

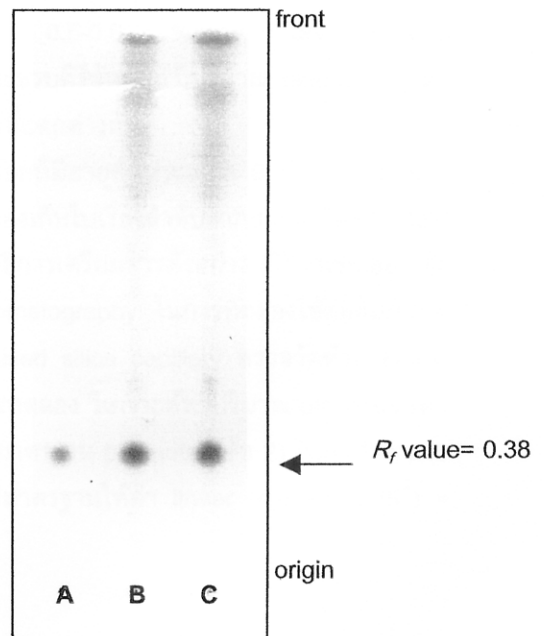
ผลการทดลอง

(Results)

1. ต้นเป็ล้าน้อยที่ใช้ในการทดลอง

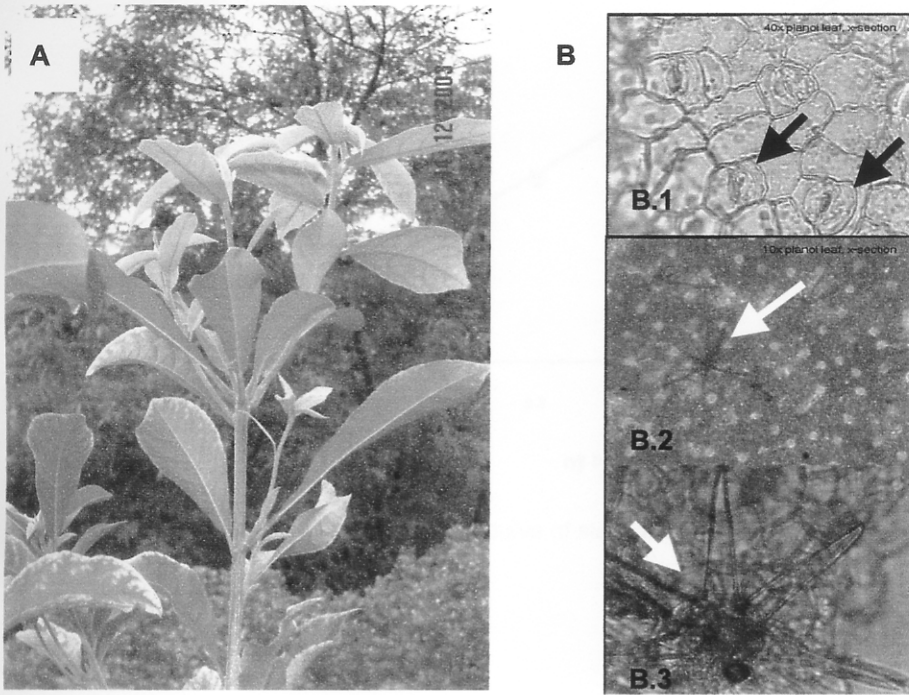
ต้นกล้าเป็ล้าน้อยที่ใช้ในการทดลอง ได้จากศูนย์พัฒนาเขาหินซ้อน จังหวัดฉะเชิงเทรา และนำมาปลูกในแปลงทดลอง สวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (สิงหาคม 2545) ลักษณะภายนอกของต้นเป็ล้าน้อยแสดงดังรูปที่ 5A ลักษณะของใบเป็นรูปไข่ (obovate) และมีขนบนผิวใบ ส่วนผลการตรวจลักษณะของใบเป็ล้าน้อยภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีลักษณะเด่นคือ พบ stellate-dendritic hairs จำนวนมาก (รูปที่ 5B) ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Esser and Chayamarit (2001) ที่ได้รายงานลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ของต้นเป็ล้าน้อย และได้เปลี่ยนชื่อของ *Croton sublyratus* Kurz. เป็น *Croton stellatopilosus* Ohba.

ผลการตรวจทางเคมีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน plaunotol (Kelnac®) ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography โดยเตรียมสารสกัดจากใบเป็ล้าน้อยด้วย 95% ethanol ด้วยวิธี reflux ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรอง และระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปละลายด้วย ethanol ปริมาณเล็กน้อย นำไป spot บนแผ่น Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) เปรียบเทียบกับยา Kelnac® นำไป run ใน mobile phase: chloroform: *n*-propanol อัตราส่วน 24:1 ตรวจแผ่น TLC ที่ได้ภายใต้ UV₂₅₄, iodine vapor และสเปรย์ด้วยสารละลาย anisaldehyde/H₂SO₄ ลักษณะ spot ของสาร plaunotol มีคุณสมบัติไม่เรืองแสงที่ UV₂₅₄ แต่ให้ผลบวกต่อ iodine vapor ได้ spot สีน้ำตาล และให้ผลบวกต่อ สารละลาย anisaldehyde/H₂SO₄ ได้ spot สีม่วง ค่า R_f-value ของสาร plaunotol มีค่าเท่ากับ 0.38 (Vongchareonsathit and De-Eknamkul, 1998) ผลจากการเปรียบเทียบด้วยวิธี TLC สรุปได้ว่าต้นเป็ล้าน้อยจากศูนย์พัฒนาเขาหินซ้อนที่นำมาปลูกที่คณะเภสัชศาสตร์ มีสาร plaunotol สะสมอยู่ ซึ่งต้นเป็ล้าน้อยนี้จะถูกนำมาใช้ศึกษาตลอดการทดลอง (รูปที่ 4)



รูปที่ 4

TLC-pattern ของสารสกัดชั้น *n*-hexane จากใบเป็ล้าน้อย (B, C) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน plaunotol (A) ตรวจด้วย anisaldehyde/H₂SO₄ บนแผ่น Silica gel 60 F₂₅₄

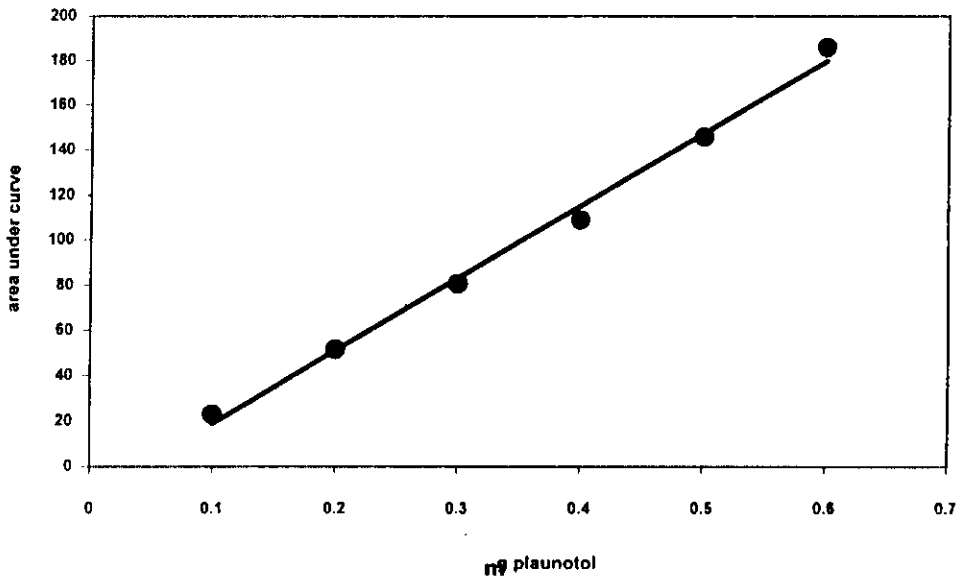


รูปที่ 5 ภาพแสดงต้นเปล้าน้อย A, ลักษณะภายนอก; B, ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (B.1, stomata; B.2-B.3, stellate-dendritic trichome)

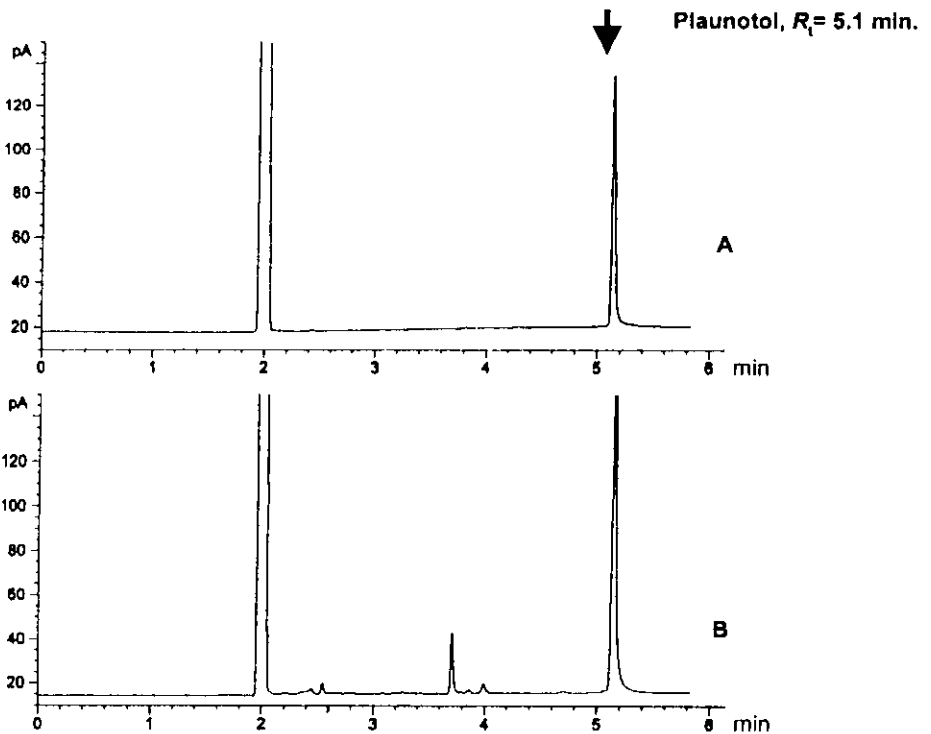
2. Plaunotol ในต้นเปล้าน้อย

Ogiso และคณะ ได้รายงานสาร plaunotol แยกได้จากส่วนลำต้นและใบจากต้นเปล้าน้อย (Ogiso et al. 1978) โดยได้รายงานฤทธิ์ในการต้านโรครณะเพาะไว้ด้วย ใบบรรดาพืชสกุล *Croton* sp. มีรายงานว่า มีเพียง *C. stellapilosus* Ohba. (หรือ *Croton sublyratus* Kurz.) เพียงสกุลเดียวเท่านั้นที่มีการสะสมสาร plaunotol โดยมีรายงานว่ามีการสะสมในใบเปล้าน้อยประมาณ 0.5-0.6 % (w/w dry weight) (Vongchareonsathit, 1998) โดยต้นเปล้าน้อยที่ปลูกที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จะมีปริมาณ plaunotol สูงสุด อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการสะสมในใบที่อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน

เมื่อศึกษารูปแบบการสะสมสาร plaunotol ในใบเปล้าน้อยที่มีอายุต้นประมาณ 6 เดือน จำนวน 3 ต้น จากแปลงทดลองในสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ โดยทดลองเก็บใบเรียงลำดับจากยอดลงไปหาโคนกิ่ง จำนวน 10 ใบ บันทึกขนาดและรูปร่างของใบ จากนั้นนำไปผ่านวิธีการเตรียมสารตัวอย่าง (วิธีการทดลอง ข้อ 3) และนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธี Gas chromatography ในการทดลองใช้คอลัมน์ชนิด HP1 Methylsiloxane size 30 m, 0.32 mm x 0.25 μ m Fused silica capillary ตรวจวัดด้วย Flame Ionization Detector (FID) ใช้รูปแบบการระดมกำหนดในวิธีการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณ plaunotol โดยเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของสาร Plaunotol ที่เตรียมจากสารมาตรฐาน plaunotol (ข้อ 2) ในตัวทำละลาย *n*-hexane ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1.0 μ g/ μ l สร้างเป็นกราฟมาตรฐานให้ค่า linear regression (R^2) = 0.9941 (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 Calibration curve of standard plaunotol



รูปที่ 7 GC-Chromatogram A. standard plaunotol, B. sample จากใบเปล้าน้อยตำแหน่งที่ 4

วิเคราะห์ตัวอย่างด้วย Gas chromatography โดยเลือกต้นเปล้าน้อยจำนวน 3 ต้น (ที่มีอายุประมาณ 6 เดือน) และในแต่ละตัวอย่างวิเคราะห์จำนวน 3 ครั้ง ลักษณะ GC-Chromatogram ที่ได้แสดงในรูปที่ 7 และผลการวิเคราะห์หาปริมาณ plaunotol ในใบเปล้าน้อยสามารถแสดงผลได้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณ plaunotol ที่พบในใบเปล้าน้อยตำแหน่งต่างๆ

ตำแหน่งใบที่	ปริมาณ plaunotol, % (w/w) dry weight		
	ต้นที่ 1	ต้นที่ 2	ต้นที่ 3
1	0.93	0.81	0.85
2	1.48	1.13	0.69
3	1.69	1.08	0.93
4	1.69	1.22	0.67
5	1.34	1.47	0.57
6	1.15	0.98	0.31
7	1.37	1.01	nd.
8	1.13	1.22	nd.
9	1.11	1.26	nd.
10	0.82	0.88	nd

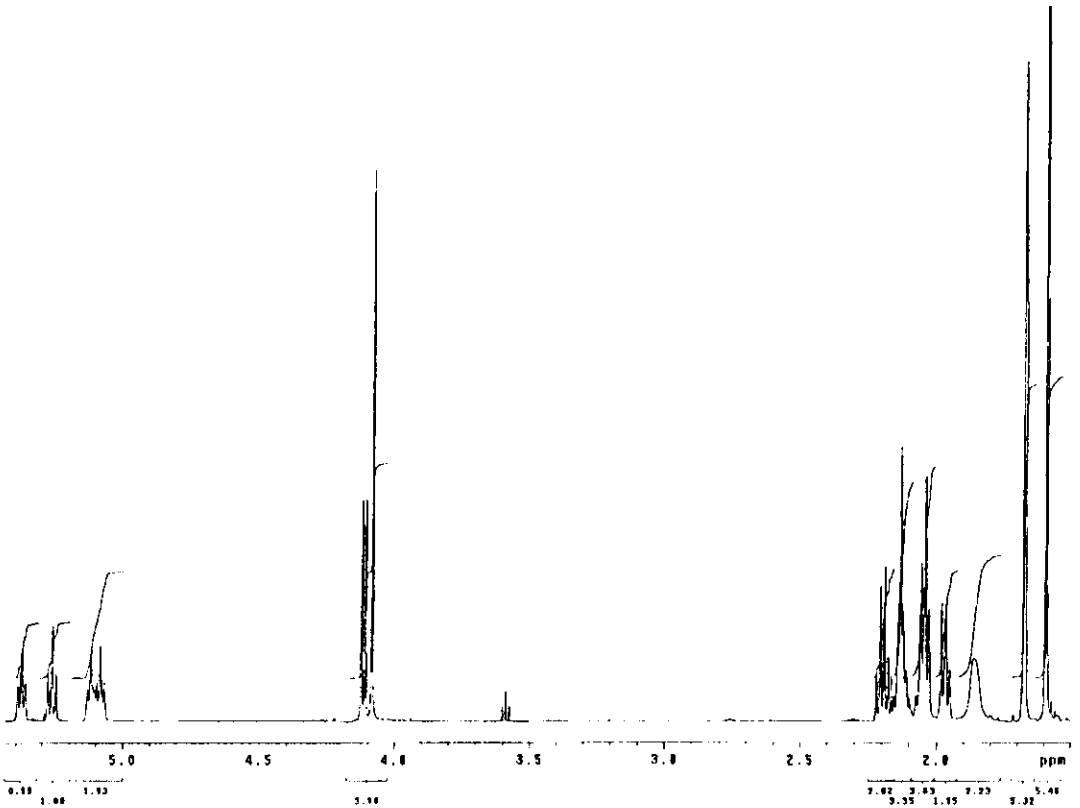
nd. = not determined

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแนวโน้มการสะสมสาร plaunotol จะขึ้นอยู่กับตำแหน่งของใบ กล่าวคือ plaunotol จะสะสมมาก ณ ตำแหน่งใบที่ 3-4 และมีแนวโน้มลดลงเมื่อตำแหน่งของใบมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับตำแหน่งการสร้าง plaunotol การพิจารณาว่าควรเลือกชิ้นส่วนของต้นเปล้าน้อยมาศึกษา feeding experiment ก็ต้องคำนึงถึงชิ้นส่วนที่มีการสร้างสาร และมีความสามารถในการเจริญเติบโต ผลวิเคราะห์สาร plaunotol ทำให้พิจารณาได้ว่าควรเลือกชิ้นส่วนใดในการป้อนสารติดฉลากไอโซโทปเสถียร โดยการทดลองนี้จะเลือกส่วนยอดของเปล้าน้อยที่มีใบเปล้าน้อยอยู่ประมาณ 3-4 ใบ ใช้เป็นชิ้นส่วนของการทำ feeding experiment เพื่อหารูปแบบการติดฉลากของสารที่ติดตามต่อไป

การแยกสาร plaunotol ที่สะสมในใบเปล้าน้อย ทำได้โดยการแยกสารผ่านเทคนิค column chromatography ตรวจเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน นำสารมาตรฐาน plaunotol ที่แยกได้นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค GC/MS, $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

จาก $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy (CDCl_3) แสดงสัญญาณต่อไปนี้ (รูปที่ 8)

- ที่ $\delta = 1.60$ ppm (6H, singlet) และที่ $\delta = 1.68$ (6H, singlet) แสดงลักษณะของ vinyl methyl groups จำนวน 4 หมู่
- ที่ $\delta = 2.06$ ppm (12H, multiplet) แสดงลักษณะของ allyl methylene groups จำนวน 6 หมู่
- ที่ $\delta = 4.09$ ppm (2H, singlet) และ 4.11 (2H, doublet) แสดงลักษณะของ hydroxymethyl groups จำนวน 2 หมู่
- ที่ $\delta = 5.1-5.4$ ppm (4H, multiplet) แสดงลักษณะของ olefinic protons จำนวน 4 protons
- ที่ $\delta = 7.3$ ppm (2H, singlet) แสดงลักษณะของ 2 hydroxy protons (รูปที่ 9)

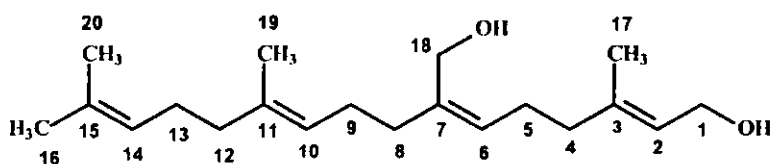


รูปที่ 8 $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy ของ plaunotol จาก Kelnac® (NMR 500 MHz model, Varian)

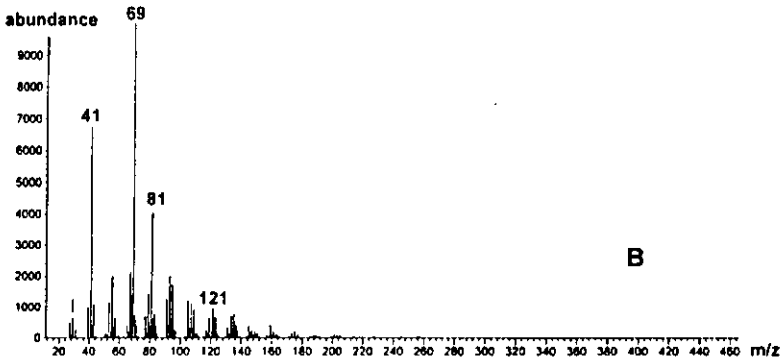
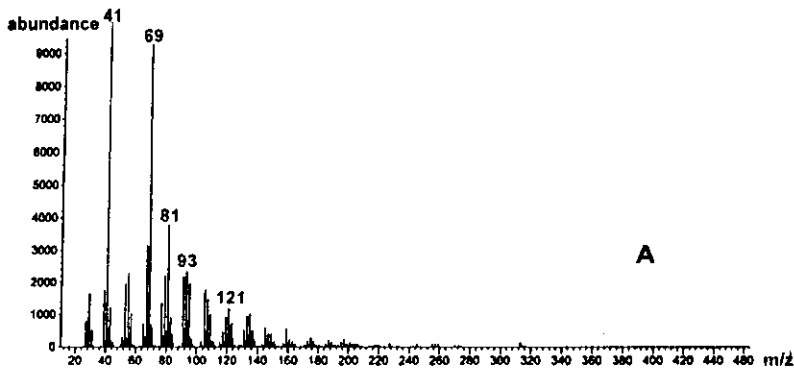
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสาร plaunotol (18-hydroxygeranylgeraniol) ที่แยกจาก Kelnac® เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานใน Ogiso et al. 1978.

ตารางที่ 3 ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR data ของสาร plaunotol (18-hydroxygeranylgeraniol) (HMBC, Heteronuclear multiple quantum multiple bond correlation spectroscopy)

Position	Chemical shift, CDCl_3 , ppm		Observed NMR connectivity	^1H -NMR, CCL_4 Ogiso et al., 1978 ppm
	^{13}C -	^1H -	HMBC	
1	58.9	4.11, d ($J_{\text{HH}} = 7.1 \text{ Hz}$)	2, 3	3.97
2	124.2	5.38, m	4	5.30
3	138.9			
4	39.2	2.06, m	2, 3, 5, 6 6, 7	2.3-1.9
5	25.8	2.20, m		
6	127.5	5.27, m	8, 9	5.14
7	138.8			
8	34.6	2.15, m	6, 7, 9 10	2.01
9	26.8			
10	123.9	5.11, m	9, 12	5.05
11	131.3			
12	39.6	2.06, m	11, 20 13, 15, 20	1.95
13	26.6	1.95, m		
14	124.0	5.11, m	12, 13	5.05
15	135.3			
16	25.6	1.68, s	14, 15	1.66
17	16.4	1.68, s	2, 3	1.67
18	59.8	4.09, s	6, 8	3.94
19	17.6	1.60, s	10, 11, 12	1.58
20	15.8	1.60, s	14, 15	1.58



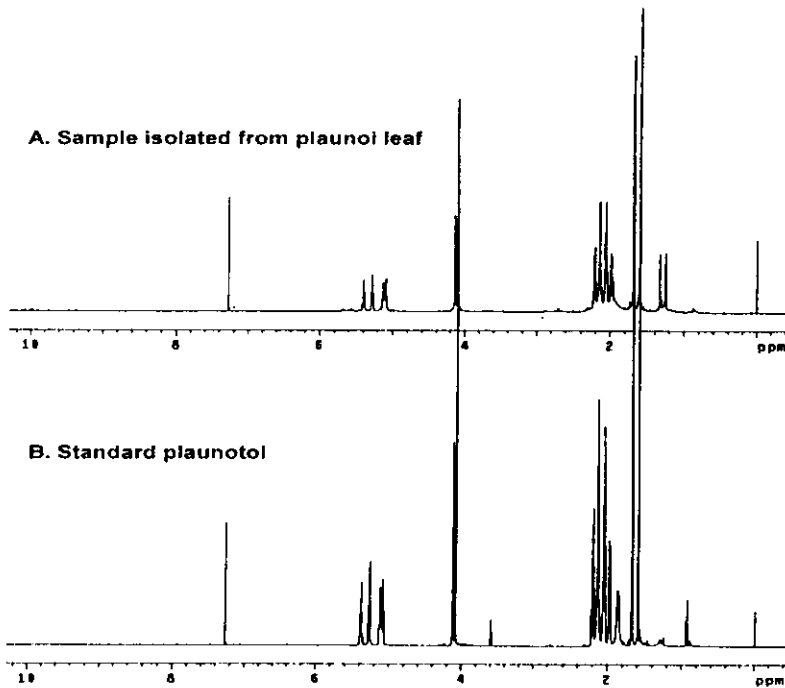
รูปที่ 9 โครงสร้างของ plaunotol (18-Hydroxygeranylgeraniol)



รูปที่ 10 Mass spectral data of plaunotol isolated from A; Kelnac® and B; plaunoi leaf

ผลวิเคราะห์ด้วย GC/MS รูปที่ 9A แสดงค่า mass fragmentation ที่ m/z 41 (base peak), 69, 81, 93, 121, 227 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ mass spectrum ของสาร plaunotol ที่มีรายงานใน Ogiso et al., 1978

แยกสาร plaunotol จากส่วนของใบเปล้าน้อย (วิธีการทดลอง ข้อ 4) ลักษณะของสารที่แยกได้เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง น้ำหนัก 32 mg (คิดเป็น 0.32% (w/w) yield) เมื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี GC/MS ให้ mass fragmentation เหมือนกับสารมาตรฐาน plaunotol (รูปที่ 9B) ผลการเปรียบเทียบข้อมูลจาก $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy ให้ผลเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน plaunotol (ข้อ 2)(รูปที่ 8) ดังนั้นวิธีการแยกสาร plaunotol นี้ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการแยกสาร plaunotol ที่ได้จากสารที่จะทำการป้อนสารติดตามต่อไป

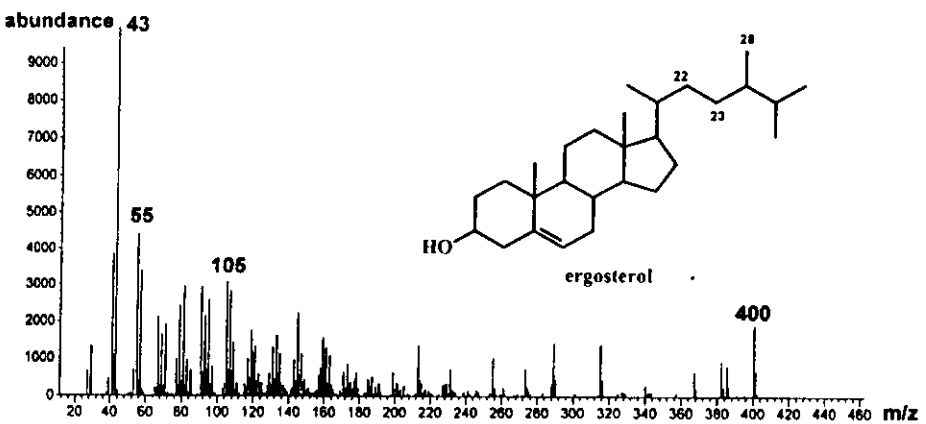
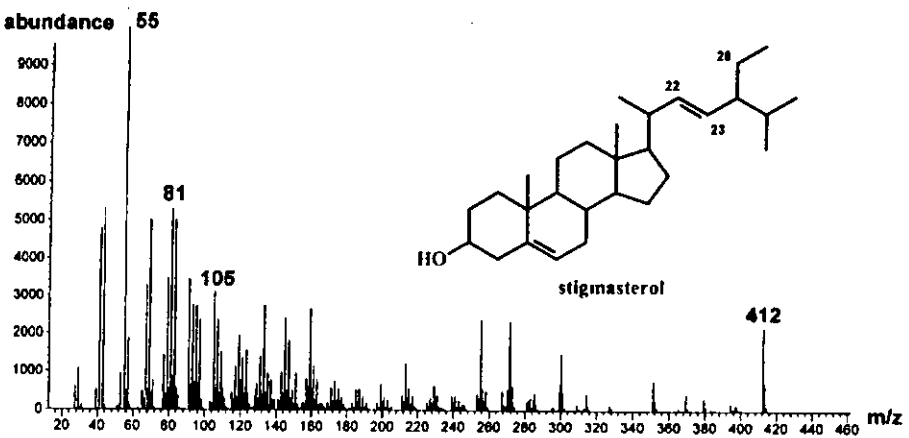
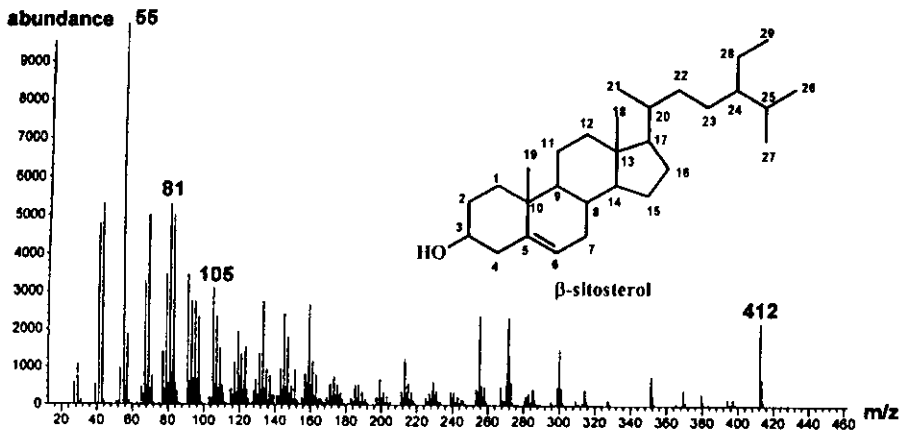


รูปที่ 11 ¹H-NMR spectroscopy ของสารที่แยกได้จากใบเปล้าน้อย (A) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Plaunotol (B)

3. Phytosterols ในต้นเปล้าน้อย

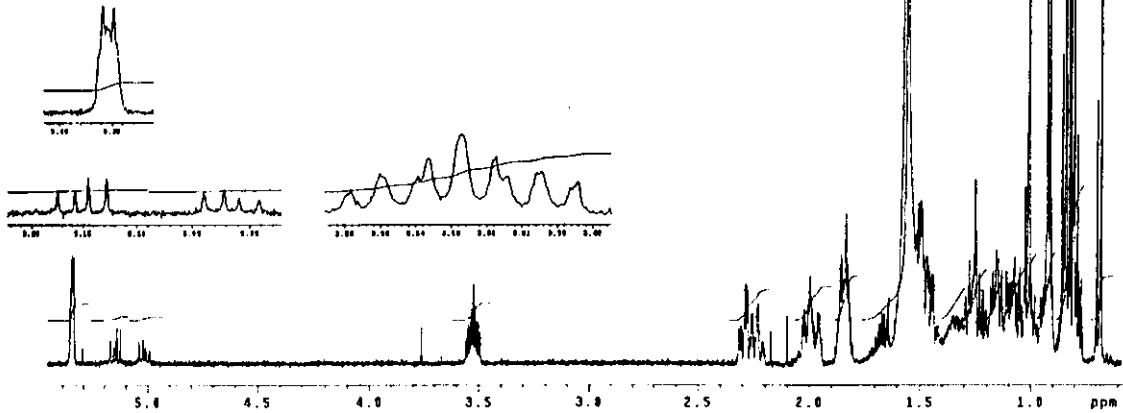
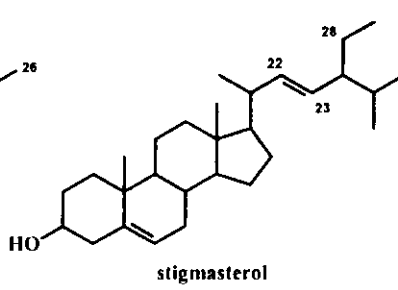
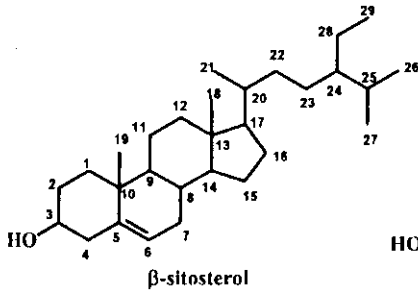
Phytosterols เป็นสารหุติยภูมิที่พบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง โดยเป็นส่วนประกอบในชั้นผนังเซลล์ และ cell membrane ในพืช การแยกสาร phytosterols จากต้นเปล้าน้อย โดยนำชั้นที่ผ่านคอลัมน์เพื่อแยกสาร plaunotol ใน fraction no. 7-13 (56.4 mg) นำมาตรวจด้วยเทคนิค TLC บนแผ่น silica gel 60 F₂₅₄ run ใน mobile phase: chloroform: ethyl acetate อัตราส่วน 9:1 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β -sitosterol ภายหลังจากการตรวจแผ่น TLC ด้วยสารละลาย anisaldehyde/H₂SO₄ สารกลุ่ม phytosterols ให้ผลบวกเป็น spot สีม่วง ค่า R_f-value 0.42

ดังนั้นจึงนำ fraction no 7-13 มาแยกต่อด้วยวิธี column chromatography ใช้คอลัมน์ขนาด 2.5 x 23 cm., Stationary phase คือ silica gel 60 (0.04-0.06 mm, Scharlau Chemie, Spain) Mobile phase คือ chloroform: ethyl acetate; 9:1, flow rate 2 ml/min ตรวจ fraction ที่ได้ด้วย TLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β -sitosterol รวม fraction ที่มี β -sitosterol (fraction no. 12-16) ระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ทำการตกผลึกอีกครั้งด้วยสารผสมระหว่าง chloroform และ methanol อัตราส่วน 7:3 ตั้งทิ้งไว้ ให้ตกผลึก ล้างผลึกด้วย methanol ผลึกที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนักของสาร 3 mg (คิดเป็น 0.03% (w/w) yield) นำผลึกที่ได้พิสูจน์เอกลักษณ์โดย GC/MS, ¹H-NMR



รูปที่ 12 Mass spectral data of phytosterols isolated from plaunoi leaf

จาก GC chromatogram พบว่าผลึกรูปเข็มสีขาวประกอบด้วยสารกลุ่ม steroid 3 ชนิด ได้แก่ β -sitosterol, stigmasterol และ ergosterol เมื่อคำนวณ %abundance พบว่าเป็นอัตราส่วน 64%, 23% และ 14% ตามลำดับ จาก Mass spectral data ค่า molecular mass เป็น 414, 412 และ 400 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุลของสาร ได้แก่ β -sitosterol, stigmasterol และ ergosterol ตามลำดับ (รูปที่ 12)



รูปที่ 13 $^1\text{H-NMR}$ data of phytosterols isolated from plaunoi leaf (NMR 500 MHz model, Varian)

พิจารณา $^1\text{H-NMR}$ (รูปที่ 13)

ที่ $\delta = 0.7-2.3$ ppm เป็นตำแหน่งของ methylene protons ซึ่งมีจำนวนมากในโครงสร้าง

ที่ $\delta = 3.48-3.55$ ppm สัญญาณมีลักษณะเป็น multiplet ซึ่งเป็นตำแหน่งของ proton ตำแหน่งที่ 3 ของโครงสร้าง ซึ่ง coupling กับ proton ข้างเคียง 6 proton

ที่ $\delta = 5.00-5.03$ ppm และที่ $\delta = 5.12-5.17$ ppm สัญญาณมีลักษณะเป็น doublet of doublet ซึ่งแสดงตำแหน่ง olefinic proton ตำแหน่งที่ 22-23 ของ stigmasterol ตามลำดับ

ที่ $\delta = 5.34-5.35$ ppm สัญญาณมีลักษณะเป็น broad doublet ซึ่งแสดงตำแหน่งของ olefinic proton ตำแหน่งที่ 6 ของโครงสร้างทั้งสอง จาก $^1\text{H-NMR}$ สรุปได้ว่าสาร steroid ที่แยกได้เป็นสารผสมระหว่าง β -sitosterol และ stigmasterol ตารางที่ 4 แสดง $^1\text{H-}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ data ของ β -sitosterol และ stigmasterol

Central Library
Prince of Songkla University

ตารางที่ 4 ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR data ของสาร sitosterol และ stigmasterol

Position	Chemical shift, sitosterol		Chemical shift, stigmasterol	
	^{13}C -	^1H -	^{13}C -	^1H -
1	37.22	1a 1.05, m 1b 1.82, m	37.22	1a 1.05, m 1b 1.82, m
2	31.63	1.94, m	31.63	1.94, m
3	71.80	3.52, m	71.80	3.52, m
4	42.19	2.23, m	42.26	2.23, m
5	140.72	-	140.72	-
6	121.71	5.36, d (5.4 Hz)	121.71	5.32, d (5.4 Hz)
7	31.87	1.50, m	31.87	1.50, m
8	31.87	1.82, m 0.90, m	31.87	1.82, m 0.90, m
9	50.10		50.10	
10	36.48	-	36.48	-
11	21.07	1.46, m	21.07	1.46, m
12	39.74	12a 1.11, m 12b 1.96, m	39.66	12a 1.12, m 12b 1.96, m
13	42.26	-	42.26	-
14	56.73	0.96, m	56.85	0.96, m
15	24.29	15a 1.00, m 15b 1.54, m	24.34	15a 1.00, m 15b 1.54, m
16	28.22	16a 1.21, m 16b 1.83, m	28.91	16a 1.21, m 16b 1.82, m
17	56.02	1.08, m	55.93	1.08, m
18	11.84	0.66, s	12.03	0.66, s
19	19.39	0.98, s	19.39	0.98, s
20	36.12	1.33, s	40.48	1.33, s
21	18.76	0.90 d (6.6 Hz)	21.07	0.90 d (6.6 Hz)
22	33.91	22a 0.98, m 22b 1.31, m	138.31	5.17 dd (14.9, 8.5 Hz)
23	26.02	1.12, m	129.25	5.04 dd (15.2, 8.8 Hz)
24	45.81	0.91, m	51.22	0.91, m
25	29.11	1.62, m	31.87	1.62, m
26	19.80	0.81, d (6.8 Hz)	21.02	0.81, d (6.8 Hz)
27	19.01	0.79, d (6.8 Hz)	18.96	0.79, d (6.8 Hz)
28	23.04	1.21, m	25.39	1.21, m
29	11.97	0.81, t (6.6 Hz)	12.23	0.81, t (6.6 Hz)

4. ศึกษาาระยะบ่มที่เหมาะสมในการทำ Feeding experiment

วิธีการทดลอง feeding experiment ได้ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Goese et al., 1999

สารละลายที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด คือ

สารละลายที่ 1 1 % (w/v) unlabeled glucose in distilled water

สารละลายที่ 2 0.05% (w/v) [U-¹³C]-glucose (99% ¹³C-enrichment, Cambridge Isotope)

และ

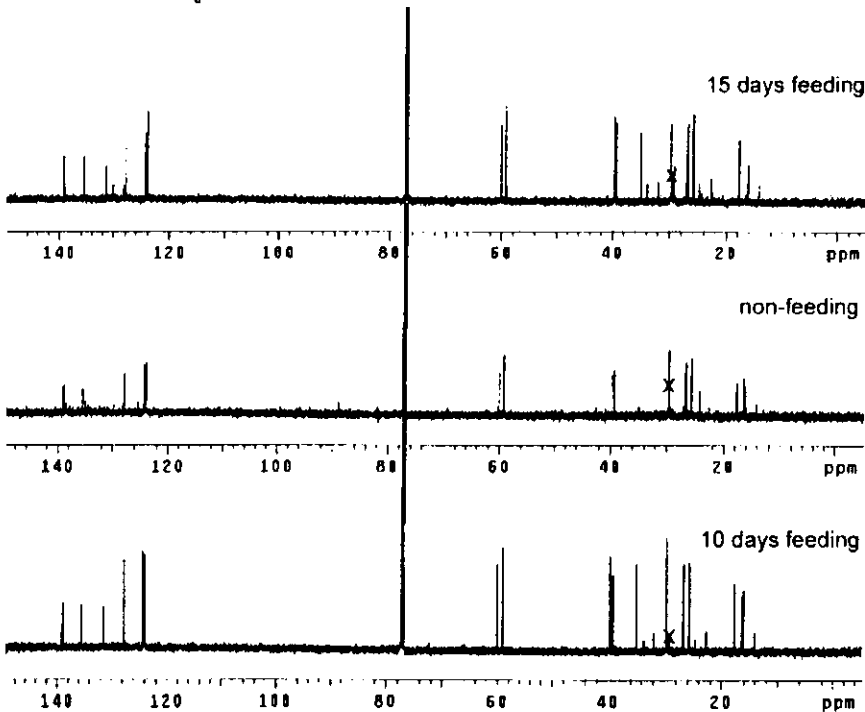
0.95% (w/v) unlabeled glucose in distilled water

สารละลายที่ 3 0.5% (w/v) [1-¹³C]-glucose (99% ¹³C-enrichment, Cambridge Isotope) และ

0.5% (w/v) unlabeled glucose in distilled water

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มประมาณ 1000 LUX ให้แสงนาน 16 ชั่วโมง และมีมืด 8 ชั่วโมง

เลือกชิ้นส่วนเป็นยอดเปล้าน้อยที่ประกอบด้วยใบเปล้าน้อย 3-4 ใบ ที่มีส่วนของก้านยาวประมาณ 10 cm จุ่มลงในสารละลายที่ 1 และสารละลายที่ 2 อย่างละ 10 ตัวอย่าง โดยบ่มในสภาวะทดลอง เป็นเวลานาน 10 วัน และ 15 วัน (โดยทำการเปลี่ยนเปล้ากิ่งทุกวัน) เก็บตัวอย่างมาเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ (ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1) และแยกสาร plaunotol (ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2) นำสาร plaunotol ไปวิเคราะห์ด้วย ¹³C-NMR spectroscopy ตรวจสอบความเข้มข้นของคาร์บอน (เมื่อบันทึกข้อมูล ¹³C-NMR parameter เหมือนกันทุกประการ) ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 ¹³C-NMR spectroscopy เปรียบเทียบความเข้มของสัญญาณของคาร์บอนระหว่าง non-feeding, 10 days feeding และ 15 days feeding (NMR 500 MHz model, Varian)

ตารางที่ 5 วิเคราะห์ความเข้มของสัญญาณของคาร์บอนใน ^{13}C -NMR spectrum ของสาร plaunotol ที่แยกได้จากยอดเปล้าน้อยที่ป้อนด้วย 0.05% (w/w) [^{13}C]-glucose เป็นเวลา 10 วัน และ 15 วัน เปรียบเทียบกับที่ป้อนด้วย 1% (w/w) unlabeled glucose (โดยวัดความเข้มของสัญญาณคาร์บอนเป็น mm (เมื่อบันทึกข้อมูล ^{13}C -NMR parameter เหมือนกันทุกประการ)

position	Chemical shift δ , ppm.	^{13}C -Signal intensities (mm)			Ratio Labeled : unlabeled glucose	
		Unlabeled glucose	10-days	15-days	10-days feeding	15-days feeding
			[U- ^{13}C]- glucose	[U- ^{13}C]- glucose		
1	58.9	17	29	26	2.4	2.2
2	124.2	13	28	19	2.1	1.5
3	138.9	7	10	12	1.4	1.7
4	39.2	13	22	22	1.7	1.7
5	25.8	11	25	21	2.3	1.9
6	127.5	10	24	23	2.4	2.3
7	138.8	7	13	13	1.9	1.9
8	34.6	12	24	20	2.0	1.7
9	26.8	12	24	20	2.0	1.7
10	123.9	14	27	24	1.9	1.7
11	131.3	7	12	12	2.0	1.3
12	39.6	14	28	21	2.0	1.5
13	26.6	12	27	24	2.2	2.0
14	124.0	10	25	20	2.5	2.0
15	135.3	6	12	8	1.7	1.7
16	25.6	16	24	24	1.5	1.5
17	16.4	10	16	17	1.6	1.7
18	59.8	12	24	21	2.0	1.7
19	17.6	9	19	17	2.1	1.9
20	15.8	8	17	17	2.1	2.1

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าความเข้มสัญญาณของคาร์บอนของยอดเปล้าน้อยที่ป้อนด้วย 0.05% (w/w) [^{13}C]-glucose 10 วัน และ 15 วัน เป็น 2.0 ± 0.30 และ 1.8 ± 0.23 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยอดเปล้าน้อยที่ป้อนด้วย 1% (w/w) unlabeled glucose จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่เวลา 10 วัน จึงเป็นระยะบ่มที่เหมาะสม สำหรับการทำให้ Feeding experiment เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะวิเคราะห์รูปแบบการคิดกลไกในโมเลกุลของ plaunotol ต่อไป

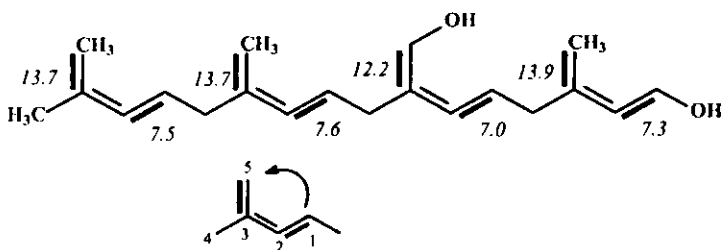
6. รูปแบบการติดฉลากในโมเลกุล Plaunotol (Labeling pattern of plaunotol)

Uniformly labeled glucose

ยอดเปล้าน้อย ผ่านการป้อนในสารละลายที่ 1-3 กลุ่มละ 10 ตัวอย่าง บ่มในสภาวะทดลองเป็นเวลา 10 วัน นำยอดเปล้าน้อยที่ผ่านการป้อนสารติดฉลาก มาแยกตามวิธีการแยกสาร plaunotol จากนั้นนำสารมาวิเคราะห์ด้วย ^{13}C -NMR spectroscopy ผลการทดลอง ตัวอย่างสาร plaunotol ที่แยกได้จากการป้อนด้วย [U- ^{13}C]-glucose เป็นเวลา 10 วัน นำไปวิเคราะห์ด้วย quantitative ^{13}C -NMR spectroscopy

กลูโคสติดฉลากจะผ่านกระบวนการ glycolysis ได้เป็นสารปฐมภูมิ เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างโมเลกุล plaunotol สารละลายที่ป้อนในการทดลองเป็นสารละลายระหว่าง unlabeled glucose และ [U- ^{13}C] glucose อัตราส่วน 1:20 โมเลกุลปฐมภูมิจึงเป็นสารผสมระหว่าง unlabeled- และ [U- ^{13}C]- ดังนั้นในโมเลกุล plaunotol ที่ประกอบด้วยสารผสมระหว่าง unlabeled- และ [U- ^{13}C]- เมื่อวิเคราะห์สัญญาณ ^{13}C สัญญาณที่แสดงเป็นลักษณะ " ^{13}C -satellite signal" กล่าวคือเกิดการ coupling ระหว่าง ^{13}C - ^{13}C ที่อยู่ติดกัน ค่า Coupling constant ระหว่าง ^{13}C - ^{13}C มีค่าระหว่าง 40-50 Hz ผลการทดลองพบว่าสัญญาณที่แสดงเป็น ^{13}C satellite signal จำนวน 8 ชุด สัญญาณ (รูปที่ 15 และรูปที่ 16) และมีค่า coupling constant ดังแสดงในตารางที่ 6 และเมื่อคำนวณ incorporation rate ของ [U- ^{13}C] glucose พบว่ามีค่าระหว่าง 7-14% (รูปที่ 14)

จากผลการทดลองป้อน [U- ^{13}C]-glucose ในยอดเปล้าน้อย แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของ [U- ^{13}C] glucose ได้ถูกนำไปใช้ในวิถีชีวสังเคราะห์ของ plaunotol พบ satellite signals ที่ตำแหน่ง 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19 และ 20 ในโครงสร้างของ plaunotol (รูปที่ 15) ดังนั้นโมเลกุลของ plaunotol ประกอบด้วย isoprene unit จำนวน 4 หน่วย โดยแต่ละหน่วยย่อย มาต่อกันชนิด "head-to-tail" ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ในแต่ละหน่วย isoprene มีการติดฉลาก ณ ตำแหน่ง 1, 2 3, และ 5 นอกจากนี้ใน NMR spectra ยังพบว่าสัญญาณ ^{13}C ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ยังแสดงการ coupling กับคาร์บอนตำแหน่ง 17 ผ่าน space ดังเห็นเป็น doublet signal (รูปที่ 16) ในลักษณะนี้ยังพบในคาร์บอน ณ ตำแหน่ง 5, 9 และ 13 ที่ coupling กับคาร์บอนตำแหน่ง 18, 19 และ 20 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพขยาย (รูปที่ 16)



รูปที่ 15 แสดง Labeling pattern ของสาร plaunotol เมื่อป้อนด้วย 0.05% (w/w)[U- ^{13}C]-glucose (เส้นทึบ แสดงตำแหน่งที่ ^{13}C - ^{13}C ที่อยู่ติดกัน, ตัวเลขแสดงค่า % สัญญาณ NMR signal ของ ^{13}C -coupled satellite เทียบกับ total signal)

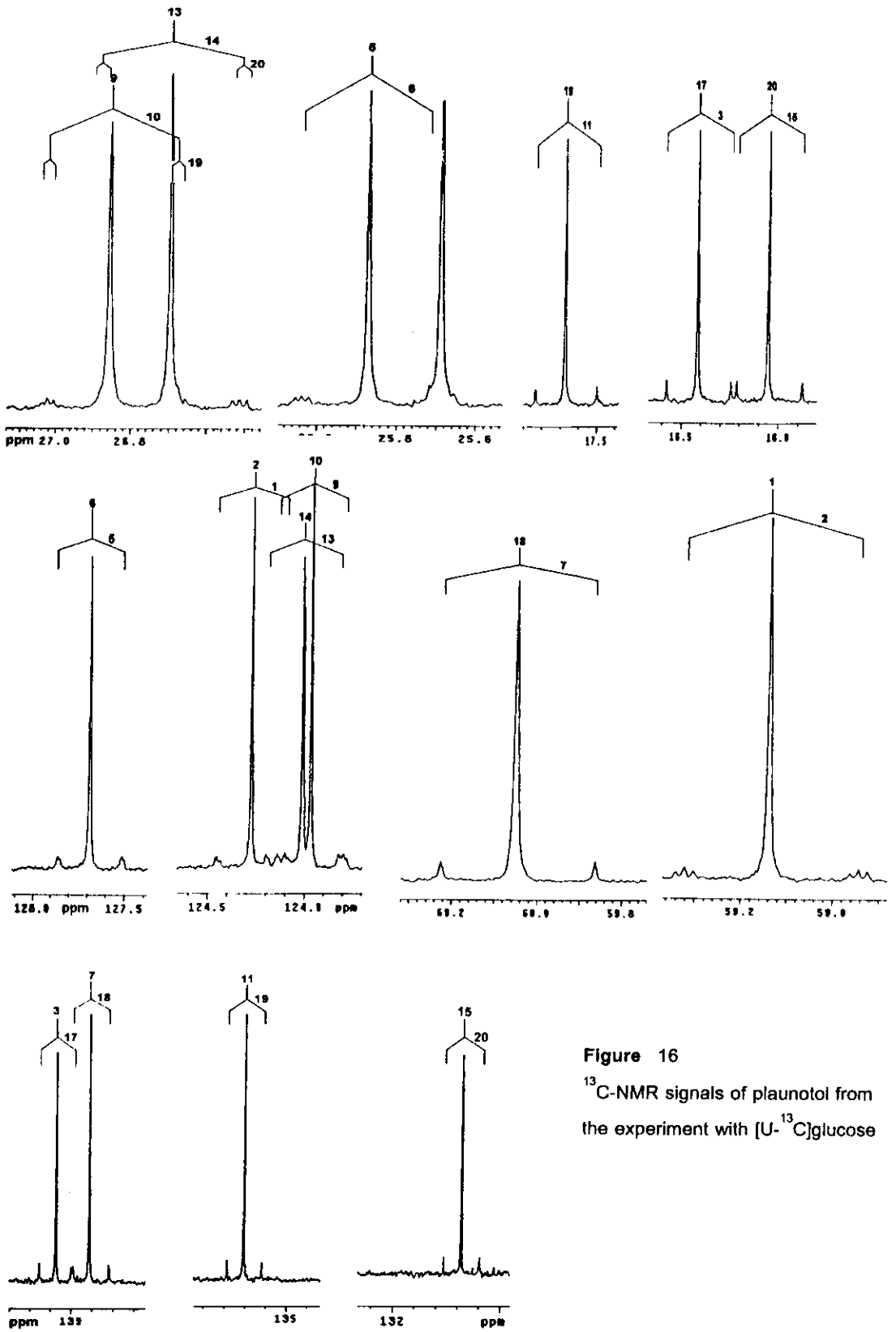
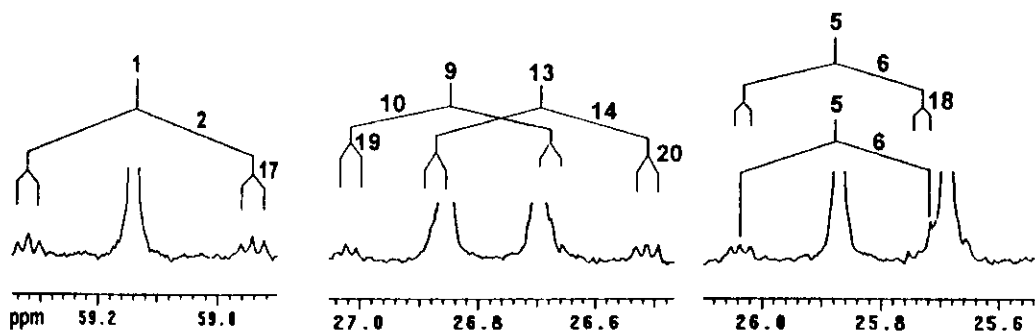


Figure 16
 ^{13}C -NMR signals of plaunotol from
 the experiment with $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ glucose



รูปที่ 16 Expanded view of ^{13}C NMR signals of C-1, C-5, C-9 and C-13 of plaunotol

ตารางที่ 6

แสดงค่า ^{13}C - ^{13}C coupling constant ของสาร plaunotol ที่ผ่านการป้อนด้วย 0.05% (w/w)[U- ^{13}C]-glucose

position	^{13}C - ^{13}C coupling constant (Hz)	Corresponding carbon
1	47.4	2
2	47.4	1
3	41.9	17
5	43.7	6
6	43.7	5
7	45.6	18
9	43.7	10
10	43.7	9
11	42.3	19
13	43.7	14
14	43.7	13
15	42.3	20
17	41.9	3
18	45.6	7
19	42.3	11
20	42.3	20

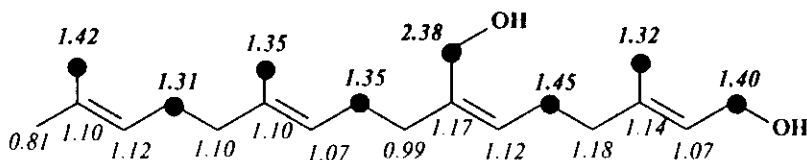
Single labeled glucose

ในการทดลองป้อนด้วย $[1-^{13}\text{C}]$ -glucose ที่อยู่ในรูปสารละลายร่วมกับ unlabeled glucose ในอัตราส่วน 1:1 ในระยะเวลาและสภาวะดังอธิบายในวิธีการทดลอง สาร plaunotol ที่แยกได้นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์วิเคราะห์โครงสร้าง และรูปแบบการติดฉลากในโมเลกุล ด้วย quantitative ^{13}C -NMR spectroscopy โดยการเปรียบเทียบกับสาร plaunotol ที่แยกได้จากยอดเปล้าน้อยที่ผ่านการป้อนด้วย unlabeled glucose และนำมาวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกัน ผลการนำค่า integral ของสัญญาณ ^{13}C - ของแต่ละคาร์บอนมาคำนวณ Relative ^{13}C -abundance เปรียบเทียบแต่ละสัญญาณ ณ คาร์บอนอะตอมตำแหน่งเดียวกัน และเทียบกับ natural abundance of ^{13}C (1.1%) ผลการทดลองวิเคราะห์สัญญาณ ^{13}C ให้ผลดังแสดงในตาราง 7

Table 7 Comparison of ^{13}C -signals of Plaunotol from feeding experiments with unlabeled glucose [S] and $[1-^{13}\text{C}]$ glucose [C]

Carbon atom	Chemical shift, CHCl_3 , ppm ^{13}C -	^{13}C -Signal intensity (from integration C-11 = 1.00)		
		Unlabeled glucose	$[1-^{13}\text{C}]$ glucose	Relative ^{13}C -abundance
1	58.9	2.50	3.2	1.40
2	124.2	2.50	2.46	1.07
3	138.9	1.11	1.15	1.14
4	39.2	2.45	2.65	1.18
5	25.8	2.60	3.43	1.45
6	127.5	2.27	2.31	1.12
7	138.8	1.24	1.33	1.17
8	34.6	2.48	2.46	0.99
9	26.8	2.19	2.73	1.35
10	123.9	2.68	2.61	1.07
11	131.3	1.00	1.00	1.10
12	39.6	2.81	2.85	1.10
13	26.6	2.71	3.33	1.35
14	124.0	2.39	2.45	1.12
15	135.3	1.26	1.27	1.10
16	25.6	4.17	3.08	0.81
17	16.4	1.65	1.97	1.31
18	59.8	1.51	3.27	2.38
19	17.6	1.72	2.11	1.35
20	15.8	1.93	2.50	1.42

จากผลการทดลองเปรียบเทียบ Relative ^{13}C -abundance ระหว่างสาร plaunotol ที่ได้จากการป้อน [^{13}C] glucose และ unlabeled glucose พบว่าโมเลกุล plaunotol ณ ตำแหน่งที่ 1, 5, 9, 13, 17, 18, 19 และ 20 โดยค่า Relative ^{13}C -abundance เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.49 ± 0.36 โดยขณะที่ตำแหน่งที่เหลือมีค่า Relative ^{13}C -abundance เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.08 ± 0.09 (ตารางที่ 7, รูปที่ 17) พิจารณาตำแหน่งการติดฉลากในแต่ละ isoprene unit ปรากฏการติดฉลาก ณ ตำแหน่ง 1 และ 5 ในโมเลกุลของ isoprene unit ของ plaunotol



รูปที่ 17 รูปแบบการติดฉลากของ ^{13}C - บนโครงสร้างของ plaunotol

7. รูปแบบการติดฉลากในโมเลกุล Phytosterols (Labeling pattern of phytosterols)

Uniformly labeled glucose

การติดตามสารติดฉลากในโมเลกุล phytosterols ทำเช่นเดียวกับการศึกษารูปแบบการติดฉลากในโมเลกุลของ plaunotol แยกสารและตกผลึกจนได้สาร phytosterols ที่บริสุทธิ์ นำผลึกที่ได้วิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^1H - และ ^{13}C -NMR spectroscopy สารที่แยกได้มีค่า ^1H - และ ^{13}C -NMR data ตรงกับ phytosterols ที่แยกจากใบเปล้าน้อย และเปรียบเทียบกับรายงาน ของ De-Eknankul and Potduang (2003)

พิจารณา ^1H -NMR ลักษณะของ spectrum แสดงให้เห็นเป็นสารผสมระหว่าง sitosterol และ stigmasterol โดยพิจารณา δ 5.04 (0.22 H, dd 15.2, 8.8 Hz) และ δ 5.16 (0.22 H, dd 15.2, 8.8 Hz) แสดงถึงสัญญาณ H-22 และ H-23 ของ stigmasterol และพิจารณา δ 5.36 (1.01 H, d, 5.4 Hz) แสดงถึงสัญญาณ H-6 ของ sitosterol และ stigmasterol เมื่อคำนวณอัตราส่วนของ H-6:H-22:H-23 เป็น 1.0:0.41:0.41 แสดงถึงสารผสมระหว่าง sitosterol:stigmasterol มีอัตราส่วน 1.4:1.0 อย่างไรก็ตาม ข้อมูล GC/MS ของ phytosterols ที่แยกได้จากใบเปล้าน้อยพบว่ามี ergosterol อยู่ด้วย

พิจารณา ^{13}C -NMR spectroscopy ผลการทดลองพบว่า สาร phytosterols ที่แยกได้เป็นสารผสมระหว่าง sitosterol/ergosterol และ Stigmasterol ในอัตราส่วนประมาณ 75:25 โดยสามารถแยกได้จากสัญญาณ ของ ^{13}C - ที่ปรากฏใน spectrum จากนั้นนำสารที่แยกมาได้ไปวิเคราะห์รูปแบบของสารที่ติดฉลากด้วยเทคนิค ^{13}C -NMR Spectroscopy เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากยอดเปล้าน้อยที่ป้อนด้วยสารละลาย 1% (w/v) unlabeled glucose ภายใต้สภาวะเดียวกัน

สาร phytosterols ที่แยกได้จากการป้อนด้วย 0.05% (w/v) [^{13}C] glucose เจือจางด้วย unlabeled glucose อัตราส่วน 1:20 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ^{13}C -NMR spectroscopy ผลการทดลองไม่พบสัญญาณที่เป็น "carbon satellite signals" พิจารณาโมเลกุล unlabeled- และ [^{13}C] glucose ที่เข้าสู่กระบวนการ glycolysis ย่อยเป็นโมเลกุลปฐมภูมิ สู่การสร้างโมเลกุลของ phytosterols โมเลกุล [^{13}C] glucose นอกจาก

ถูกเจือจางด้วย unlabeled glucose แล้ว ยังถูกเจือจางด้วยสารปฐมภูมิในพืชอีกด้วย ส่งผลให้ "incorporation rate" ของสารติดตามมีค่าต่ำ นั้นหมายถึงโมเลกุลที่จะพบการต่อกันระหว่างโมเลกุลที่เป็น ^{13}C - ^{13}C จะมีอัตราที่ต่ำ ซึ่งทำให้ไม่พบสัญญาณ carbon satellite signals

Single labeled glucose

การติดตามสารติดตามในโมเลกุลของ phytosterols ทำได้โดยการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร phytosterols ที่แยกได้จากการป้อนสารติดตามชนิด [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-glucose ให้กับยอดเปล้าน้อย วิเคราะห์โครงสร้าง และรูปแบบการติดตามในโมเลกุล ด้วย ^{13}C -NMR spectroscopy โดยการเปรียบเทียบกับสาร phytosterols ที่แยกได้จากยอดเปล้าน้อยที่ผ่านการป้อนด้วย unlabeled glucose และนำมาวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยคำนวณอยู่ในรูปของ Relative ^{13}C -abundance ณ คาร์บอนอะตอมตำแหน่งเดียวกัน เปรียบเทียบระหว่าง การป้อนด้วย [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-glucose และ unlabeled glucose ผลการวิเคราะห์ Relative ^{13}C -abundance ไม่พบความแตกต่างระหว่างค่า ^{13}C -abundance ระหว่าง phytosterols ที่แยกได้จากการป้อนกลูโคสทั้งสองชนิด ซึ่งอาจเป็นผลจากโมเลกุลกลูโคสไม่ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ของ phytosterol ณ เวลา และช่วงอายุของพืช ที่นำมาป้อนสารติดตาม หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ ในระยะที่ป้อนสารติดตาม ไม่มีการแสดงออกถึงการสร้างผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ของ phytosterols