บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

5.1 การสังเคราะห์สารตั้งต้น

สารสกัดสตีวิโอไซด์ (1) นำมาทำปฏิกิริยากับ 20% สารละลายกรดซัลฟุริก ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-70 ^{o}C แล้วนำสารผลิตภัณฑ์มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลชนิดละเอียดและตัวชะเป็นสารละลายผสมไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ได้สารไอโซสตีวิออล (3) (96%) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาโครงสร้างที่แน่นอนด้วยโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมทรี พบว่าสอดคล้องกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

5.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารไอโซสตีวิออลโดยวิธีการทางเคมี

5.2.1 การสังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล

สารไอโซสตีวิออล (3) นำมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยการทำปฏิกิริยารีดักชันด้วยโซเดียมโบโรไฮไดด์ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟูแรนได้สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (4, 98%) ที่ถูกรีดิวซ์ที่ตำแหน่ง 16 จากหมู่ฟังก์ชันคีโตนเป็นแอลกอฮอล์ สารที่สังเคราะห์ได้มีสภาพความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้นและมีการพิสูจน์โครงสร้างพบว่าสอดคล้องกับสารที่เคยมีการรายงานแล้ว

5.2.2 การสังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์

สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (4) ที่ได้จากปฏิกิริยารีดักชันนำมาทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันด้วยเมทิลไอโอไดด์และสารโพแทสเซียมคาร์บอเนตในตัวทำละลายอะซีโตน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลขนาด 0.063-0.200 มิลลิเมตร สารที่สังเคราะห์ได้มีสภาพความมีขั้วต่ำกว่าสารตั้งต้นจากการพิสูจน์โครงสร้างสารโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบว่ามีการเมทิลเลตเข้าที่ตำแหน่ง 19 ได้สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (18, 82%) และสอดคล้องกับสารที่เคยมีการรายงานมาแล้ว

5.2.3 การสังเคราะห์สารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19

นำสาร 18 มาทำปฏิกิริยารีดักชันด้วยลิเทียมอะลูมิเนียมไฮไดรด์ในตัวทำละลายเตตระไฮโดรฟิวแรน แล้วนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ตัวชะเป็นสารละลาย

ผสมของเฮกเซนและเอทิลอะซีเตต สารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีสภาพความมีขั้วมากกว่าสารตั้งต้น จากการพิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีพบว่าที่ตำแหน่ง 19 ถูกรีดิวส์จากเอสเตอร์เป็นแอลกอฮอล์ได้สารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (**19**, 81%)

5.3 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการปรับเปลี่ยนทางชีวภาพคือ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ที่ได้จากแหล่งเก็บเชื้อ Northern Regional Research Laboratory (NRRL) มลรัฐอิลลินอยด์ ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารตั้งต้นสองชนิดที่ถูกนำมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพคือไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (**18**) และสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (**19**)

5.3.1 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์

นำสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (**18**) มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดย *Bacillus megaterium* NRRL B-938 พบว่าเกิดเมแทบอไลท์ **20** (2.8%) ที่เกิดไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ที่ตำแหน่งที่ 7 จากการพิสูจน์โครงสร้างทางเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (**18**) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 มีการเลื่อนของสัญญานโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.29 ppm และแสดงค่าสัญญานเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียง (coupling) เป็นลักษณะ doublet of doublet มีค่าการคู่ควบ (coupling constant) เท่ากับ 11.9 และ 4.0 Hz ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงการชี้ขึ้นของโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 จากข้อมูลความสอดคล้องกัน (correlation) ของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-5 C-6 C-9 C-14 และ C-15 จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมทรีสามารถยืนยันโครงสร้างของสารเมแทบอไลท์ **20** ได้ คือ 7α-dihydroisosteviol methyl ester

5.3.2 การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19

สารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (**19**) นำมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดย *Bacillus megaterium* NRRL B-938 พบว่าเกิดเมแทบอไลท์ **21** (1.1%) เมแทบอไลท์ **22**

(2.8%) และเมแทบอไลท์ 23 (1.3%) ตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมาก สารหลักที่มีปริมาณมากคือ เมแทบอไลท์ 22

5.3.2.1 **การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารเมแทบอไลท์** 21

สารเมแทบอไลท์ 21 ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร 19 นั้นเป็นสารเมแทบอไลท์ที่มีความมีขั้วต่ำที่สุด จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบว่าสารเมแทบอไลท์ 21 เกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 6 มีการเลื่อนของสัญญานโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.51 ppm และแสดงค่าสัญญานเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียงเป็นลักษณะ broad singlet มีค่า $W_{1/2}$ (Band width at half hight) เท่ากับ 8.5 Hz แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งการชี้ขึ้นของโปรตอนตรงตำแหน่งที่ 6 (แบบเบต้า) จากข้อมูลความสอดคล้องกันของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 6 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-5 และ C-7 จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมทรี สามารถยืนยันโครงสร้างของสารเมแทบอไลท์ 21 ได้

5.3.2.2 **การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารเมแทบอไลท์** 22

สารเมแทบอไลท์ 22 ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร 19 นั้นเป็นสารเมแทบอไลท์ที่มีปริมาณมากที่สุด ซึ่งมากกว่าสารเมแทบอไลท์ที่ 21 และ 23 จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบว่าสารเมแทบอไลท์ 22 เกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 มีการเลื่อนของสัญญานโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.12 ppm และแสดงค่าสัญญานเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียง (coupling) เป็นลักษณะ broad singlet โดยมีลักษณะของสัญญาณต่างจาก สารเมแทโบไลท์ 20 ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 7 เช่นกัน ดังนั้นแสดงให้เห็นถึงการชี้ลงของโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 จากข้อมูลความสอดคล้องกันของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-5 C-8 และ C-9 จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมทรี สามารถยืนยันโครงสร้างของสารเมแทบอไลท์ 22 ได้

5.3.2.3 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารเมแทบอไลท์ 23

สารเมแทบอไลท์ 23 เป็นสารเมแทบอไลท์ที่มีความมีขั้วมากที่สุด จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี พบว่าสารเมแทบอไลท์ 23 เกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นคือสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 1 มีการเลื่อนของสัญญานโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.25 ppm และแสดงค่าสัญญานเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียงเป็นลักษณะ broad doublet มีค่าการคู่ควบเท่ากับ 5.5 Hz จากข้อมูลความสอดคล้องกันของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 1 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-2 C-3 C-9 และ C-20 จากค่าของแรงคู่ควบแสดงให้ถึงการชี้ขึ้นของโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 1 (แบบอัลฟา) และเกิดไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 7 พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 มีการเลื่อนของสัญญานโปรตอนมาที่ค่าระดับพลังงานต่ำกว่า คือ 3.31 ppm และแสดงค่าสัญญานเรโซแนนซ์กับโปรตอนข้างเคียงเป็นลักษณะ broad singlet มีค่า $W_{1/2}$ (Band width at half hight) เท่ากับ 6.8 Hz แสดงให้เห็นถึงตำแหน่งการชี้ลงของโปรตอนตรงตำแหน่งที่ 7 (แบบแอลฟา) จากข้อมูลความสอดคล้องกันของตำแหน่งโปรตอนและคาร์บอน (HMBC) พบว่าโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 7 มีความสอดคล้องกับคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ C-5 C-6 C-9 C-14 และ C-15 จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปี และแมสสเปกโตรเมทรี สามารถยืนยันโครงสร้างของสารเมแทบอไลท์ 23 ได้

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถสังเคราะห์สารตั้งต้นในการนำมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารโดยกระบวนการทางชีวภาพได้เป็นสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (18) และสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19)
2. สามารถทำการปรับเปลี่ยนสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (18) โดยกระบวนการทางชีวภาพโดยเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ได้สารเมแทบอไลท์ 20 ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งที่ 7 และได้มีการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีเรียบร้อยแล้ว
3. สามารถทำการปรับเปลี่ยนสารแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19) โดยกระบวนการทางชีวภาพโดยเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ได้สารเมแทบอไลท์ 21 - 23 ที่เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งต่างๆ โดยสารเมแทบอไลท์ 21 มีการไฮดรอกซิเลตที่ตำแหน่งที่ 6 สารเมแทบอไลท์ 22

มีการไฮดรอกซิเลตที่ตำแหน่งที่ 7 และสารเมแทบอไลท์ 23 มีการไฮดรอกซิเลต 2 ตำแหน่งคือตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 7 ซึ่งสารเมแทบอไลท์ที่ได้ทั้งสามชนิดได้มีการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีเรียบร้อยแล้ว สารเมแทบอไลท์ทั้งสามชนิดเป็นสารที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน

4. ได้ทราบข้อมูลว่าเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 สามารถปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารในตำแหน่งที่เกิดได้ยากหรือไม่สามารถเกิดได้โดยวิธีการทางเคมีคือการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่ตำแหน่งของเมทิลลีนคาร์บอน (CH_2) ของโครงสร้างสารประกอบ
5. ได้สารเมแทบอไลท์แอนาลอกใหม่เกิดขึ้นเพื่อนำไปสู่การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นเดิมหรือทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ ต่อไป

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY