บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นในการทดลองโดยการอินฟราเรดสเปกโตโฟโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อจะหาว่าสารที่เตรียมขึ้นนี้มีหมู่หน้าที่ (functional group) ตามที่ต้องการหรือไม่ และการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารโดยโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์เพื่อบอกตำแหน่งของไฮโดรเจนของหมู่ต่าง ๆ เนื่องจากสารที่เตรียมขึ้นนี้มีลักษณะโครงสร้างไม่ซับซ้อน ดังนั้นการวิเคราะห์โดยอินฟราเรดและโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตโฟโตเมตรีสามารถหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารได้ จากผลการทดลองแสดงว่าสารที่เตรียมขึ้นนี้มีสูตรโครงสร้างตามที่ต้องการกล่าวคือ อินฟราเรดสเปกตรัมที่สำคัญคือ ที่ wavenumber ประมาณ 3375 และ 3300, 1720 และ 1430, 1320 และ 1160 เซนติเมตร$^{-1}$ แสดงว่าสารมีหมู่หน้าที่ของเอมีนแบบปฐมภูมิ (primary amine), หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group), หมู่ซัลโฟนามิโด (sulfonamido group) ตามลำดับ ยกเว้นเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน ซึ่งไม่แสดง C = O stretching ที่ประมาณ 1720 เซนติเมตร$^{-1}$ แสดงว่าหมู่คาร์บอกซิลของ side chain ของเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนอยู่ในรูปคาร์บอกซิเลตไอออน ซึ่งมี stretching ที่ประมาณ 1601 เซนติเมตร$^{-1}$ ส่วนโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม มีค่า chemical shifts (ppm) ประมาณ 0.66 - 3.78, 6.51 - 7.47, 7.38 - 7.58 แสดงถึงโปรตอนในหมู่อัลคิล (alkyl group), โปรตอนในวงเบนซีน (benzene ring), โปรตอนในเอมีนแบบทุติยภูมิ (secondary amine) ตามลำดับ จากสเปกตรัมไม่แสดง chemical shift ของโปรตอนของหมู่คาร์บอกซิลของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นอาจเนื่องจากโปรตอนที่หมู่คาร์บอกซิลแตกตัวและแลกเปลี่ยนกับ deuterium ในตัวทำละลาย DMSO-d_6 จากผลการวิเคราะห์ธาตุแสดงว่าสารที่เตรียมขึ้นนี้มีสูตรโมเลกุลถูกต้อง เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ของธาตุต่าง ๆ ในสารประกอบจากการตรวจวิเคราะห์มีความแตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ของธาตุต่าง ๆ ของสารประกอบจากการคำนวณไม่เกิน 0.5 เปอร์เซ็นต์

สำหรับเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีนที่เตรียมขึ้นในการทดลองไม่ได้ส่งไปตรวจวิเคราะห์ธาตุ เนื่องจากสารมีจุดหลอมเหลวตรงกับจุดหลอมเหลวที่ได้มีรายงานไว้โดย Kolloff (1938), Mazza และ Migliardi (1938) ส่วนสารอื่นที่ได้ส่งไปตรวจวิเคราะห์ธาตุเนื่องจากสารมีจุดหลอมเหลวต่างจากจุดหลอมเหลวที่ได้มีรายงานไว้โดย Archer และคณะ (1951), Giannini และ Gallice (1956), Chen-e และ Schukina (1956)

การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนเตรียมจากการรวมตัวระหว่างไดไฮดรอกซีอะซีโตน และ 2,4,5-ไตรอะมิโน-6-ไฮดรอกซีไพริมิดีนโดยวิธีของ Forrest และ Walker (1949) ในการเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟตจะนำ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนที่เตรียมได้มาเติมลงในกรดไพโรฟอสฟอริกที่หลอมเหลวอย่างช้า ๆ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชั่น (polymerization) (Ho และคณะ, 1974) จากการทดสอบโดยการแยกสารบนแผ่นพีอีไอเซลลูโลส พบว่าสารที่ได้ยังมีสารอื่นเจือปนอยู่ อาจเนื่องจากว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อย่างอื่นด้วย หลังจากผ่านสารที่เตรียมได้นี้ลงในคอลัมน์ของโดเวกซ์ เอจี 1 x 8 แอนไอออนเอกซ์เชนก์เรซิน จะได้สารที่บริสุทธิ์ขึ้น แต่พบว่า 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟตที่ผ่านออกจากคอลัมน์มีปริมาณค่อนข้างน้อย (%yield ต่ำ) การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนอีกวิธีหนึ่งอาจเตรียมได้จากการแตก (cleavage) กรดโฟลิกตามวิธีของ Thijssen (1973) ซึ่งวิธีนี้จะทำการแตกกรดโฟลิกโดยไฮโดรเจนโบรไมด์ (hydrogen bromide) ได้เป็น 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ฟอร์มิลพเทอริดีนจากนั้นนำสารนี้มารีดิวส์ด้วยโซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) ได้เป็น 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีน จะเห็นได้ว่าวิธีของ Thijssen (1973) ต้องใช้วิธีการ 2 ขั้นตอนในการเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนและใช้เวลาในการเตรียมมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ซึ่งสามารถเตรียมสารนี้ได้โดยวิธีการเพียงขั้นตอนเดียว และใช้เวลาน้อยกว่า แต่วิธีของ Thijssen (1973) ได้สารที่บริสุทธิ์และมี % yield มากกว่าวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลองนี้

2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟตยังไม่สามารถใช้เป็นซับสเตรตของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทสได้ จากการทดลองของ Ortiz และ

Hotchkiss (1966) ได้แสดงว่า 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีน ไพโรฟอสเฟตในรูปรีดิวส์ (2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอสเฟต; DHPP) เท่านั้นจึงจะสามารถถูกใช้เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ได้ ดังนั้นในการเตรียมซับสเตรตของเอนไซม์นี้จึงต้องทำการรีดิวส์ด้วยสารที่ทำให้เกิดการรีดิวส์ (reducing agent) ในการทดลองนี้ใช้โซเดียมไดไทโอไนต์ (Friedkin และคณะ, 1962; Nagai, 1968) และใช้ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลเป็นสารช่วยป้องกันการถูกออกซิไดส์ (Osborn และ Huennekens , 1958)

ในการหาความเข้มข้นของ DHPP ทำโดยการวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตรตามวิธีของ Shiota และคณะ (1969) การวัดความเข้มข้นของ DHPP โดยวิธีนี้สามารถเตรียมความเข้มข้นของ DHPP ตามที่ต้องการได้ง่ายและสะดวก แต่อย่างไรก็ดีในสารละลายอาจมี 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีนโมโนฟอสเฟตซึ่งเกิดจากการแยกสลายด้วยน้ำของ DHPP สามารถจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตรได้เช่นกัน แต่ไม่สามารถถูกใช้เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ (Shiota และคณะ, 1964; Weisman และ Brown , 1964; Ortiz และ Hotchkiss, 1966) ดังนั้นการหาความเข้มข้นของ DHPP โดยวิธีนี้จึงเป็นค่าโดยประมาณ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ในการวัดปริมาณของ DHPP ในปัจจุบันยังไม่พบวิธีหาความเข้มข้นของ DHPP ได้ถูกต้องที่สุด

เนื่องจากการหาปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกโดยวิธีของ Smalley (1949) นอกจากกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกที่ทำให้เกิดสีม่วงแดงแล้ว ยังพบว่าสารที่เป็นอะโรแมติกเอมีนอื่น ๆ สามารถทำให้เกิดสีม่วงแดงโดยวิธีนี้ด้วย จึงอาจเป็นได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton อาจมีสารพวกอะโรแมติกเอมีนเจือปนอยู่ด้วยจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาและสามารถวัดค่า OD ที่ 540 นาโนเมตรได้ แสดงว่าสารอาหารที่ใช้ในการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton อาจมีสารที่เป็นอะโรแมติกเอมีนอยู่หรืออาจมีปฏิกิริยาได้สารที่เป็นอะโรแมติกเอมีนหลังการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จากการหาปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกในสารละลายสกัดของ *E. coli* พบว่ายังคงมีกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเหลืออยู่ เนื่องจาก *E. coli* สามารถสังเคราะห์กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกได้ (Huang และ Pittard,1967; Weisblum และ Davies, 1968 ; White และคณะ, 1976) แต่ปริมาณความเข้มข้นของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกที่มีอยู่อาจมีปริมาณน้อยกว่าที่วัดได้ด้วยเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้วเช่นกัน แสดงว่าการสกัด

เอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทสที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่อาจขจัดกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกที่มีอยู่ในเซลล์ออกได้หมด

ในการหาค่า MIC อาจหาได้โดยวิธี tube dilution และ disk agar diffusion ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดต่าง ๆ กัน วิธี disk agar diffusion สามารถทำได้ง่ายและประหยัด แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือการอ่านผลอาจผิดพลาดได้ โดยอาจมีสาเหตุเนื่องจากปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ, ความหนาบางของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Barry และ Fay, 1973) นอกจากนี้สารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและทำให้เกิด clear zone นอกจากจะขึ้นกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแล้ว ยังขึ้นกับคุณสมบัติในการแพร่ (diffusion) และการละลาย (solubility) ของสารด้วย (Bauer และคณะ,1966) วิธี disk agar diffusion ที่ใช้ในการทดลองโดยทั่วไปยังไม่เป็นวิธีมาตรฐานและวิธีนี้มีตัวแปร (variables) หลายประการที่มีผลต่อการทดลอง สำหรับวิธี tube dilution เป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีความถูกต้องที่สุดในการหา susceptibility ในการหาปริมาณ (หน่วยหรือไมโครกรัม) ของสารต่อต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) แต่วิธีนี้ใช้เวลามากและมีราคาแพง (Finegold และคณะ, 1978)

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ได้หาค่า MIC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton โดยวิธี tube dilution ตามวิธีของ Krüger-Thiemer และคณะ(1965) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการหาค่า MIC ของซัลโฟนาไมด์ เนื่องจากในสารอาหารไม่มีกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกและอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton นอกจากจะใช้สำหรับ *E. coli* แล้วยังสามารถใช้กับแบคทีเรียได้หลายชนิดเช่น *Staphylococcus aureus* (Wachsm), *Klebsilla pneumoniae* (8045), *Pseudomonas aeroginosa* (214/15), *Mycobacterium smegmatic* (No. 169)

จากผลการทดลองนี้พบว่าซัลฟานิลาไมด์มีค่า MIC น้อยกว่า MIC ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นในการทดลองนี้คือ มีค่าเท่ากับ 1.47×10^{-5} โมล/ลิตร ค่า MIC ของซัลฟานิลาไมด์ที่หาได้นี้มีค่าน้อยกว่า MIC ของซัลฟานิลาไมด์ที่รายงานไว้โดย Krüger-Thiemer และคณะ(1965) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.28×10^{-4} โมล/ลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องจาก *E. coli* ที่ใช้ในการทดลองนี้มีจำนวนน้อยกว่าจำนวน *E. coli* ที่ Krüger-Thiemer และคณะ (1965) ใช้ในการทดลองกล่าวคือ Krüger-Thiemer และคณะ(1965) ใช้ *E. coli* จำนวน 7.7×10^{5} เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton 2.5 มิลลิลิตร แต่ในการทดลองนี้ใช้ *E. coli* จำนวน 1.03×10^{5} เซลล์ เนื่องจากเมื่อใช้ *E. coli* จำนวน 7.7×10^{5} เซลล์ กรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัคาโนอิกบางชนิดที่เตรียมขึ้นในการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ ซึ่งไม่สามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นในการทดลองทั้งหมดได้ Garrett และ Wright (1967) ได้ทำการทดลองผลของซัลโฟนาไมด์ต่อการเจริญของแบคทีเรียได้แสดงว่าความเข้มข้นของซัลฟาไทอะโซล (sulfathiazole) ที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* จะเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวน *E. coli* เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในการหาค่า MIC หรือผลของซัลโฟนาไมด์ต่อการเจริญของแบคทีเรีย จำนวนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองจะต้องมีจำนวนเท่ากันสำหรับซัลโฟนาไมด์แต่ละชนิดจึงสามารถจะนำค่า MIC มาเปรียบเทียบกันได้ นอกจากนี้การที่ค่า MIC ของซัลฟานิลาไมด์ที่ได้จากการทดลองนี้มีความแตกต่างจากค่าที่ Krüger-Thiemer และคณะ (1965) ได้รายงานไว้อาจเนื่องจาก *E. coli* ที่ใช้ในการทดลองเป็น strain ต่างชนิดกันกล่าวคือ Krüger-Thiemer และคณะ (1965) ใช้ *E. coli* (295 V) แต่การทดลองนี้ใช้ *E. coli* K_{12} ATCC 3110

ค่า MIC สำหรับ *E. coli* ของซัลฟานิลาไมด์ซึ่งได้รายงานไว้โดย Struss และคณะ (1941), Bell และ Roblin (1942), Rose และ Fox (1942), Wood (1942), Cowles (1943) เท่ากับ 14.0×10^{-4}, 2.0×10^{-4}, 25.0×10^{-4}, 4.0×10^{-4}, 46.0×10^{-4} โมล/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่ามีความแตกต่างกัน ดังนั้นค่า MIC ของซัลโฟนาไมด์อาจมีค่าแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง, ชนิดและ strain ของแบคทีเรีย, ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ, เวลาที่ใช้ในการอินคิวเบต นอกจากนี้อาจขึ้นกับสภาวะการทดลองอย่างอื่น เช่น ความชื้น, อุณหภูมิ และความดันบรรยากาศ (Ryan และ Sherris , 1976) เป็นต้น

ค่า MIC ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลองตามที่แสดงในตารางที่ 5 พบว่ามีค่าตั้งแต่ 7.46×10^{-3} โมล/ลิตร ถึง 1.07×10^{-1} โมล/ลิตร แสดงว่ากรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับซัลฟานิลาไมด์ซึ่งแสดงในตารางที่ 5 ได้มีผู้รายงานการทดลองการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกบางชนิดว่า เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน มีค่า MIC สำหรับ *E. coli* สูงกว่า 9.0×10^{-4} โมล/ลิตร (Bell และ Roblin , 1942), เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีนไม่แสดง

การยับยั้งการเจริญของ *E. coli* (Kohn และHarris , 1941) เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีนไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของ β - *Hemolytic streptococci* และ *Tetanus toxin* (Mazza และ Migliardi, 1938; Kohn และ Harris, 1941) นอกจากนี้พบว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีนให้ผลในการรักษาการติดเชื้อจาก *Streptococcus* ในหนูได้น้อยมาก (inferior activity) (Bauer, 1939), เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีนไม่มีผลต่อการรักษาการติดเชื้อจาก *Staphylococcus* ในหนู (Vanderme, 1962) จากผลการทดลองเหล่านี้สามารถกล่าวได้ว่าสารดังกล่าวนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียค่อนข้างต่ำตามผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น

อย่างไรก็ดีจากผลการทดลองในตารางที่ 5 สำหรับกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกพบว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมีค่า MIC ต่ำที่สุด และเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีนมีค่า MIC สูงที่สุด จากค่า MIC แสดงว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีกว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมีหมู่ไฮดรอกซิลบนวงเบนซีน (benzene ring) ใน side chain ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลนี้อาจช่วยในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิก สำหรับกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนได้แก่ เอ็น(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน และเอ็น(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน พบว่าการเพิ่มไฮโดรโฟบิซิตีด้วยหมู่อัลคิล (alkyl group) ทำให้สารมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* เพิ่มขึ้น หรือ มีค่า MIC ต่ำลง

ส่วนเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีนมีค่า MIC ค่อนข้างสูงทั้งนี้อาจเนื่องจากเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีนมี side chain ที่มีซัลเฟอร์ (sulfur) อยู่ซึ่งอาจทำให้การยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ลดลง จากการทดลองหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 9.0×10^{-4} โมล/ลิตร ของสายอุบล (2526) พบว่าซัลเฟอร์

ที่ประกอบอยู่ในหมู่แทนที่ของซัลโฟนาไมด์ ได้แก่ N,N'bis (sulfanilyl) L-cystine และ sodium -*p*-aminobenzenesulfonamidopropylthiosulfate สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* เพียง 10.0 เปอร์เซ็นต์ และ 10.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ *p*-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ 38.7 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจากผลการทดลองอาจเป็นได้ว่าซัลเฟอร์ที่ประกอบอยู่ในหมู่แทนที่ที่เป็นอะลิแฟติกของซัลโฟนาไมด์ทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ของซัลโฟนาไมด์ลดลง

ในขั้นตอนการสกัดไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จากการทดลองพบว่าหลังจากตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวแล้ว 30-70 เปอร์เซ็นต์ จะได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้นประมาณ 1.93 เท่า (84.62 % yield) ของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่มีอยู่ในสารละลายสกัดหลังการทำลายผนังเซลล์ จากการทดลองของ Richey และ Brown (1969) ได้แสดงว่าเอนไซม์ในสารละลายของโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 20-70 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมจำเพาะมากกว่าเอนไซม์ในสารละลายสกัดหลังการทำลายผนังเซลล์ประมาณ 2 เท่า ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองนี้

ผลการหาค่า K_m โดยประมาณของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก จากการทดลองพบว่า K_m มีค่าเท่ากับ 3.9×10^{-6} โมล/ลิตร ค่านี้มีความแตกต่างจาก K_m ที่หาได้โดย Richey และ Brown (1969) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.5×10^{-6} โมล/ลิตร และที่หาได้โดย Swedberg และคณะ (1979) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.1×10^{-6} โมล/ลิตร ความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากในการทดลองนี้ใช้สารละลายของโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 30-70 เปอร์เซ็นต์ อาจมีโปรตีนหรือสารอื่นเจือปนอยู่ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส แต่ในการทดลองของ Richey และ Brown (1969), Swedberg และคณะ (1979) ได้ใช้ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทสที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้ว โดยการผ่านลงในคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์จี-100 (Sephadex G-100) และดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) อย่างไรก็ดีความแตกต่างนี้รวมถึง strain ของ *E. coli* และสภาวะต่าง ๆ วิธีการหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่างกันด้วย

ในการหาค่า I_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ กับความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ โดยทั่วไปจะหาโดยการเขียนกราฟความสัมพันธ์ในช่วงของความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่ทำให้

เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ประมาณ 30-70 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 30-70 เปอร์เซ็นต์ ของตัวยับยั้งส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (Baker และคณะ, 1960)

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ และความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ดังแสดงในรูปที่ 22 ถึงรูปที่ 29 พบว่าบางกราฟเมื่อความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์มีค่าเท่ากับ 0, $\frac{v_o}{v_i}$ ไม่เท่ากับ 1 ความคลาดเคลื่อนนี้อาจเนื่องมาจาก v_o และ v_i ควรได้จากการทดลองจากเอนไซม์บริสุทธิ์ แต่ในการทดลองนี้เอนไซม์ที่ใช้ยังไม่บริสุทธิ์ และมีสารอื่นเจือปนอยู่ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

อย่างไรก็ดีค่า I_{50} ที่หาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ และความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ตามวิธีของ Baker (1967) น่าจะถูกต้องกว่าค่า I_{50} ที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition และค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ เนื่องจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ และความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์เป็นกราฟเส้นตรงซึ่งสามารถคำนวณค่า I_{50} เมื่อ $\frac{v_o}{v_i}$ เท่ากับ 2 ได้จากสมการกราฟเส้นตรง ดังนั้นค่า I_{50} ที่ได้จึงมีความถูกต้องกว่าค่า I_{50} ที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition และค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ซึ่งอ่านค่า I_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ซึ่งบางครั้งไม่เป็นกราฟเส้นตรงจึงทำให้ค่า I_{50} ที่ได้จากกราฟเป็นค่าที่ไม่ค่อยถูกต้อง จากผลการทดลองในตารางที่ 6 ซึ่งแสดงค่า I_{50} ที่หาจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ กับความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์พบว่าความแตกต่างระหว่าง $\frac{[I_{50}]}{[S_1]}$ และ $\frac{[I_{50}]}{[S_2]}$ มีค่าน้อยกว่าความแตกต่างระหว่าง $\frac{[I_{50}]}{[S_1]}$ และ $\frac{[I_{50}]}{[S_2]}$ ซึ่งค่า I_{50} หาจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition และค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ตามแสดงในตารางที่ 7 แสดงว่าการหาค่า I_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ และความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์มีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่าค่า I_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibition และค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ ดังนั้น $\left(\frac{[I_{50}]}{[S]}\right)_a$ จะมีความถูกต้องกว่า $\left(\frac{[I_{50}]}{[S]}\right)_b$ เช่นกัน

จากผลการทดลองในข้อ 4.9 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก เท่ากับ 2.16×10^{-5} โมล/ลิตร และ 1.29×10^{-4} โมล/ลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.84 และ 33 เท่าของค่า K_m ตามลำดับ ดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทสมีค่าใกล้เคียงกัน จากสมการของ Baker (1967) ซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวกว่าถ้า [S] มีค่ามากกว่า 4 เท่าของค่า K_m และปฏิกิริยาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของตัวยับยั้งเป็นแบบแข่งขันแล้วจะทำให้ $\frac{[I_{50}]}{[S]}$ เท่ากับ $\frac{K_i}{K_m}$ และเนื่องจาก $\frac{K_i}{K_m}$ เป็นค่าคงที่ ดังนั้นจึงทำให้ $\frac{[I_{50}]}{[S]}$ เป็นค่าคงที่ด้วย และ Laidler (1954) ได้แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ และความเข้มข้นของตัวยับยั้งแบบแข่งขัน โดยเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตต่ำความชันของเส้นกราฟจะมากกว่าความชันของเส้นกราฟเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตสูง จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 22 ถึง รูปที่ 29 ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ และความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเท่ากับ 2.16×10^{-5} โมล/ลิตร เส้นกราฟมีความชันมากกว่าความชันของเส้นกราฟเมื่อความเข้มข้นของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเท่ากับ 1.29×10^{-4} โมล/ลิตร ดังนั้นซัลฟานิลาไมด์และกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นในการทดลองอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขันกับกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกในการเข้าจับกับเอนไซม์

จากค่าดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกจากผลการทดลองในตารางที่ 8 แสดงว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล) ไกลซีนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด และเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล) วาลีนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น้อยที่สุด ค่าดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของซัลฟานิลาไมด์ซึ่งแสดงด้วย $\left(\frac{[I_{50}]}{[S]}\right)_a$ และ $\left(\frac{[I_{50}]}{[S]}\right)_b$ มีค่าเท่ากับ 14.87 และ 16.15 ตามลำดับ ค่านี้ใกล้เคียงกับค่าที่หาได้โดยสายอุบล (2526) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 18.7 ทั้งนี้อาจเนื่องจากใช้สารละลายสกัดของเอนไซม์จาก *E. coli* K12 ATCC 3110 เช่นเดียวกัน ค่าดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จาก *E. coli* ของซัลฟานิลาไมด์จากผลการทดลองของ Brown (1962), McCullough และ Maren (1973), Thijssen (1974), De Benedetti และ Rastelli (1981) เท่ากับ 20.0, 32.0, 10.0 และ 25.0 ตามลำดับ ความแตกต่างนี้อาจเนื่องจาก strain ของ *E. coli* การเตรียมสารละลายสกัดของ *E. coli* และวิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่างกัน

Fujita และ Hansch (1967) ได้หาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และค่า π ของ substituted sulfanilanilide และ N^1-benzoylsulfanilamide นอกจากนี้ Miller และคณะ (1972) ได้หาความสัมพันธ์ระหว่าง MIC และ I_{50} ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของ N^1-phenyl และ N^1-pyridyl sulfonamides กับค่า π ซึ่งค่า π นี้ได้จากค่าที่มีรายงานไว้โดย Fujita และคณะ (1964) ซึ่งได้ทำการทดลองหาค่า π ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 5 องศาเซลเซียส ในการทดลองครั้งนี้ก็ได้นำค่า Δft และ π ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมาหาความสัมพันธ์กับค่า MIC และดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกซึ่งทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเช่นกัน อย่างไรก็ดีค่า Δft และ π ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสที่นำมาศึกษาวิจัยนี้สามารถนำมาหาความสัมพันธ์กับค่าที่ได้จากการทดลองเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองต่างจากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสได้ เนื่องจากความสัมพันธ์นี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่า Δft หรือ π เฉพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเท่านั้น

ค่า Δft และ π แสดงไฮโดรโฟบิซิตีของ side chain ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลองเมื่อเปรียบเทียบค่า Δft กับ π จะเห็นได้ว่าค่า Δft จะแสดงไฮโดรโฟบิซิตีของ side chain ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกได้ถูกต้องกว่าค่า π ทั้งนี้เนื่องจากค่า Δft ได้มาจากการทดลองของกรดอะมิโนซนิดต่าง ๆ โดยตรง (Nazaki และ Tanford, 1971) แต่ค่า π ของ side chain ของกรดอะมิโนไม่ได้หาจากการทดลองของกรดอะมิโนโดยตรง แต่คำนวณจากค่า π ที่ได้มาจากสารประกอบซนิดอื่น (Hansch และ Coats, 1970; Leo และคณะ, 1971) จากผลการทดลองในข้อ 4.11, 4.12 และ 4.13, 4.14 แสดงว่าค่า Δft และ π ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกมีความสัมพันธ์กับ MIC และดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* คล้ายคลึงกัน ดังนั้นค่า π อาจใช้แสดงไฮโดรโฟบิซิตีของ side chain ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกได้เช่นเดียวกับค่า Δft

ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า MIC ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกซนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอน และค่า Δft และ π ซึ่งแสดง

ในข้อ 4.11 รูปที่ 38 และข้อ 4.12 รูปที่ 39 ตามลำดับนั้นพบว่าค่าลอการิทึมของ MIC ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน และเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับค่า Δft ตั้งแต่ 0-1800 คาลอรี/โมล หรือค่า π ตั้งแต่ 0-1.80 จากการทดลองนี้แสดงว่าค่า Δft และ π ของ side chain ชนิดที่เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกอาจช่วยในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* โดยเมื่อ Δft หรือ π มีค่าเพิ่มขึ้น ค่า MIC จะลดลงหรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือเมื่อ Δft หรือ π มีค่าเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* จะเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากหมู่ไฮโดรโฟบิกช่วยให้กรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนซึมผ่านผนังเซลล์ของ *E. coli* ได้ดีขึ้น ทำให้มีปริมาณของสารนี้ในเซลล์เพิ่มขึ้น และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากขึ้น

ถึงแม้ว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนซึ่งเป็นกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่ side chain มีหมู่เฟนิล (phenyl group) พบว่าจากการคำนวณหาความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรงระหว่างค่าลอการิทึมของ MIC และ Δft ของเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนร่วมกับกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดจะได้ความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรงซึ่งจุดตัดที่แกนตั้ง, ความชันและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 4.8327, -4.1998×10^{-4}, และ -0.9998 ตามลำดับซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่แสดงไว้ในรูปที่ 38 และในทำนองเดียวกันจากการคำนวณความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรงระหว่างค่าลอการิทึมของ MIC และค่า π ของเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนร่วมกับกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้น พบว่าจะได้ความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรงซึ่งมีจุดตัดที่แกนตั้ง, ความชันและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 4.8421, -0.4692 และ -0.9965 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่แสดงไว้ในรูปที่ 39 แต่เนื่องจากเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีนซึ่งเป็นกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่ side chain มีหมู่เฟนิลกลุ่มเดียวกับเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมีค่า MIC สูงกว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมาก ดังนั้นจึงไม่นำเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมาคิดรวมในการหาความสัมพันธ์นี้

สำหรับเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีนซึ่งเป็นกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกที่มีซัลเฟอร์อยู่ด้วยซึ่งจากการทดลองพบว่ามีค่า MIC สูงกว่า MIC ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวข้างต้นมาก เมื่อคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของ MIC และ Δft ของเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีนร่วมกับกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดพบว่ากราฟที่ได้จะไม่เป็นเส้นตรง

เป็นที่น่าสังเกตุว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนและเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีนเป็นกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่ side chain มีวงเบนซีนจากผลการทดลองพบว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมีค่า MIC น้อยกว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีนประมาณ 14.3 เท่า แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นหมู่แทนที่วงเบนซีนของ side chain อาจทำให้กรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* เพิ่มขึ้น และเนื่องจากเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมีค่า Δft ต่ำที่สุดสำหรับกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิลอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลอง และมีค่า Δft และ π ค่อนข้างสูง คือมีค่าเท่ากับ 2300 คาลอรี/โมล และ 1.96 ตามลำดับ ดังนั้นจากการทดลองอาจเป็นไปได้ว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมีค่า Δft หรือ π ที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดี

Fujita และ Hansch (1967) ได้แสดงว่าค่า π ของ substituted sulfanilanilde และ substituted N^1-benzoylsulfanilamide เป็นส่วนประกอบอันหนึ่งที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Pneumococcus, Friedlander's bacillus, E. coli* และ *M. smegmatic* ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้สำหรับกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนพบว่าค่าลอการิทึมของ MIC มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับค่า Δft และ π โดยเมื่อค่า Δft หรือ π เพิ่มขึ้น ค่าลอการิทึมของ MIC จะลดลงแต่จากการทดลองของ Miller และคณะ (1972) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่าง MIC และค่า π ของ N^1-phenyl และ N^1-pyridyl sulfonamides ที่ใช้ในการทดลองซึ่งจากผลการทดลองในข้อ 4.11 และ 4.12

พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง MIC และค่า Δft หรือ π ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดนั้นไม่เป็นเส้นตรง

จากผลการทดลองในตารางที่ 8 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง MIC และดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดไม่เป็นเส้นตรง แต่พบว่าค่าลอการิทึมของดัชนีการยับยั้งการทำงานไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนอาจมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับ MIC โดยเมื่อค่า MIC เพิ่มขึ้นค่าลอการิทึมของดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งจากการคำนวณพบว่ากราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log\left(\frac{[I_{50}]}{[S]}\right)_a$ และค่า MIC มีจุดตัดที่แกนตั้ง, ความชันและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 2.4676, -21.0048 และ -0.9707 ตามลำดับ และมีค่า F เท่ากับ 14.4993 ($F_{1,2,0.10} = 8.53$) และกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log\left(\frac{[I_{50}]}{[S]}\right)_b$ และค่า MIC มีจุดตัดที่แกนตั้ง, ความชันและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 2.4589, -20.6151 และ -0.9633 ตามลำดับ และมีค่า F เท่ากับ 18.1391 ($F_{1,2,0.10} = 8.53$) ความสัมพันธ์นี้แตกต่างจากความสัมพันธ์ที่ได้รายงานโดย Miller และคณะ (1972) ซึ่งพบว่าค่า MIC ของ *E. coli* มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับค่า I_{50} สำหรับ N^1-phenyl และ N^1-pyridyl sulfonamides กล่าวคือเมื่อค่า MIC เพิ่มขึ้น I_{50} จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน สาเหตุที่ผลการทดลองนี้แตกต่างจากผลการทดลองของ Miller และคณะ (1972) ดังกล่าวแล้วอาจเนื่องจากซัลโฟนาไมด์ที่ใช้ในการทดลองเป็นอนุพันธ์ของซัลฟานิลาไมด์คนละชนิด

จากผลการทดลองได้แสดงว่า กรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนเมื่อมีค่า Δft หรือ π เพิ่มขึ้นจะมีค่า MIC ต่ำลง นั้นคือสารจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* เพิ่มขึ้นเมื่อค่าไฮโดรโฟบิซิตีของ side chain เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นผลการทดลองได้แสดงอีกว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทสจาก *E. coli* และค่า MIC ของสารซัลโฟนาไมด์ดังกล่าวนี้ อาจเป็นแบบเส้นตรงโดยเมื่อค่าลอการิทึมของดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลดลงค่า MIC จะเพิ่มขึ้น หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งคือสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีจะยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้น้อย ซึ่งจากการทดลองของ Brown (1962) ได้แสดงว่ากรดซัลฟานิลิก (sulfanilic acid) สามารถยับยั้งการทำงาน

ของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ที่สภาวะการทดลอง ทั้งนี้อาจเนื่องจากกรดซัลฟานิลิกเมื่ออยู่ในสารละลายจะมีประจุ ดังนั้นสารนี้อาจซึมเข้าเซลล์ได้น้อยและทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ดังนั้นอาจแสดงได้ว่าสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีอาจจะซึมผ่านผนังเซลล์ได้ไม่ดีจึงทำให้มีค่า MIC สูง

ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* กับค่า Δft และ π ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลองในข้อ 4.13 รูปที่ 40 และข้อ 4.14 รูปที่ 41 ตามลำดับพบว่าเมื่อ Δft หรือ π มีค่าเพิ่มขึ้นแล้วจะทำให้ส่วนกลับของดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีค่าลดลง และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อค่า Δft หรือ π เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1800-2500 คาลอรี/โมล หรือ 1.80-2.63 ตามลำดับ ดังนั้นการเพิ่มหมู่ไฮโดรโฟบิกใน side chainชนิดที่เป็นอะลิแฟติกของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกทำให้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีอาจมีลักษณะของ side chain ที่เป็นอะลิแฟติกที่มีค่า Δft หรือ π ต่ำมาก

จากผลการทดลองของ Miller และคณะ (1972) ได้แสดงว่าค่า π และ I_{50} ของ N^1-phenyl และ N^1-pyridyl sulfonamides ไม่มีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง และจากการทดลองครั้งนี้ก็ไม่มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่างดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กับค่า Δft หรือ π ของสารที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเช่นกัน Foye และคณะ (1982) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของ sodium 4-aminobenzenesulfonamidopropanethiosulfate พบว่าการเพิ่มหมู่ไฮโดรโฟบิกของ $-CH_2-$ นั้นไม่เพิ่มการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก sulfanilamide resistant *Neisseria gonorrheae* ความแตกต่างระหว่างผลการทดลองของ Foye และคณะ (1982) กับผลการทดลองในข้อ 4.13 และ 4.14 ในการทดลองนี้อาจเนื่องจากอนุพันธ์ของซัลฟานิลาไมด์ที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน และเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส ได้จาก strain และชนิดของแบคทีเรียที่ต่างกัน

จากผลการทดลองในข้อ 4.13 และ 4.14 ดังที่กล่าวนี้และจากเหตุผลที่ว่า DHPP และกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเป็นซับสเตรตของเอนไซม์และเป็นสารมีประจุเมื่ออยู่ในสารละลาย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเอนไซม์อาจมีหมู่โพลาร์หรือหมู่ที่มีประจุอยู่ที่บริเวณเร่ง (active site) ซึ่งจากการทดลองของ Thijssen (1977) ซึ่งได้ทำการทดลองการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* ของอนุพันธ์ของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกพบว่า β-*p*-aminobenzoyl propionic acid (PABP) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่า *p*-aminopropiophenone ทั้งนี้อาจเนื่องจาก PABP มีหมู่คาร์บอกซิลทำให้ PABP มีโพลาริตี (polarity) มากกว่า *p*-aminopropiophenone จากผลการทดลองในตารางที่ 8 พบว่าเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่าซัลฟานิลาไมด์ ดังนั้นจึงอาจเป็นได้ว่าหมู่ $-CH_2-COOH$ ทำให้เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีนมีโพลาริตีมากขึ้น จึงทำให้สามารถเข้าจับกับเอนไซม์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มากขึ้น

จากผลการทดลองนี้แสดงว่าการเพิ่มหมู่ไฮโดรโฟบิกใน side chain ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลองทำให้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารนี้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน ทั้งนี้อาจเนื่องจากหมู่ไฮโดรโฟบิกทำให้กรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นโพลาร์ได้ไม่ดี Bartels และ Bock (1983) พบว่าไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* อาจมีบางส่วนที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิก อย่างไรก็ดีบางส่วนที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิกของเอนไซม์ตามที่ Bartels และ Bock เสนอนั้นอาจจะเป็นส่วนที่อยู่ในบริเวณเร่งหรือไม่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ก็ได้ อย่างไรก็ดีผลการทดลองนี้ก็ยังไม่ได้ให้ข้อยืนยันที่เพียงพอที่แสดงว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์ไม่มีลักษณะที่เป็นไฮโดรโฟบิก เพราะการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ก็ขึ้นกับลักษณะโครงสร้างและชนิดของอนุพันธ์ของซัลฟานิลาไมด์เช่นกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาทดลองหาโครงสร้างของบริเวณเร่งของเอนไซม์ต่อไป

เนื่องจากไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในสารละลายสกัดของ *E. coli* ซึ่งยังมีโปรตีนและสารอื่นเจือปนอยู่ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นผลที่ได้จากดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อาจไม่ใช่เนื่องจากปฏิกิริยาของ

กรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกกับเอนไซม์โดยตรง ดังนั้นเพื่อศึกษาถึงผลโดยตรงของสารซัลโฟนาไมด์ดังกล่าวต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ควรหาค่า K_i (inhibitor constant) ของสารนี้โดยใช้เอนไซม์บริสุทธิ์

นอกจากนี้ข้อที่อาจนำมาพิจารณาอีกประการหนึ่งคือ ในการทดลองนี้ได้เตรียมกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่มีหมู่ไฮโดรโฟบิก side chain ซึ่งมีค่าไฮโดรโฟบิซิตีต่าง ๆ กันและนำค่าไฮโดรโฟบิซิตีของหมู่ side chainมาหาความสัมพันธ์กับ MIC และดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ความสัมพันธ์นี้อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจาก MIC และดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เป็นผลมาจากกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกทั้งโมเลกุล ไม่เฉพาะแต่หมู่ไฮโดรโฟบิกซึ่งเป็นเพียงบางส่วนในโครงสร้างของโมเลกุลของสารเท่านั้น ดังนั้น MIC และดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์น่าจะเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทั้งหมดของสารมากกว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเฉพาะที่หมู่ไฮโดรโฟบิก side chain

Bell และ Roblin (1942) ได้รายงานว่า pKa ของหมู่ซัลโฟนามิโดของเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีนมีค่าสูงซึ่งไม่สามารถหาได้ ดังนั้น pKa ของหมู่ซัลโฟนามิโดของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นในการทดลองนี้คาดว่าจะมีค่าสูงเช่นกัน เนื่องจากสารที่เตรียมขึ้นนี้เป็นอนุพันธ์ของเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน

Rastelli และคณะ (1975) ได้รายงานว่า ค่า S-O stretching vibration frequency ในอินฟราเรดสเปกตรัมของหมู่ซัลโฟนิลของ acidic, amidic และ imidic sulfonamides มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับส่วนกลับของ MIC สำหรับ *E. coli* ในส่วนความเข้มข้นที่เป็นประจุ โดยเมื่อ S-O stretching vibration frequency มีค่าต่ำลง ส่วนกลับของ MIC จะมีค่าเพิ่มขึ้น และ De Benedetti และ Rastelli (1981) ได้รายงานว่าค่า S-O stretching vibration frequency และ acidic, amidic และ imidic sulfonamides ซึ่งเป็นซัลโฟนาไมด์ชนิดเดียวกับที่ Rastelli และคณะ (1975) ได้ทำการทดลองมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับค่าลอการิทึมของส่วนกลับของดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* ในส่วนความเข้มข้นที่เป็นประจุของสารโดยเมื่อ S-O stretching vibration frequency มีค่าลดลง ค่าลอการิทึมของส่วนกลับของดัชนีการ

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น จากการทดลองนี้ไม่พบความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่าง S-O stretching vibration frequency กับ MIC หรือดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิก นั้นคืออนุพันธ์ของซัลฟานิลาไมด์คนละชนิดอาจจะให้ความสัมพันธ์ไม่เหมือนกัน นอกจากนั้นในการทดลองครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่าง proton chemical shift ในนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของหมู่ซัลโฟนามิโด และไม่พบความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่างค่า proton chemical shift ของแอลฟา-คาร์บอนของกรดอะมิโนของ side chain ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกกับ MIC และดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

จากผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรโฟบิซิตีของ side chain ซึ่งแสดงด้วย Δft และ π กับ MIC และดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* อาจแสดงว่าหมู่ไฮโดรโฟบิกและลักษณะโครงสร้างของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลองมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli*

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. กรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นในการทดลองมีสูตรโครงสร้างและสูตรโมเลกุลถูกต้อง

2. 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟตซึ่งเตรียมโดยวิธีของ Ho และคณะ (1974) สามารถทำให้บริสุทธิ์ขึ้นได้โดยการผ่านลงในคอลัมน์ของโดเวกซ์เอจี 1 x 8 แอนไอออนเอกซ์เชนก์เรซิน และมีค่า Rf เท่ากับ 0.38 เมื่อแยกโดยพีอีไอเซลลูโลส ทิน-แลเยอร์โครมาโตกราฟีซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ 1 โมล/ลิตร เป็นตัวพา

3. เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีนมีค่า MIC น้อยที่สุด และเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลามีนมีค่า MIC มากที่สุดสำหรับกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นในการทดลอง ความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของ MIC และค่า Δft หรือ π ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่ side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนเป็นแบบเส้นตรงโดยเมื่อค่า Δft หรือ π เพิ่มขึ้น ค่าลอการิทึม

ของ MIC จะลดลง แสดงว่าหมู่ไฮโดรโฟบิกของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดนี้อาจช่วยให้การยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีขึ้น

4. เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล) ไกลซีนมีดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* น้อยกว่ากรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นในการทดลองชนิดอื่น

5. ส่วนกลับของดัชนีการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทสจาก *E. coli* มีความสัมพันธ์กับค่า Δft หรือ π ของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ใช้ในการทดลองโดยเมื่อ Δft มีค่าตั้งแต่ 0-1800 คาลอรี/โมล หรือ π มีค่าตั้งแต่ 0-1.80 ส่วนกลับของดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะลดลงและเมื่อค่า Δft เพิ่มขึ้นจาก 1800-2500 คาลอรี/โมล หรือ π เพิ่มขึ้นจาก 1.80-2.63 ส่วนกลับของดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แสดงว่าชนิดของหมู่ไฮโดรโฟบิกทำให้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แตกต่างกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. จากผลการทดลองการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* พบว่ากรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนที่มีค่า Δft และ π ค่อนข้างสูงสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดี ดังนั้นในการเตรียมกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดีนั้น side chain ควรมีไฮโดรโฟบิซิตีสูง โดยอาจมีหมู่อัลคิลหลายหมู่ต่อกันเป็น chain

2. จากผลการทดลองการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* พบว่ากรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองที่มีค่า Δft และ π ต่ำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดี ดังนั้นในการเตรียมกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกชนิดที่มี side chain เป็นอะลิแฟติกไฮโดรคาร์บอนที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดี side chain ควรมีไฮโดรโฟบิซิตีต่ำ และวงอะโรแมติกที่มีค่า Δft สูงกว่า 1800 คาลอรี/โมล หรือค่า π สูงกว่า 1.80 อาจช่วยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีขึ้น