หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรลูเรีย (L-broth และ slant LB-agar) (Luria และคณะ, 1960)

เป็นอาหารเชื้ออุดมใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อเก็บเซลล์และเก็บรักษาเชื้อไว้สำหรับการทดลอง ในสารอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริปโตน (tryptone)	10 กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	10 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมล/ลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น (agar) 15 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton (Sauton medium) (Krüger-Theimer และคณะ, 1965)

ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของซัลโฟนาไมด์ ในสารอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอสปาราจีน (asparagine)	4.0 กรัม
กรดซิตริก (citric acid)	2.0 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogenphosphate)	0.5 กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟต. เฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate. heptahydrate)	0.5 กรัม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต 0.05 กรัม

(ferric ammonium citrate)

กลีเซอรีน (glycerine) 20 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 6.9 - 7.1 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 25 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที

3.2 การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารละลายที่ใช้ในการเตรียมกรดจำพวกพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิดอัลคาโนอิก (*p*-aminobenzenesulfonamidoalkanoic acids)

3.2.1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมล/ลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

3.2.1.2 สารละลายกรดเกลือ 6 โมล/ลิตร

เติมกรดเกลือเข้มข้น 485 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.2.1.3 สารละลายกรดเกลือ 4.9 โมล/ลิตร

เจือจางกรดเกลือ 6 โมล/ลิตร จำนวน 408 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

3.2.1.4 สารละลายกรดเกลือ 1.8 โมล/ลิตร

เจือจางกรดเกลือ 6 โมล/ลิตร จำนวน 150 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

3.2.1.5 เอทิลแอลกอฮอล์ 60 เปอร์เซ็นต์

เจือจางเอทิลแอลกอฮอล์ชนิดสัมบูรณ์ (absolute ethanol) จำนวน 60 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.2 สารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (Smalley, 1949)

3.2.2.1 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 0.9 โมล/ลิตร

ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 14.71 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.2.2 สารละลายโซเดียมไนไตรต์ 0.014 โมล/ลิตร

ละลายโซเดียมไนไตรต์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เตรียมในแต่ละวันที่ทำการทดลอง

3.2.2.3 สารละลายแอมโมเนียมซัลฟาเมต 0.044 โมล/ลิตร

ละลายแอมโมเนียมซัลฟาเมต 0.50 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.2.4 สารละลาย N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride 3.87×10^{-3} โมล/ลิตร

ละลาย N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride 30 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 30 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลและเก็บไว้ในตู้เย็น

3.2.2.5 สารละลายมาตรฐานกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 7.29×10^{-3} โมล/ลิตร

ละลายกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 100 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.3 สารละลายที่ใช้ในการนับจำนวนแบคทีเรีย

3.2.3.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.4 สารละลายที่ใช้ในการเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต

3.2.4.1 แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 3 โมล/ลิตร

เจือจางแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 32 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 111 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

3.2.4.2 สารละลายลิเทียมคลอไรด์ 0.4, 0.3, 0.25, 0.20, 0.15, 0.1, 0.05 โมล/ลิตร

ละลายลิเทียมคลอไรด์ 16.96 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ได้ความเข้มข้นเป็น 0.4 โมล/ลิตร เจือจางสารละลายลิเทียมคลอไรด์ 0.4 โมล/ลิตร จำนวน 225, 187.5, 150, 112.5, 75, และ 37.5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 300 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของสารละลายลิเทียมคลอไรด์เป็น 0.3, 0.25, 0.20, 0.10 และ 0.05 โมล/ลิตร ตามลำดับ

3.2.4.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 โมล/ลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 116.88 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.2.4.4 สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 0.1 โมล/ลิตร

ละลายซิลเวอร์ไนเตรต 0.85 กรัมในน้ำ ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

3.2.4.5 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 1 โมล/ลิตร

เจือจาง 2-เมอร์แคปโตเอทานอลจำนวน 17.4 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร

3.2.5 สารละลายที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส (Foye และคณะ, 1982)

3.2.5.1 ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมล/ลิตร pH 8.0

ละลายทริส-ไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน 6.08 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.2.5.2 ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5

ละลายทริส-ไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน 24.23 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.2.5.3 แมกเนเซียมคลอไรด์ 31.25 x 10^{-3} โมล/ลิตร ในทริส-ไฮโดร-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5

ละลายแมกเนเซียมคลอไรด์.เฮกซะไฮเดรต 1.27 กรัมด้วยทริส-ไฮโดรคลอไรด์บับเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร

3.2.5.4 โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล/ลิตร pH 7.0

ละลายโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 6.64 กรัม และโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.42 กรัมในน้ำกลั่นปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.2.5.5 Scintillation fluid

นำแนปทาลีน (naphthalene) 150 กรัม, PPO 8 กรัม, dimethyl POPOP 0.6 กรัม, เอทอกซีเอทานอล (ethoxyethanol) 100 มิลลิลิตร, เอทิลลีนไกลคอล (ethyleneglycol) 20 มิลลิลิตร มาละลายในโทลูอีน (toluene) ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3.2.6 สารละลายที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry และคณะ, 1951)

3.2.6.1 สารละลาย A

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมล/ลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.6.2 สารละลาย B

ละลายคิวปริกซัลเฟต.เพนตะไฮเดรต 1 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร และละลายโซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต 2 กรัมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในแต่ละวันที่ทำการทดลอง

3.2.6.3 สารละลาย C

ผสมสารละลาย A และ สารละลาย B ในอัตราส่วน 50 ต่อ 1 ในแต่ละวันที่ทำการทดลอง

3.2.6.4 สารละลาย D

เจือจางสารละลายฟีนอล (Folin-Ciocalteau) 2 โมล/ลิตร ด้วยน้ำกลั่น 1 เท่าตัว

3.2.6.5 โปรตีนมาตรฐาน (1 มิลลิกรัม/1 มิลลิลิตร) ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมล/ลิตร pH 8.0

ละลาย bovine serum albumin (เกรด A) 100 มิลลิกรัมในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมล/ลิตร pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.6.6 โปรตีนมาตรฐาน (1 มิลลิกรัม/1 มิลลิลิตร) ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5

ละลาย bovine serum albumin (เกรด A) 100 มิลลิกรัมในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.3 การเตรียมกรดจำพวกพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิก (*p*-aminobenzene sulfonamidoalkanoic acids)

3.3.1 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน [N-(*p*-amino benzenesulfonyl)glycine] (Kolloff, 1938)

การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน มี 2 ขั้นตอนดังนี้คือ

3.3.1.1 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน [N-(*p*-acetaminobenzenesulfonyl)glycine]

นำไกลซีน 15.0 กรัม (0.2 โมล) มาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร จำนวน 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมพารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ (*p*-acetaminobenzenesulfonyl chloride) 46.7 กรัม (0.2 โมล) และคนสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วกรอง pH ของสารละลายที่กรองได้มีค่าเท่ากับ 5.2 เติมกรดเกลือเจือจางลงในสารละลายจนกระทั่ง pH ของสารละลายที่มีค่าเท่ากับ 2.0 และพบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนที่ได้มาตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์ 60 เปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่าได้ผลึกสีขาวหนัก 37.52 กรัม (68.95 % yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 237-238 องศาเซลเซียส (เอกสารอ้างอิงของ Kolloff, 1938; Bauer, 1939 รายงานว่าสารนี้มีจุดหลอมเหลวที่ 237-238 องศาเซลเซียส)

3.3.1.2 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน

นำเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน 37.0 กรัม (0.136 โมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 200 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 4.9 โมล/ลิตร จำนวน 65 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ (reflux)นาน 40 นาที จากนั้นนำไประเหยภายใต้บรรยากาศต่ำ (reduced pressure)ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 40 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายนี้แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนมาละลายในน้ำแล้วปรับ pH ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอน (18.3 กรัม) มาละลายในน้ำร้อน โดยให้ปริมาตรของน้ำน้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนทั้งหมดได้ แล้วเติมผงถ่านที่ถูกแอคติเวตแล้ว (activated chacoal) ประมาณ 0.18 กรัม ต้มให้เดือดนานประมาณ 5 นาที จากนั้นกรองในขณะที่สารละลายยังร้อน เมื่อสารละลายเย็นจะได้ผลึกสีขาวหนัก 15.45 กรัม (49.37% yield) ผลึกนี้มีจุดหลอมเหลวที่ 149-150 องศาเซลเซียส (เอกสารอ้างอิงของ Kolloff, 1938; Mazza และ Migliarde, 1938 รายงานว่าสารนี้มีจุดหลอมเหลวที่ 150-151 องศาเซลเซียส)

3.3.2 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน [N-(*p*-amino benezenesulfonyl)alanine](ดัดแปลงวิธีการจาก Archer และคณะ, 1951)

การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน มี 2 ขั้นตอนดังนี้คือ

3.3.2.1 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน [N-(*p*-acetaminobenzenesulfonyl)alanine]

นำแอล-อะลานีน 8.9 กรัม (0.1 โมล) มาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วเติมพารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ 23.4 กรัม (0.1 โมล) อย่างช้า ๆ ทีละน้อย และคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วกรอง pH ของสารละลายที่กรองได้มีค่าเท่ากับ 5.4 เติมด้วยกรดเกลือเจือจางลงในสารละลายจนกระทั่งสารละลายมี pH เท่ากับ 2.0 และพบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนมาตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจาง ปรากฏว่าได้ผลึกสีขาวหนัก 14.2 กรัม (49.88% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 191-192 องศาเซลเซียส

3.3.2.2 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน

นำเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน 14.0 กรัม (0.049 โมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 200 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 1.8 โมล/ลิตร จำนวน 60 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์นาน 40 นาที จากนั้นนำไประเหยภายใต้บรรยากาศต่ำที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 45 มิลลิลิตร หลังจากนำสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอนมาละลายในน้ำ แล้วปรับให้ pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอน (10.5 กรัม) มาละลายในน้ำร้อน โดยให้ปริมาตรของน้ำน้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนทั้งหมดได้แล้ว เติมผงถ่านที่ถูกแอคติเวตแล้วประมาณ 0.1 กรัม ต้มให้เดือดนานประมาณ 5 นาที จากนั้นกรองในขณะที่สารละลายยังร้อน เมื่อสารละลายเย็นจะได้ผลึกสีขาวหนัก 6.61 กรัม (55.26% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 162-163 องศาเซลเซียส

3.3.3 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน

[N-(*p*-aminobenzenesulfonyl)methionine]

(ดัดแปลงวิธีการจาก Archer และคณะ, 1951; Giannini และคณะ, 1956)

การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน มี 2 ขั้นตอนดังนี้คือ

3.3.3.1 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน

[N-(*p*-acetaminobenzenesulfonyl)methionine]

นำแอล-เมไทโอนีน 14.9 กรัม (0.1 โมล) มาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร เติมพารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ 23.4 กรัม (0.1 โมล) อย่างช้า ๆ ทีละน้อยและคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วกรอง pH ของสารละลายที่กรองได้มีค่าเท่ากับ 5.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตรลงในสารละลาย แล้วปรับ pH ของสารละลายด้วยกรดเกลือเจือจางจนสารละลายมี pH เท่ากับ 2.0 จากนั้นนำสารละลายไปคนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนมาตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจาง ปรากฏว่าได้ผลึกสีขาวหนัก 17.94 กรัม (51.82% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 171-172 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน

นำเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน 17.0 กรัม (0.049 โมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 200 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 6 โมล/ลิตร จำนวน 150 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไประเหยภายใต้บรรยากาศต่ำที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 100 มิลลิลิตร หลังจากนำสารละลายนี้แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอนมาละลายในน้ำแล้วปรับให้ pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางพบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอน (12.2 กรัม) มาละลายในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจางที่ร้อน โดยให้ปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์น้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนทั้งหมดได้ แล้วเติมผงถ่านที่ถูกแอคติเวตแล้วประมาณ 0.12 กรัม ต้มให้เดือดประมาณ 5 นาที จากนั้นกรองในขณะที่สารละลายยังร้อน เมื่อสารละลายเย็นนำสารละลายไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน จะได้ผลึกสีขาวหนัก 9.22 กรัม (61.86% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 146-147 องศาเซลเซียส

3.3.4 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน [N-(*p*-aminobenzenesulfonyl)valine] (Archer และคณะ, 1951)

การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน มี 2 ขั้นตอนดังนี้คือ

3.3.4.1 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน [N-(*p*-aminobenzenesulfonyl)valine]

นำแอล-วาลีน 11.7 กรัม (0.1 โมล) มาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วเติมพารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ 23.4 กรัม (0.1 โมล) อย่างช้า ๆ ทีละน้อย และคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วกรอง pH ของสารละลายที่กรองได้มีค่าเท่ากับ 5.9 เติมกรดเกลือเจือจางลงในสารละลายจนกระทั่ง pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 2.0 และพบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนที่ได้มาตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจาง ปรากฏว่าได้ผลึกสีขาวหนัก 22.15 กรัม (70.52% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 235-238 องศาเซลเซียส

3.3.4.2 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน

นำเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน 16.0 กรัม (0.051 โมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 200 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 1.8 โมล/ลิตร จำนวน 65 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์นาน 40 นาที จากนั้นนำไประเหยภายใต้บรรยากาศต่ำที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 30 มิลลิลิตร หลังจากนำสารละลายนี้แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอนมาละลายในน้ำแล้วปรับให้ pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอน (12.2 กรัม) มาละลายในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจางที่ร้อน โดยให้ปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์น้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนทั้งหมดได้ แล้วเติมผงถ่านที่ถูกแอคติเวตแล้วประมาณ 0.12 กรัม ต้มให้เดือดนานประมาณ 5 นาที จากนั้นกรองในขณะที่สารละลายยังร้อน เมื่อสารละลายเย็นจะได้ผลึกสีขาวหนัก 10.1 กรัม (73.36% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 177-178 องศาเซลเซียส

3.3.5 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน [N-(*p*-aminobenzenesulfonyl)leucine] (Archer และคณะ, 1951)

การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน มี 2 ขั้นตอนคือ

3.3.5.1 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน [N-(*p*-acetaminobenzenesulfonyl)leucine]

นำแอล-ลูซีน 13.1 กรัม (0.1 โมล) มาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วเติมพารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ 23.4 กรัม (0.1 โมล) อย่างช้า ๆ ทีละน้อย และคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วกรอง pH ของสารละลายที่กรองได้มีค่าเท่ากับ 8.5 เติมกรดเกลือเจือจางลงในสารละลายจนกระทั่ง pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 2.0 และพบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนที่ได้มาตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจาง ปรากฏว่าได้ผลึกสีขาวหนัก 17.2 กรัม (52.61% yield) และผลึกที่มีจุดหลอมเหลวที่ 226-227 องศาเซลเซียส

3.3.5.2 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน

นำเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน 17.0 กรัม (0.052 โมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 200 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 1.8 โมล/ลิตร จำนวน 60 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์นาน 40 นาที จากนั้นนำไประเหยภายใต้บรรยากาศต่ำที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 35 มิลลิลิตร หลังจากนำสารละลายนี้แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอนมาละลายในน้ำแล้วปรับให้ pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้นกรองแล้วนำตะกอน (14.2 กรัม)มาละลายในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจางที่ร้อนโดยให้ปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์น้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนทั้งหมดให้แล้วเติมผงถ่านที่ถูกแอคติเวตแล้วประมาณ 0.14 กรัม ต้มให้เดือดนานประมาณ 5 นาที จากนั้นกรองในขณะที่สารละลายยังร้อน เมื่อสารละลายเย็นจะได้ผลึกสีขาวหนัก 12.62 กรัม (79.81% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 190-191 องศาเซลเซียส

3.3.6 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน

[N-(*p*-aminobenzenesulfonyl)tyrosine]

(ดัดแปลงวิธีการจาก Archer และคณะ, 1951; Giannini และคณะ, 1956)

การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน มี 2 ขั้นตอนดังนี้คือ

3.3.6.1 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน

[N-(*p*-acetaminobenzenesulfonyl)tyrosine]

นำแอล-ไทโรซีน 18.1 กรัม (0.1 โมล) มาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วเติมพารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ 23.4 กรัม (0.1 โมล) อย่างช้า ๆ ทีละน้อย และคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในสารละลายประมาณ 140 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนของเกลือของผลิตภัณฑ์และกรองสารละลาย พบว่า pH ของสารละลายที่กรองได้มีค่าเท่ากับ 9.7 เติมกรดเกลือเจือจางลงในสารละลายจนกระทั่ง pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 2.0 จากนั้นนำสารละลายไปคนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนมาตกผลึกในเอทิลแอกอฮอล์เจือจาง ปรากฏว่าได้ผลึกสีขาวหนัก 12.55 กรัม (33.17% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 247-248 องศาเซลเซียส

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.6.2 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน

นำเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน 12.0 กรัม (0.032 โมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 200 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 6 โมล/ลิตร จำนวน 50 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไประเหยภายใต้บรรยากาศต่ำที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 30 มิลลิลิตร หลังจากนำสารละลายนี้แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอนมาละลายในน้ำแล้วปรับให้ pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอน (7.1 กรัม) มาละลายในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจางที่ร้อน โดยให้ปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์น้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนทั้งหมดได้ แล้วเติมด้วยผงถ่านที่ถูกแอคติเวตแล้วประมาณ 0.07 กรัม ต้มให้เดือดนานประมาณ 5 นาที จากนั้นกรองในขณะที่สารละลายยังร้อน เมื่อสารละลายเย็นนำสารละลายไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค้างคืน จะได้ผลึกสีขาวหนัก 4.47 กรัม (41.54% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 200-201 องศาเซลเซียส

3.3.7 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีน [N-(*p*-aminobenzenesulfonyl)phenylalanine] (Archer และคณะ, 1951)

การเตรียมเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีน มี 2 ขั้นตอนดังนี้คือ

3.3.7.1 การเตรียมเอ็น-(พารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีน [N-(*p*-aminobenzenesulfonyl)phenylalanine]

นำแอล-เฟนิลอะลานีน 16.0 กรัม (0.1 โมล) มาละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วเติมพารา-อะเซตามิโนเบนซีนซัลโฟนิลคลอไรด์ 23.4 กรัม (0.1โมล) อย่างช้า ๆ ทีละน้อย และคนสารละลายที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงในสารละลายประมาณ 140 มิลลิลิตร เพื่อละลายเกลือของผลิตภัณฑ์ และกรองสารละลายพบว่า pH ของสารละลายที่กรองได้มีค่าเท่ากับ 8.0 เติมกรดเกลือเจือจางลงในสารละลายจนกระทั่ง pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 2.0 พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น นำตะกอนมาตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจาง ปรากฏว่าได้ผลึกสีขาวหนัก 19.5 กรัม (54.02% yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 208-209 องศาเซลเซียส

3.3.7.2 การเตรียม เอ็น-(พารา-อะมิโน เบนซีนซัลโฟนิล) เฟนิลอะลานีน

นำ เอ็น-(พารา-อะเซตามิโน เบนซีนซัลโฟนิล) เฟนิลอะลานิน 19.0 กรัม (0.052 โมล) ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 200 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 1.8 โมล/ลิตร จำนวน 65 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์นาน 40 นาที จากนั้นนำไประเหยภายใต้บรรยากาศต่ำที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จนปริมาตรเหลือประมาณ 45 มิลลิลิตร หลังจากนำสารละลายนี้แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอนมาละลายน้ำแล้วปรับให้ pH ของสารละลายมีค่าเท่ากับ 3.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางพบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองแล้วนำตะกอน (14.7 กรัม) มาละลายในเอทิล-แอลกอฮอล์เจือจางที่ร้อนโดยให้ปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์น้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนทั้งหมดได้ แล้วเติมผงถ่านที่ถูกแอคติเวตแล้วประมาณ 0.15 กรัม ต้มให้เดือดนานประมาณ 5 นาที แล้วกรองในขณะที่สารละลายยังร้อน เมื่อสารละลายเย็นจะได้ผลึกสีขาวหนัก 12.52 กรัม (75.22 % yield) และผลึกมีจุดหลอมเหลวที่ 187-188 องศาเซลเซียส

3.4 การวิเคราะห์เพื่อหาสูตรโครงสร้างของกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิก

ส่งกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่เตรียมขึ้นไปตรวจวิเคราะห์เพื่อหาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และส่งสารที่เตรียมขึ้นนี้ไปตรวจวิเคราะห์ธาตุที่ Australian Microanalytical Service ประเทศออสเตรเลีย

3.5 การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไฮไดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต (2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7, 8-dihydropteridine pyrophosphate; DHPP)

3.5.1 การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีน (Forrest และ Walker, 1949)

นำไดไฮดรอกซีอะซีโตน 17.5 กรัม (0.19 โมล) มาละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรของสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วยไฮดราซีนไฮเดรต 9.8 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายนี้ลงในสารละลายผสมที่มี 2,4,5-ไตรอะมิโน-6-ไฮดรอกซีไพริมิดีนซัลเฟต 25.5 กรัม (0.11 โมล), โซเดียมอะซิเตต 15.5 กรัม และกรดโบริก 12 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำสารละลายผสมนี้ไปรีฟลักซ์ (reflux) ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง กรองตะกอนที่ได้ด้วยซินเทอร์กลาสฟันเนล (sintered glass funnel) แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่เย็น 300 มิลลิลิตร, เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 200 มิลลิลิตร, เอทิลแอลกอฮอล์ต่อไดเอทิลอีเทอร์ (1 ต่อ 1 โดยปริมาตร) 200 มิลลิลิตร และ ไดเอทิลอีเทอร์ 100 มิลลิลิตร ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีเหลืองหนัก 9.03 กรัม (42.53% yield) มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ทำได้โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ โดยการหยด (spot) สารละลายของผลิตภัณฑ์ ซึ่งละลายอยู่ในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3 โมล/ลิตร ลงบนว็อตแมนโครมาโตกราฟิกเปเปอร์ 3 เอ็มเอ็ม (Whatman Chromatographic Paper 3 MM) และใช้น้ำกลั่นเป็นตัวพา (developing solvent) พบว่าสารนี้จะให้จุดเรืองแสง 1 จุด ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตบนโครมาโตแกรมมีค่า Rf เท่ากับ 0.53

3.5.2 <u>การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต</u> (Ho และคณะ, 1974)

นำกรดไพโรฟอสฟอริก 200 กรัม (1.12 โมล) มาทำให้ละลายอย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส ในขวดแก้วที่มีจุกปิด (glass-stopped flask) เติม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีน (จากข้อ 3.5.1) 8 กรัม (0.04 โมล) ลงไปอย่างช้า ๆ และคนสารละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเติมด้วยผงถ่านที่ถูกแอคติเวตแล้วจำนวน 5 กรัมในน้ำ 600 มิลลิลิตร คนส่วนผสมนี้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วกรองผงถ่านด้วยซินเทอร์กลาสฟันเนล ล้างผงถ่านด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เพื่อขจัดกรดไพโรฟอสฟอริกที่เหลืออยู่ออก จากนั้นชะ (elute) 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟตที่ติดอยู่กับผงถ่านด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3 โมล/ลิตร ที่เย็นครั้งละ 20 มิลลิลิตร 8 ครั้ง นำสารละลายนี้ไปตรวจสอบ

ความบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษโดยใช้น้ำเป็นตัวพา พบว่าสารนี้แสดงจุดเพียงจุดเดียวบนโครมาโตแกรม มีค่า Rf เท่ากับ 0.94 นำสารละลายแต่ละส่วนไปทำให้แห้งโดยการไลโอฟิไลซ์ (lyophilize) ได้ผลิตภัณฑ์หนัก 3.73 กรัม (26.42 % yield)

แม้ว่าผลิตภัณฑ์นี้แสดงเพียง 1 จุดบนโครมาโตแกรมโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ แต่ก็พบว่ายังคงมีสารอื่นเจือปน (impurities) อยู่ จากการตรวจสอบโดยพีอีไอเซลลูโลสทิน-แลเยอร์โครมาโตกราฟี (PEI cellulose thin-layer chromatography)

3.5.3 พีอีไอเซลลูโลสทิน-แลเยอร์โครมาโตกราฟี

แช่แผ่นพีอีไอเซลลูโลสลงในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นานประมาณ 30 นาที จากนั้นนำแผ่นพีอีไอเซลลูโลสมาทำให้แห้งโดยวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน ล้างแผ่นพีอีไอเซลลูโลสเพื่อขจัดโซเดียมคลอไรด์ที่เหลืออยู่ โดยแช่น้ำในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตรนาน 5-10 นาที แล้วทำให้แผ่นพีอีไอเซลลูโลสแห้งโดยวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน

นำ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต (ข้อ 3.5.2) จำนวนเล็กน้อยมาละลายในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร นำมาหยดลงบนแผ่นพีอีไอเซลลูโลส แล้วแยกโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมล/ลิตร เป็นตัวพา พบว่าสารนี้แสดงจุดเรืองแสง 3 จุดภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตมีค่า Rf เท่ากับ 0.38, 0.53 และ 0.63

3.5.4 การแยก 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต โดยโดเวกซ์เอจี 1 x 8 แอนไอออนเอกซ์เชนก์เรซิน (Dowex AG 1 x 8 Anion-Exchange Resin)

นำโดเวกซ์เอจี 1 x 8 แอนไอออนเอกซ์เชนก์เรซิน 75 กรัมแช่ในน้ำกลั่นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เทน้ำและเรซินขนาดเล็กออก เติมน้ำและล้างซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นกรองเรซินด้วยซินเทอร์กลาสฟันเนล นำเรซินมาล้างด้วยสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร จำนวน 1 ลิตร แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำที่ล้างเรซินมี pH เป็นกลาง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนั้นล้างเรซินด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งน้ำที่ล้างเรซินมี pH เป็นกลาง ล้างด้วยสารละลายกรดและด่างนี้ซ้ำ 5 ครั้ง แล้วนำมาล้างในสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร จำนวน 1 ลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งหนึ่ง นำเรซินมาแช่ในน้ำกลั่น และบรรจุเรซินลงในหลอดแก้วตรงขนาด 1.4 x 30 เซนติเมตรให้ได้เรซินสูง 20.5 เซนติเมตร ชะด้วยน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตรเพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์ ปรับอัตราการไหลเป็น 1 มิลลิลิตรต่อ 1 นาที หลังจากนั้นละลาย 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต 850 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายนี้ลงบนคอลัมน์ ชะด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งสารละลายที่ถูกชะจากคอลัมน์นั้นมีความเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตน้อยที่สุด จากนั้นชะด้วยสารละลายลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 และ 0.40 โมล/ลิตร ตามลำดับโดยใช้ความเข้มข้นละประมาณ 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์หลอดละ 20 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) นำสารละลายในแต่ละหลอดไปหาค่า Rf โดยพีอีไอเซลลูโลสทิน-แลเยอร์โครมาโตกราฟีตามวิธีในข้อ 3.5.3 รวมสารละลายในหลอดที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.38 เพียงค่าเดียวนำไปทำให้แห้งโดยการไลโอฟิไลซ์ แล้วนำสารที่ได้มาล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์หลายครั้งเพื่อขจัดลิเทียมคลอไรด์ที่มีอยู่ให้หมด ซึ่งสามารถตรวจสอบปริมาณของคลอไรด์ไอออนในเอทิลแอลกอฮอล์ที่ล้างผลิตภัณฑ์นี้ด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต จากนั้นนำสารที่ได้บาตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์เจือจางจะได้ผลึกสีเหลืองหนัก 44.3 มิลลิกรัม (5.21% yield) มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส

3.5.5 <u>การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต</u> (ดัดแปลงจาก Friedkin และคณะ, 1962; Shiota และคณะ, 1969)

นำ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต (จากข้อ 3.5.4) 20 มิลลิกรัม, โซเดียมไดไทโอไนต์ 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำสารละลายไปผ่านด้วยก๊าซอาร์กอนนาน 10 นาที ปิดจุกของหลอดทดลองทันทีด้วยพารา

ฟิล์มตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนด้วยแรงเหวี่ยง 2,000 x g นาน 15 นาที แยกเอาส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.6 การวัดความเข้มข้นของ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีนไพโรฟอสเฟต (DHPP) (Shiota และคณะ, 1969)

ความเข้มข้นของ DHPP จากการเตรียมในข้อ 3.5.5 หาได้โดยการวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตร ในสารละลายที่มี pH 7.1 แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นจากสมการ

$$A = \varepsilon bc$$

เมื่อ A = ความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตร

= ค่า molar extinction coefficient ที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.2×10^3 (โมล/ลิตร)$^{-1}$ (เซนติเมตร)$^{-1}$

b = ระยะทางที่แสงผ่านสารละลาย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร

c = ความเข้มข้นของ DHPP (โมล/ลิตร)

3.6 การเก็บรักษาเชื้อ *E. coli* ที่ใช้สำหรับการทดลอง

3.6.1 การเก็บเชื้อสำหรับการทดลองระยะสั้น

เก็บเชื้อ *E. coli* บนอาหารแข็งเอียงแอลบี (slant LB-agar) ในหลอดทดลองขนาด 15 x 45 มิลลิลิตร ที่มีจุกเกลียวปิดและเคลือบทับด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อ (subculture) ลงในอาหารแข็งเอียงแอลบีใหม่ทุก 2 เดือน

3.6.2 การเก็บเชื้อสำหรับการทดลองระยะยาว

นำเชื้อ *E. coli* ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (L-broth) ในระยะ log ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีจุกเกลียวขนาด 15 x 45 มิลลิลิตร ซึ่งมีกลีเซอรีนปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.7 การศึกษาลักษณะการเจริญของ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เขี่ยเชื้อ *E. coli* ที่อยู่ในหลอดเก็บเชื้อ (ข้อ 3.6.1) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton (ข้อ 3.1.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดแก้วทรงกรวยใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตรทุก 2 ชั่วโมง

3.8 การนับจำนวน *E. coli*

นำ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton โดย shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-20 ชั่วโมง (ตามวิธีในข้อ 3.7) มาทำให้เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 จากนั้นเจือจางให้จำนวน *E. coli* ลดลงเป็นครั้งละ 1/10 เท่าจากเดิม 6 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำ suspension ของ *E. coli* ที่ถูกเจือจางครั้งที่ 5 และ 6 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี (LB agar plate) จากนั้นนำไปอินคิวเบตในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.9 การหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ของซัลฟานิลาไมด์และกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิก (minimum inhibitory concentration; MIC) (Krüger-Thiemer และคณะ, 1965)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton ที่มีซัลโฟนาไมด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในหลอดขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร โดยความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่ใช้มีดังนี้ ซัลฟานิลาไมด์ $8.37 \times 10^{-6} - 2.09 \times 10^{-5}$ โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน $2.77 \times 10^{-4} - 1.11 \times 10^{-3}$ โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน $8.21 \times 10^{-4} - 8.21 \times 10^{-3}$ โมล/ลิตร, เอ็น-พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน

$2.80 \times 10^{-2} - 1.26 \times 10^{-1}$ โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน $8.05 \times 10^{-3} - 2.42 \times 10^{-2}$ โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน $5.85 \times 10^{-3} - 1.46 \times 10^{-2}$ โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน $3.73 \times 10^{-3} - 9.33 \times 10^{-3}$ โมล/ลิตร, และเอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีน $7.90 \times 10^{-2} - 1.33 \times 10^{-1}$ โมล/ลิตร ปริมาตรสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซัลโฟนาไมด์ของแต่ละหลอดเท่ากับ 2.5 มิลลิลิตร เติม *E. coli* จำนวน 1.03×10^{5} เซลล์ในระยะ log ตอนปลาย ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด positive control เป็นหลอดที่ไม่มีซัลโฟนาไมด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและถูกเติมด้วยเซลล์ของ *E. coli* negative control เป็นหลอดที่ไม่มีซัลโฟนาไมด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และไม่ได้เติมเซลล์ของ *E. coli* นำหลอดทดลองไปอินคิวเบตในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาดูความขุ่นที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับcontrol ความเข้มข้นต่ำที่สุดของซัลโฟนาไมด์ในหลอดที่ไม่มีความขุ่นเกิดขึ้นคือ ความเข้มข้นต่ำที่สุดของซัลโฟนาไมด์ที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* (MIC) การทดลองทำซ้ำ 2 ครั้งสำหรับซัลโฟนาไมด์แต่ละความเข้มข้น

3.10 <u>การวัดปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก</u> (Smalley, 1949)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการจะหาปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 2.5 มิลลิลิตร มาเติมด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก 0.9 โมล/ลิตร ปรับให้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แยกตะกอนออกนำส่วนใสมาเติมด้วยโซเดียมไนไตรต์ 0.014 โมล/ลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเติมด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลฟาเมต 0.044 โมล/ลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วเติมด้วยสารละลาย N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (ข้อ 3.2.2.3) จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร และอ่านปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสารละลายกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกมาตรฐานที่มีปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกตั้งแต่ 0-18 ไมโครกรัม

3.11 การเลี้ยง *E. coli* เพื่อเก็บเซลล์ไว้สำหรับใช้ในการทดลอง

3.11.1 การเตรียมหัวเชื้อ (starter)

เขี่ยเชื้อ *E. coli* ที่อยู่ในหลอดเก็บเชื้อ (ข้อ 3.6.1) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ข้อ 3.1.1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียนี้มาเติมลงในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16-18 ชั่วโมง

3.11.2 การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (fermenter)

นำหัวเชื้อ (ข้อ 3.11.1) มาเติมลงในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม (ข้อ 3.1.1) จำนวน 4 ลิตร จากนั้นคนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยใบพัดที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที ความดันของอากาศที่ให้ 3.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อแบคทีเรียเจริญถึงระยะ log ตอนปลาย เก็บเซลล์โดยการปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 2,740 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.12 การสกัดไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส จาก *E. coli* (ดัดแปลงจาก Thijssen, 1974)

3.12.1 การทำลายผนังเซลล์ของ *E. coli*

นำเซลล์แช่แข็งของ *E. coli* หนักประมาณ 38.2 กรัมมาทำให้ละลายแล้วเติมทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมล/ลิตร pH 8.0 ที่เย็นจำนวน 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง 7,700 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลืออยู่ออก จากนั้นเติมทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมล/ลิตร pH 8.0 จำนวน 100 มิลลิลิตร นำสารละลายของเซลล์ไปทำลายผนังเซลล์ที่อุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) โดยเปิดให้เครื่องทำงาน 40% duty cycle นาน 4 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นแยกเศษของเซลล์ (cell debris) ด้วยแรงเหวี่ยง 30,900 x g นาน 1 ชั่วโมงที่

ที่อุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส แยกส่วนตะกอนทิ้งไปส่วนใส(supernatant) ที่ได้มีปริมาตร 120 มิลลิลิตร

3.12.2 <u>การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u>

นำส่วนใสจากข้อ 3.12.1 มาเติมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจนได้สารละลายอิ่มตัว 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 0-2 องศาเซลเซียส นำไปปั่นด้วยแรงเหวี่ยง30,900 x g นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจนได้สารละลายอิ่มตัว 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นแยกตะกอนโปรตีนด้วยแรงเหวี่ยง30,900 x g นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5 จำนวน 40 มิลลิลิตร นำสารละลายมาไดอะไลซ์ (dialyze) ในบัฟเฟอร์เดียวกัน จำนวน 4 ลิตร นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายมาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 13 x 75 มิลลิเมตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสซึ่งสามารถเก็บได้นานอย่างน้อย 4 เดือนโดยกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลง

3.13 <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u> (Lowry และคณะ, 1951)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย (ข้อ 3.2.6.3) 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย D (ข้อ 3.2.6.4) 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร อ่านปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัม

3.14 <u>การวัดกิจกรรมของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส</u> (Foye และคณะ, 1982)

สารละลายของปฏิกิริยา 200 ไมโครลิตรประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.17 โมล/ลิตร pH 8.5, DHPP 1.5×10^{-4} โมล/ลิตร, คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 6.47×10^{-5} โมล/ลิตร, แมกเนเซียมคลอไรด์ 5×10^{-3} โมล/ลิตร, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.15 โมล/ลิตร, โซเดียมไดไทโอไนต์ 1.71×10^{-3} โมล/ลิตร และสาร

ละลายสกัดของเอนไซม์ อินคิวเบตสารละลายของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติมสารละลายสกัดของเอนไซม์ แล้วอินคิวเบตนาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร สารละลายของปฏิกิริยาที่เป็น blank ประกอบด้วยสารดังกล่าวข้างต้น ยกเว้น สารละลายสกัดของเอนไซม์ นำเอาสารละลายของปฏิกิริยาจำนวน 100 ไมโครลิตรมาหยดลงบนว็อตแมนโครมาโตกราฟิกเปเปอร์ 3 เอ็มเอ็ม (23.25 x 28.50 เซนติเมตร) เพื่อทำการแยกไดไฮโดรพเทอโรเอตที่เกิดขึ้นในสารละลายของปฏิกิริยาด้วยโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ โดยใช้โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล/ลิตร pH 7.0 เป็นตัวพาแบบไหลลง (descending) หลังจากที่บัฟเฟอร์เคลื่อนผ่านจุดตั้งต้นได้ระยะทาง 15 เซนติเมตร นำกระดาษนี้มาทำให้แห้ง ตัดบริเวณที่เป็นจุดตั้งต้น (2 x 2 ตารางเซนติเมตร) ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงใน scintillation vial เติม scintillation fluid ลงไปจำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสีด้วย liquid scintillation counter

หน่วยของเอนไซม์คำนวณจากปริมาณไดไฮโดรพเทอโรเอตที่เกิดขึ้น โดยคิดจากกิจกรรมจำเพาะของคาร์บอน -14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12,870 dpm/นาโนโมล กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับ ไดไฮโดรพเทอโรเอตที่เกิดขึ้น 1 นาโนโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะการทดลอง และ 1 หน่วยของกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) เท่ากับ 1 หน่วยของเอนไซม์ ต่อ 1 มิลลิกรัมโปรตีน

3.15 <u>การหาปริมาณเอนไซม์และเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา</u>

สารละลายของปฏิกิริยา 200 ไมโครลิตรประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ 0.17 โมล/ลิตร pH 8.5, DHPP 2.25×10^{-3} โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 1.29×10^{-4} โมล/ลิตร, แมกเนเซียมคลอไรด์ 5×10^{-3} โมล/ลิตร, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.15 โมล/ลิตร, โซเดียมไดไทโอไนต์ 2.74×10^{-2} โมล/ลิตร และสารละลายสกัดของเอนไซม์จาก *E. coli* ที่มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.44 - 1.52 มิลลิกรัม อินคิวเบตสารละลายของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ก่อนเติมสารละลายสกัดของเอนไซม์ แล้วอินคิวเบตเป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 5-20 นาที ในแต่ละสารละลายของปฏิกิริยาที่มีสารละลายสกัดของเอ็นไซม์ที่มีปริมาณโปรตีนจำนวนต่าง ๆ กัน หยุดปฏิกิริยาด้วย

2-เมอร์แคปโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.14

3.16 การหาค่า K_m โดยประมาณของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก

สารละลายของปฏิกิริยาจำนวน 200 ไมโครลิตรประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ 0.17 โมล/ลิตร pH 8.5, DHPP 1.06×10^{-3} โมล/ลิตร, 2-เมอร์แคปโต-เอทานอล 0.15 โมล/ลิตร, โซเดียมไดไทโอไนต์ 1.27×10^{-2} โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา อะมิโนเบนโซอิก 2.16×10^{-7} - 1.94×10^{-5} โมล/ลิตร และสารละลายสกัดของเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 0.87 มิลลิกรัม อินคิวเบตสารละลายของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติมสารละลายสกัดของเอนไซม์ แล้วอินคิวเบตนาน 3 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.14

3.17 การหาความเข้มข้นของซัลฟานิลาไมด์และกรดพารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนามิโดอัลคาโนอิกที่ยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอต ซินเทส 50 เปอร์เซ็นต์ (concentration required for 50 % inhibition; I_{50}) (Foye และคณะ, 1982)

3.17.1 การหาค่า I_{50} เมื่อความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก เท่ากับ 2.16×10^{-5} โมล/ลิตร

สารละลายของปฏิกิริยาจำนวน 200 ไมโครลิตรประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ 0.17 โมล/ลิตร pH 8.5, DHPP 2.25×10^{-5} โมล/ลิตร, คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 2.16×10^{-5} โมล/ลิตร, แมกเนเซียมคลอไรด์ 5×10^{-3} โมล/ลิตร, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.15 โมล/ลิตร, โซเดียมไดไทโอไนต์ 1.27×10^{-2} โมล/ลิตร, สารละลายสกัดของเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 0.87 มิลลิกรัม และซัลโฟนาไมด์ ความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่ใช้มีดังนี้ ซัลฟานิลาไมด์ 0-8.80×10^{-4} โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน 0-6.00×10^{-4} โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล) อะลานีน 0-2.00×10^{-3} โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน 0-6.40×10^{-3} โมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน 0-1.2×10^{-2}

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน 0-7.20 x 10^{-3} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน 0-1.92 x 10^{-3} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีน 0-4.40 x 10^{-3} ไมล/ลิตร อินคิวเบตสารละลายของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ก่อนเติมสารละลายสกัดของเอนไซม์แล้ว อินคิวเบตนาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.14 การทดลองทำซ้ำ 2 ครั้ง สำหรับซัลโฟนาไมด์แต่ละความเข้มข้น

3.17.2 <u>การหาค่า I_{50} เมื่อความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก เท่ากับ 1.29 x 10^{-4} ไมล/ลิตร</u>

สารละลายของปฏิกิริยาจำนวน 200 ไมโครลิตรประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.17 ไมล/ลิตร pH 8.5, DHPP 2.25 x 10^{-3} ไมล/ลิตร, คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 1.29 x 10^{-4} ไมล/ลิตร, แมกเนเซียมคลอไรด์ 5 x 10^{-3} ไมล/ลิตร 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.15 ไมล/ลิตร, โซเดียมไดไทโอไนต์ 2.74 x 10^{-2} ไมล/ลิตร, สารละลายสกัดของเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 1.31 มิลลิกรัม และซัลโฟนาไมด์ ความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่ใช้มีดังนี้ ซัลฟานิลาไมด์ 0-3.85 x 10^{-3} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไกลซีน 0-5.04 x 10^{-3} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)อะลานีน 0-1.37 x 10^{-2} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เมไทโอนีน 0-1.62 x 10^{-2} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)วาลีน 0-5.28 x 10^{-2} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ลูซีน 0-4.06 x 10^{-2} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)ไทโรซีน 0-1.25 x 10^{-2} ไมล/ลิตร, เอ็น-(พารา-อะมิโนเบนซีนซัลโฟนิล)เฟนิลอะลานีน 0-1.55 x 10^{-2} ไมล/ลิตร อินคิวเบตสารละลายของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 10 นาทีก่อนเติมสารละลายสกัดของเอนไซม์แล้วอินคิวเบตนาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.14 การทดลองทำซ้ำ 2 ครั้งสำหรับซัลโฟนาไมด์แต่ละความเข้มข้น

การหาค่า I_{50} หาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{v_o}{v_i}$ และความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์เมื่อ v_o คือความเร็วของการปฏิกิริยาเมื่อไม่มีซัลโฟนาไมด์ และ v_i คือความเร็วของการปฏิกิริยาเมื่อมีซัลโฟนาไมด์ และ I_{50} คือความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์เมื่อ $\frac{v_o}{v_i}$ เท่ากับ 2 และดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ $\left(\frac{[I_{50}]}{[S]}\right)_a$ เท่ากับอัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวยับยั้งและซับสเตรตที่ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Baker (1967) ได้แสดงความสัมพันธ์ของสมการเมื่อ $\frac{v_o}{v_i}$ เท่ากับ 2 ตามแสดงในภาคผนวก

การหาค่า I_{50} อาจหาได้อีกวิธีหนึ่งจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (% Inhibition) และค่าลอการิทึม (logarithm) ของความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ โดย

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A = dpm ของไดไฮโดรฟเทอโรเอตที่ติดฉลากด้วยคาร์บอน-14 เมื่อไม่มีซัลโฟนาไมด์

B = dpm ของไดไฮโดรฟเทอโรเอตที่ติดฉลากด้วยคาร์บอน-14 เมื่อมีซัลโฟนาไมด์

ค่า I_{50} คือความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50 % Inhibition) และดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ $\left(\frac{[I_{50}]}{[S]}\right)_b$ คืออัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวยับยั้งและซับสเตรตที่ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์