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ฌ
สารบัญแผนภาพ.....ญ
สารบัญภาพ.....ฏ-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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงสารอินทรีย์ที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของสะเดา	4-5
2	แสดงความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินกับพื้นที่ใต้พีคที่ retention time ของอะซาไดแรคทิน	27
3	แสดงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ในสภาวะที่ต่างกัน	29
4	แสดงผลการแยกสารสกัดเมล็ดสะเดาจากน้ำหนักเมล็ดสะเดา 4.0 กิโลกรัม	47
5	แสดงผลการแยกสารสกัดเมทธานอล-โทโลอีนโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทรกราฟี	51
6	แสดงผลแยกสารลำดับส่วนที่ 160 - 334 โดยวิธี HPLC	52
7	แสดงผลการแยกลำดับส่วนที่ 39-58 โดยวิธี HPLC	54
8	แสดงการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์โดย HPLC	54
9	แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างอะซาไดแรคทินโดย NMR	56-57
10	แสดงผลการสกัดเมล็ดสะเดาวิธีที่ 2	60
11	แสดงการเก็บลำดับส่วนของสารโดยใช้เซฟาเดกซ์เป็นตัวดูดจากน้ำหนักสารเริ่มต้น 5.0 กรัม	61
12	แสดงการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีเก็บลำดับส่วนจากเครื่อง HPLC ซึ่งมีสารละลายอะซิโตไนตริล 30% เป็นตัวพา	63
13	แสดงการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์โดย HPLC	64
14	แสดงการเปลี่ยนแปลงจากโครมาโทแกรม HPLC เมื่อบ่มไลเปสในสารละลายอะซาไดแรคทิน	69

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงสารประกอบบางชนิดในสะเดา	6
2	แสดงการสังเคราะห์ cyclohexadecanolide	10
3	แสดงการสังเคราะห์แลคโทน	11
4	แสดงโครงสร้างอะซาไดแรคทิน	12
5	แสดงโครงสร้างอะซาไดแรคทินที่ได้รับการค้นพบ	15
6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินกับพื้นที่ใต้พีค	27
7	ผลการทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีแต่ละชั้นของการสกัด	48
8	ผลการทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีของการแยกสารสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต-เฮกเซน	50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่		หน้า
1	การสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 1	58
2	การสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 2	66

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด	84
2	แสดงโครมาโทแกรมของสารในลำดับที่ 79-84 และ 48-52 และสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินที่ได้จากการเก็บลำดับส่วนโดยวิธี HPLC	85
3-4	แสดงสเปคตรัมโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=10.1 นาที	86-87
5-7	แสดงสเปคตรัมบางส่วนที่ขยายของโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=10.1 นาที	88-90
8	แสดงแมสสเปคตรัมของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=10.1 นาที	91
9	แสดงแมสสเปคตรัมที่ขยายของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=10.1 นาที	92
10-11	แสดงสเปคตรัมโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำHPLC ที่ retention time =5.1 นาที	93-94
12-14	แสดงสเปคตรัมบางส่วนที่ขยายของโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำHPLC ที่ retention time =5.1 นาที	95-97
15	แสดงสเปคตรัมคาร์บอน - 13 NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =5.1 นาที	98
16-19	แสดงสเปคตรัม DEPT 90 และ DEPT 135-C-13 NMRของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time=5.1 นาที	99-102
20	แสดงโครมาโทแกรมของสารในลำดับส่วนที่ 54-60และสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินที่ได้จากเก็บลำดับส่วนโดย HPLC	103
21	แสดงโครมาโทแกรมของสารในลำดับส่วนที่ 85-89 และสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินที่ได้จากการเก็บลำดับส่วนโดย HPLC	104

22-23 แสดงสเปคตรัมโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =10.3 นาที.....105-106

24-26 แสดงสเปคตรัมบางส่วนที่ขยายของโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดา ที่ทำ HPLC ที่ retention time =10.3 นาที.....107-109

27 แสดงสเปคตรัมโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำHPLC ที่ retention time =13.9 นาที.....110

28 แสดงสเปคตรัมบางส่วนโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดาที่ทำ HPLC ที่ retention time =13.9 นาที.....111

29-30 แสดงสเปคตรัมบางส่วนที่ขยายของโปรตอน NMR ของสารสกัดสะเดา ที่ทำ HPLC ที่ retention time =13.9 นาที.....112-113

31 แสดงสารละลายอะซาไดแรคทิน blank เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง.....114

32 แสดงสารละลายอะซาไดแรคทิน blank เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง.....115

33 แสดงสารละลายอะซาไดแรคทิน blank เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง.....116

34 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส ไรโซพัส เมื่อเวลา 1 ชั่วโมง.....117

35 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส ไรโซพัส เมื่อเวลา 4 ชั่วโมง.....118

36 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายที่บ่มด้วยไลเปส ไรโซพัส 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

ซ	เซลเซียส
กก.	กิโลกรัม
ชม.	ชั่วโมง
pH	ความเป็น กรด - เบส
น.น.	น้ำหนัก
λmax	ความยาวคลื่นสูงสุด (UV - VIS)
νmax	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