

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกราเอนโคไฟต์จากใบกวาวเครือขาว

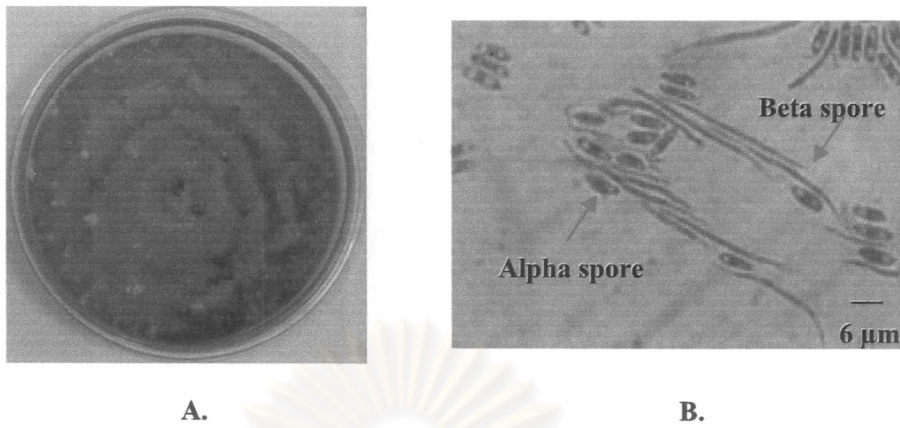
แยกราเอนโคไฟต์จากใบกวาวเครือขาวที่แข็งแรง ไม่เป็นโรค จากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย 4 แห่ง คือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย-กรุงเทพมหานคร อำเภอมือง-จังหวัดลพบุรี จังหวัดตาก และจังหวัดเชียงราย ในช่วงเดือนมกราคม-มิถุนายน ปี พ.ศ. 2547 แยกราเอนโคไฟต์ได้ทั้งหมด 43 ชนิด แสดงในตารางที่ 4.1 ราเอนโคไฟต์ที่แยกได้นำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA และ MEA เก็บไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป ลักษณะต่างๆของราเอนโคไฟต์ทั้ง 43 ชนิด แสดงในภาคผนวก ข

ตารางที่ 4.1 จำนวนราเอนโคไฟต์ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาว จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย

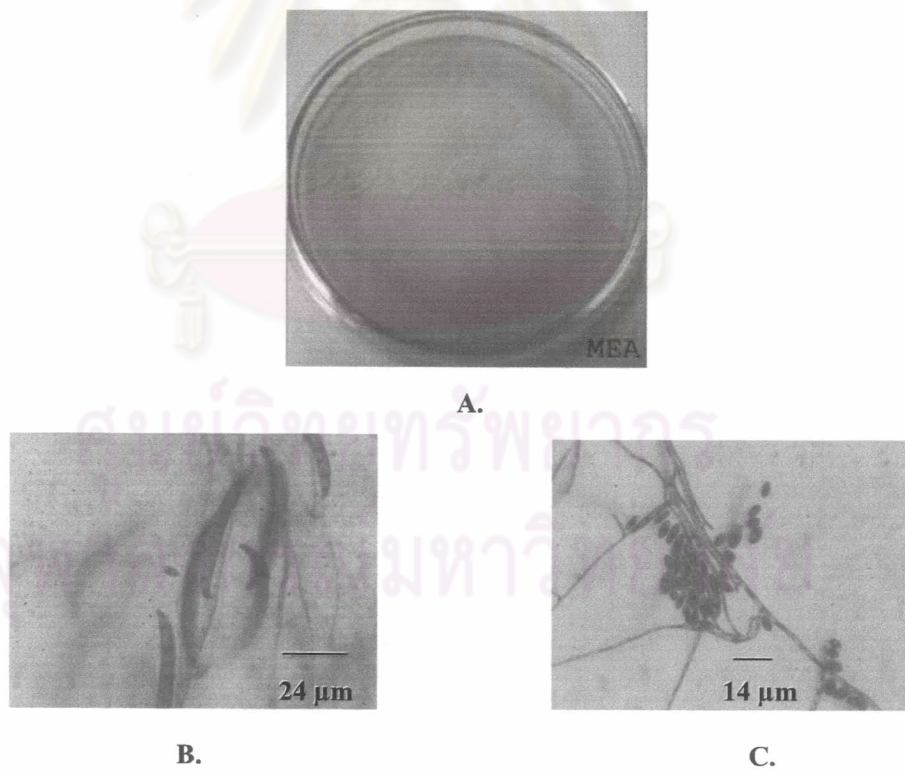
แหล่งใบกวาวเครือขาว	จำนวนราเอนโคไฟต์ที่แยกได้	ไอโซเลต
กรุงเทพมหานคร	18	10LCM00, 10LVM01-15 10LCM16, 10LMM17
ลพบุรี	1	15LVM01
ตาก	15	63LVM01-06, 63LMM07-08 63LCM09, 63LVM10-12 63LCM13-15
เชียงราย	9	57LCM01-03, 57LVM04-09

จากการทดลองเลี้ยงราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ PDA และ MEA พบว่าอาหารมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ลักษณะของโคโลนีและสีของเส้นใย รวมไปถึงการสร้างสีรงควัตถุ (pigment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดได้ไม่เท่ากัน เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดนั้นจะมีธาตุอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการสร้างสารเมแทบอลิซึมที่ต่างกันด้วย

เมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อราเอนโคไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้โดยการทำ slide culture แล้วย้อมด้วยแลคโตเฟโนลคอตตอนบลู (Lactophenol Cotton Blue) พบว่าราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดจำแนกได้เป็น 4 ประเภทคือ

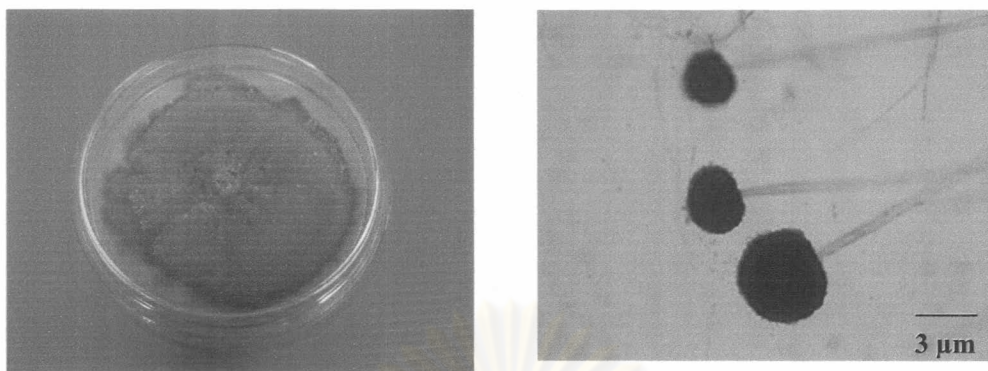
1. *Phomopsis* sp.รูปที่ 4.1 ราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. isolate NO. 10LCM00

A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน MEA อายุ 20 วัน B. Alpha and beta conidia

2. *Fusarium* sp.รูปที่ 4.2 ราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. isolate NO. 63LCM13

A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน MEA อายุ 14 วัน B. Macrospore C. Microspore

3. *Aspergillus* sp.



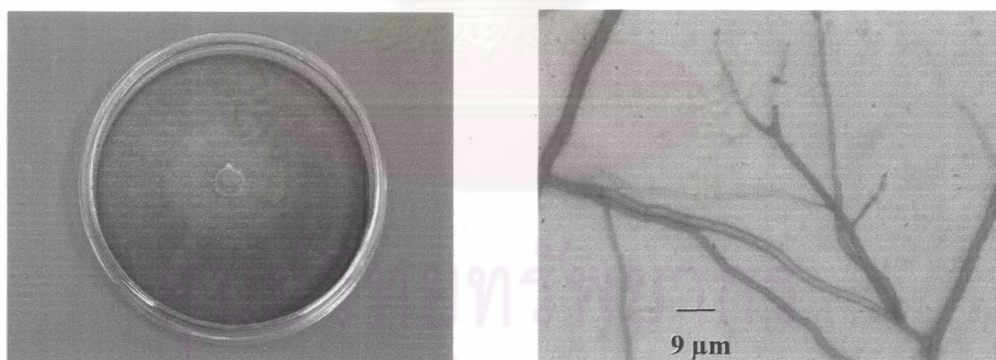
A.

B.

รูปที่ 4.3 ราเอนโคไฟต์ *Aspergillus* sp. isolate NO. 57LVM04

A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน PDA อายุ 14 วัน B. Conidiospore

4. Mycelia Sterilia



A.

B.

รูปที่ 4.4 ราเอนโคไฟต์ Mycelia Sterilia isolate NO. 63LVM01

A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน PDA อายุ 14 วัน B. mycelia

4.2 ผลการคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

คัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก 4 จังหวัดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) และ MEA (Malt Extract Agar) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่เต็มบนอาหารเพาะเชื้อโดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยการสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบมี 5 ชนิด แบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 10231 ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบแสดงในตารางที่ 4.2 สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์แสดงในตารางที่ 4.3

ผลการทดลองพบว่ามีราเอนโดไฟต์ 20 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต 10LCM00, 10LVM01-02, 10LVM04, 10LVM09-10, 10LVM15, 63LVM01, 63LVM03-06, 63LMM07-08, 63LCM09, 63LVM10-12, 63LCM13 และ 57LCM02

สำหรับรูปร่างใสของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็งทั้ง 2 ชนิด คือ PDA (Potato Dextrose Agar) และ MEA (Malt Extract Agar) แสดงในรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณจุลินทรีย์ทดสอบ(จำนวนโคโลนี/มิลลิลิตร)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	43×10^6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	54×10^5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	24×10^6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20×10^6
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	32×10^6

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (บริเวณใสรอบโคโลนี) โดยวิธี Dual agar diffusion

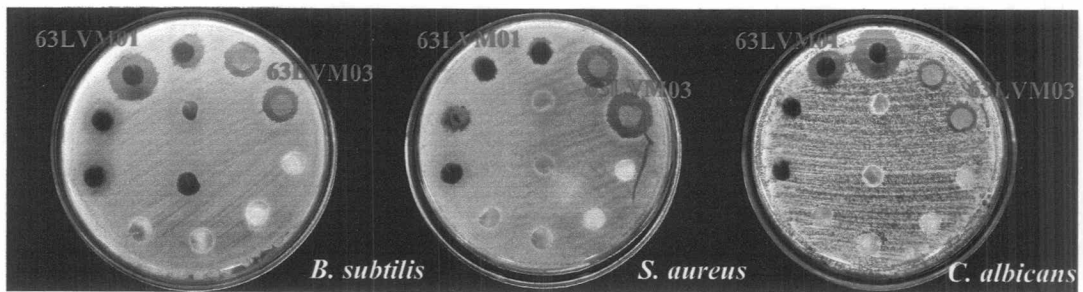
ไอโซเลต	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณใสรอบโคโลนี (ซม.)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
10LCM00	PDA	1.0	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
10LVM01	PDA	0.95	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
10LVM02	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	0.85	-	-	-	-
10LVM04	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	1.0	-	-	1.1	-
10LVM09	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	0.85	-
10LVM10	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	0.85	-	-	-	-
10LVM15	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	0.90	-	-	-	-
63LVM01	PDA	1.75	1.05	-	-	1.95
	MEA	1.45	0.95	-	-	-
63LVM03	PDA	1.35	1.65	-	-	1.05
	MEA	-	1.55	-	-	-
63LVM04	PDA	1.05	1.25	-	-	-
	MEA	1.65	0.95	-	-	-
63LVM05	PDA	1.35	1.15	-	-	-
	MEA	1.95	1.25	-	-	-
63LVM06	PDA	1.15	1.35	-	-	1.25
	MEA	1.75	1.75	-	-	-

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

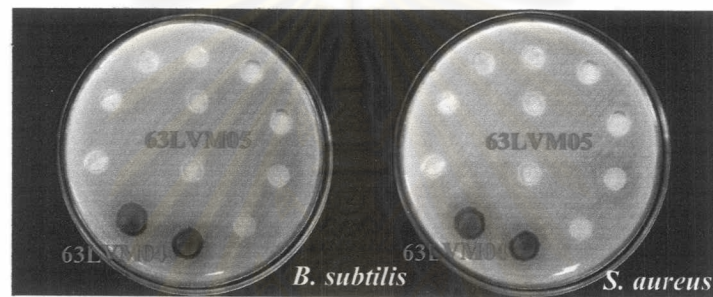
ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (บริเวณใสรอบโคโลนี) โดยวิธี Dual agar diffusion

ไอโซเลต	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณใสรอบโคโลนี (ซม.)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
63LMM07	PDA	-	0.95	-	-	-
	MEA	-	1.15	-	-	-
63LMM08	PDA	-	0.95	-	-	-
	MEA	-	1.15	-	-	-
63LCM09	PDA	1.35	1.45	-	-	-
	MEA	1.15	1.45	-	-	-
63LVM10	PDA	1.05	0.95	-	-	-
	MEA	1.05	1.05	-	-	-
63LVM11	PDA	-	1.15	-	-	-
	MEA	1.15	1.45	-	-	-
63LVM12	PDA	-	0.85	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
63LCM13	PDA	0.95	1.05	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
57LCM02	PDA	1.15	0.95	-	-	-
	MEA	2.05	1.85	-	-	-

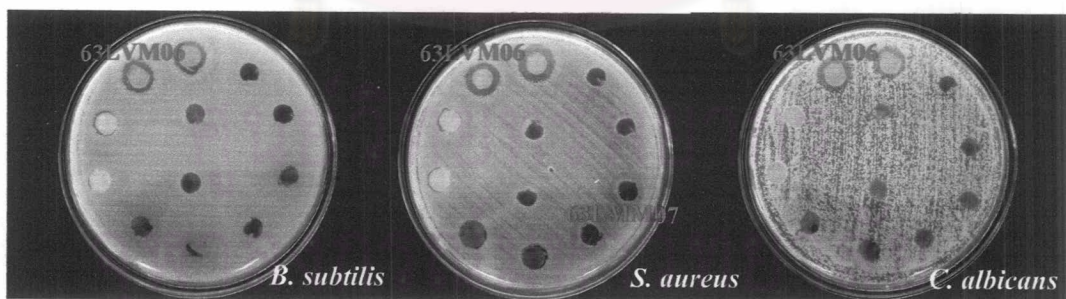
- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง



63LVM01 และ 63LVM03 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* *S. aureus* และ *C. albicans*

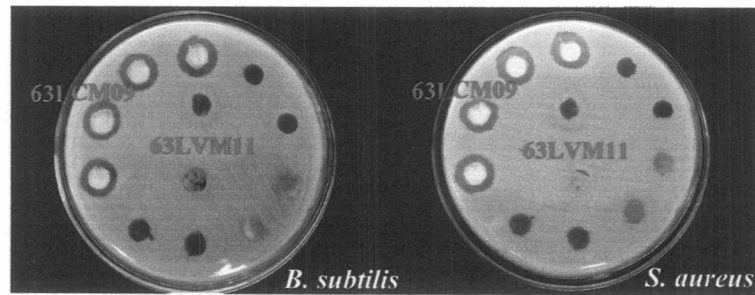


63LVM04 และ 63LVM05 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus*

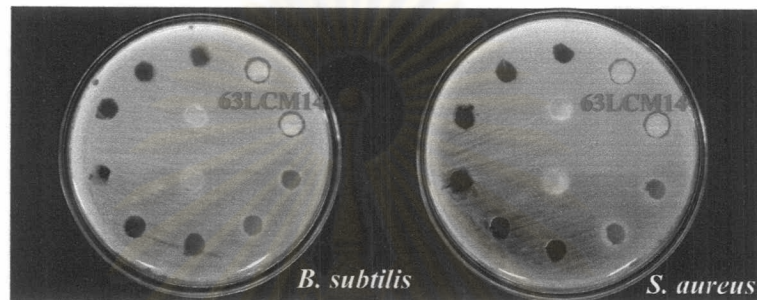


63LVM06 และ 63LMM07 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* และ *C. albicans*

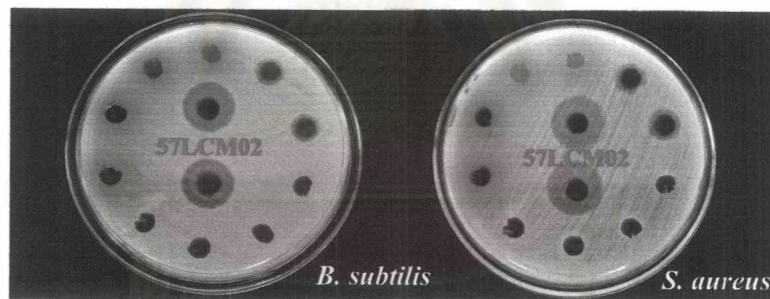
รูปที่ 4.5 วงใสของราเอนโคไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง PDA และ MEA



63LCM09 และ 63LVM11 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* *S. aureus*



63LCM14 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus*



57LCM02 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus*

รูปที่ 4.5 (ต่อ) วงใสของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง PDA และ MEA

ผลจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก กรุงเทพมหานครมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์น้อยมาก เมื่อเทียบกับราเอนโดไฟต์ที่แยกจาก จังหวัดอื่น ดังนั้นจึงเลือกราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากจังหวัดลพบุรี ตาก และเชียงราย มาทำเลี้ยงในอาหารทั้ง 5 ชนิด คือ PDA (potato dextrose agar), MEA (malt extract agar), YEA (yeast extract sucrose agar), SDA (sabouraud's dextrose agar) และ CMA (corn meal agar) เพื่อศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกมาทำการศึกษา

4.3 ผลการศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาวจากจังหวัดลพบุรี ตาก และเชียงราย มาทำเลี้ยงบนอาหารทั้ง 5 ชนิด คือ PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar), YEA (Yeast Extract Sucrose Agar), SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) และ CMA (Corn Meal Agar) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่เต็มบนอาหารเพาะเชื้อโดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 มิลลิเมตร ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยการสังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี วิธีการทดสอบทำเหมือนในข้อ 4.2 ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบแสดงในตารางที่ 4.4 สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์แสดงในตารางที่ 4.5

ผลการทดลองพบว่า มีราเอนโดไฟต์ 16 ชนิด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต 63LVM01, 63LVM03-04, 63LVM06, 63LMM08, 63LCM09, 63LVM10, 63LVM12, 63LCM13-14, 57LCM02-03 และ 57LVM04-07 โดยราเอนโดไฟต์ 63LVM01 มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดโดยเฉพาะในอาหาร YEA จึงเลือกราเอนโดไฟต์ 63LVM01 มาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* และมีวงใสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ขนาดใหญ่ที่สุด สำหรับรูปวงใสของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็งทั้ง 5 ชนิด แสดงในรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.4 ปริมาณจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์	ปริมาณจุลินทรีย์ทดสอบ (จำนวนโคโลนี/มิลลิลิตร)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	66×10^6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	26×10^5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	29×10^6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	30×10^5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	50×10^6

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (บริเวณใสรอบโคโลนี) โดยใช้วิธี Dual agar diffusion ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่น่าสนใจในอาหารแต่ละชนิด

ไอโซเลต	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณใสรอบโคโลนี (ซม.)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
63LVM01	PDA	-	1.40	-	-	-
	MEA	1.20	-	-	-	-
	YES	1.25	3.20	-	-	1.70
	SDA	1.10	2.00	-	-	-
	CMA	2.50	-	-	-	-
63LVM03	PDA	1.30	-	-	-	0.85
	MEA	1.15	-	-	-	0.85
	YES	1.60	-	-	-	-
	SDA	1.80	-	-	-	-
	CMA	1.70	-	-	-	-
63LVM04	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	1.15	-	-	-	0.85
	YES	1.55	-	-	-	-
	SDA	2.00	-	-	-	-
	CMA	1.95	-	-	-	-
63LVM06	PDA	1.60	-	-	-	-
	MEA	1.70	-	-	-	-
	YES	1.60	-	-	-	-
	SDA	1.80	-	-	-	-
	CMA	1.80	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (บริเวณใสรอบโคโลนี) โดยใช้วิธี
Dual agar diffusion ของเชื้อราเอนโคไฟต์ที่น่าสนใจในอาหารแต่ละชนิด

ไอโซเลต	อาหาร เลี้ยงเชื้อ	บริเวณใสรอบโคโลนี (ชม.)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
63LMM08	PDA	0.90	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	YES	-	-	-	-	-
	SDA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
63LCM09	PDA	1.30	-	-	-	-
	MEA	1.40	-	-	-	-
	YES	0.85	-	-	-	-
	SDA	1.20	-	-	-	-
	CMA	1.50	-	-	-	-
63LVM10	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	1.10	-	-	-	-
	YES	1.00	-	-	-	-
	SDA	1.10	-	-	-	-
	CMA	1.10	-	-	-	-
63LVM12	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	1.60	-	-	-	-
	YES	1.40	-	-	-	-
	SDA	-	-	-	-	-
	CMA	1.10	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (บริเวณใสรอบโคโลนี) โดยใช้วิธี Dual agar diffusion ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่น่าสนใจในอาหารแต่ละชนิด

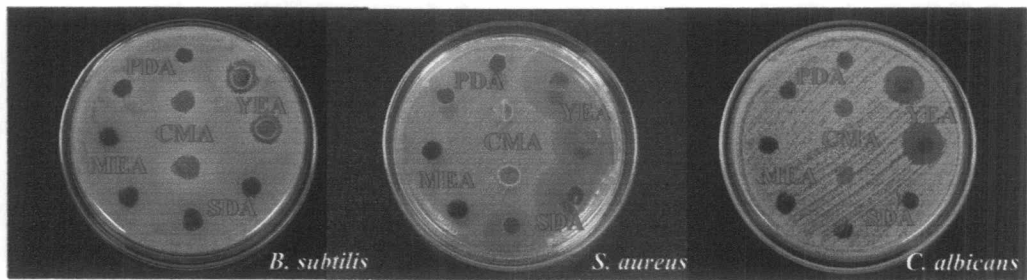
ไอโซเลต	อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณใสรอบโคโลนี (ซม.)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
63LCM13	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	1.05
	YES	-	-	-	-	-
	SDA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
63LCM14	PDA	0.95	-	-	-	-
	MEA	1.15	-	-	-	-
	YES	0.85	-	-	-	-
	SDA	-	-	-	-	-
	CMA	-	-	-	-	-
57LCM02	PDA	1.20	-	-	-	-
	MEA	1.50	-	-	-	-
	YES	1.10	-	-	-	-
	SDA	-	-	-	-	-
	CMA	1.50	-	-	-	-
57LCM03	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	YES	1.80	-	-	-	-
	SDA	-	-	-	-	-
	CMA	2.10	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

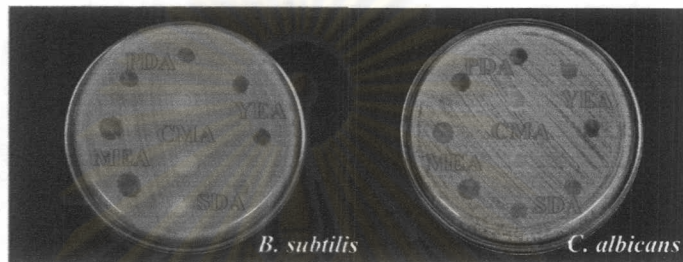
ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (บริเวณใสรอบโคโลนี) โดยใช้วิธี
Agar diffusion ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่น่าสนใจในอาหารแต่ละชนิด

เชื้อรา	อาหาร เลี้ยงเชื้อ	บริเวณใสรอบโคโลนี (ซม.)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
57LVM04	PDA	0.90	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	YES	1.20	-	-	-	-
	SDA	-	-	-	-	-
	CMA	1.50	-	-	-	-
57LVM05	PDA	-	-	-	-	-
	MEA	-	-	-	-	-
	YES	1.50	-	-	-	-
	SDA	-	-	-	-	-
	CMA	1.70	-	-	-	-
57LVM06	PDA	1.20	-	-	-	-
	MEA	1.40	-	-	-	-
	YES	1.50	-	-	-	-
	SDA	1.50	-	-	-	-
	CMA	1.80	-	-	-	-
57LVM07	PDA	1.30	-	-	-	-
	MEA	1.60	-	-	-	-
	YES	1.50	-	-	-	-
	SDA	1.55	-	-	-	-
	CMA	2.00	-	-	-	-

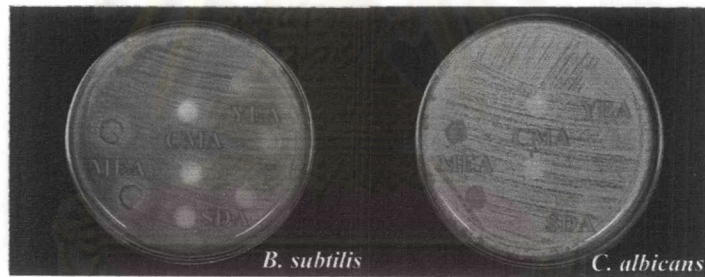
- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง



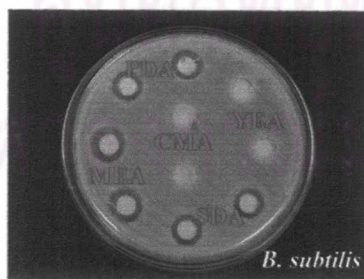
63LVM01 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* *S. aureus* และ *C. albicans*



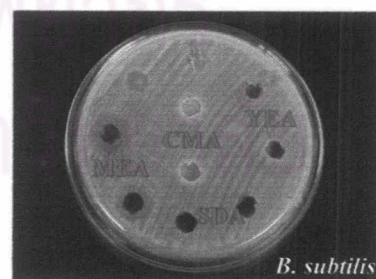
63LVM03 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *C. albicans*



63LVM04 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *C. albicans*



63LCM09 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*



63LCM14 ที่ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*

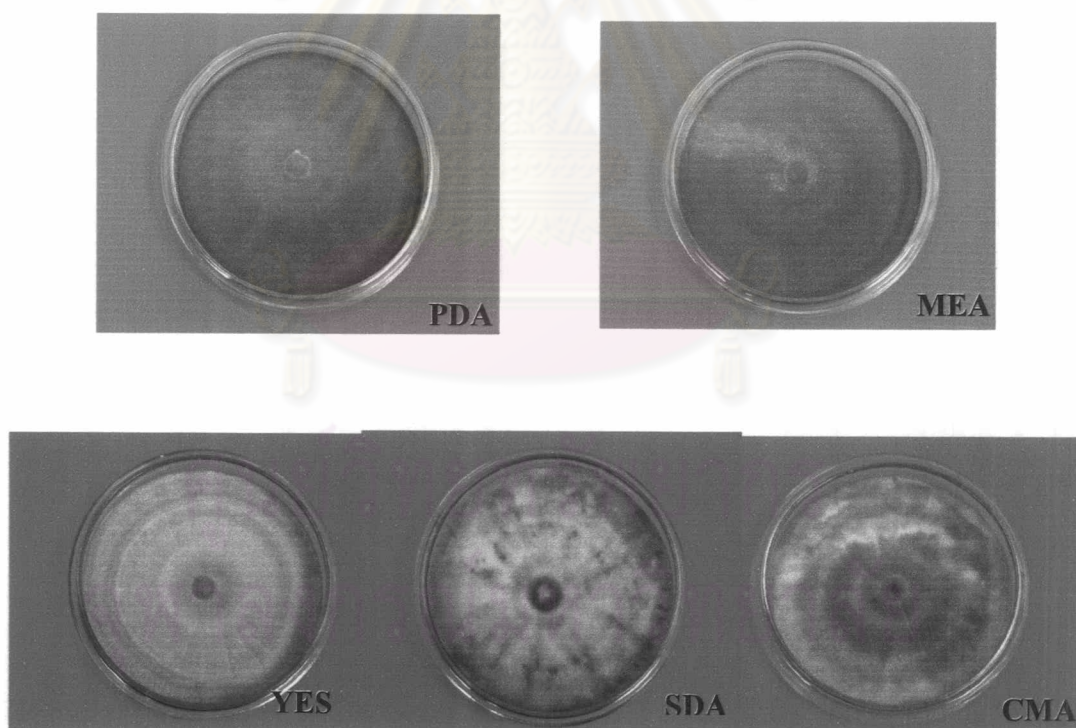
รูปที่ 4.6 วงใสของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง PDA, MEA, YEA, SDA และ CMA

4.4 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

4.4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

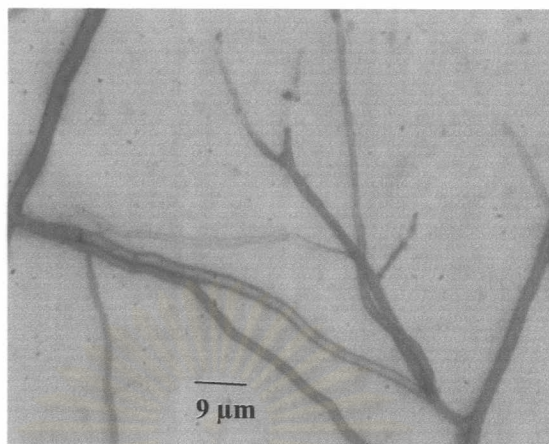
4.4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ต่างกัน 5 ชนิด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar), YEA (Yeast Extract Sucrose Agar), SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) และ CMA (Corn Meal Agar) พบว่าลักษณะของโคโคนี สีของเส้นใย และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราสร้างขึ้น จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่า ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 ไม่สร้างสปอร์ในอาหารทั้ง 5 ชนิด สำหรับลักษณะของเชื้อราแสดงในตารางที่ 1 ในภาคผนวก ข และรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ลักษณะ โคโคนีของราเอ็นโดไฟต์ 63LVM01 เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA MEA YEA SDA และ CMA ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

4.4.1.2 ผลการทำ slide culture



รูปที่ 4.8 ลักษณะของเส้นใยราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ในภาคผนวก และรูปที่ 4.7) เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และทำ slide culture พบว่าไม่มีสปอร์ (รูปที่ 4.8) จึงเป็นไปได้ที่ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 เป็นราที่ไม่มีการสร้างสปอร์หรือยังไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่จะมีการสร้างสปอร์

4.4.2 ผลการพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา

จากการพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา เมื่อเทียบบริเวณ 5.8S RNA และบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของราเอนโดไฟต์ 63LVM01 กับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *Mycoleptodiscus terrestris* 99.3% และ 90.9% ตามลำดับ ดังนั้นจึงจัดราเอนโดไฟต์ 63LVM01 เป็น *Mycoleptodiscus* sp. (แผนภาพที่ 4.1)


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
          18S                      ITS1
GAACCTGCGG AAGGATCATT AACAGGAAAA GGTACCCTC GCGGTCCCGA
                      ITS1
TTCTCAAACC ACTGTTTACC AAACGTTTCG TTGCCTCGGC GGGCCGGCAC
                      ITS1
TGGCTCGACT GCGGCCCTC CTTCGGGAGG AGCAGCCC GCAGGACGC
                      ITS1
TACAAAACCA TTCTGTTTCA AGAACGTCTG ATTTTACCTT CGCGAATGCC
          ITS1                      5.8S
ATAAATACAA CTTCAACAA TGGATCTCTT GGCTCCAGCA TCGATGAAGA
          5.8S
ACGCAGCGAA ATGCATAAC TAGTGTGAAT TGCAGATTTC AGTGAATCAT
          5.8S
CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCTCTTG GTATTCCCTG AGGCATGCCT
          5.8S                      ITS2
ATTTCGAGCGT CGTTTCGACC CTTAAGCGCA AGCTTAGTGT TGGGGACCGC
                      ITS2
CCCTGAAATA CGGAGGCGGC CCTTGAATCC ATCGGCGGTG CCGGTGCAGC
                      ITS2
CTGGAGCGCA GCAGCAATGC AGCTTTAAGC AGCCCGAAGC CTGCCGGACA
          ITS2                      28S
AACGAACTT CATTCTCA CGTCGACCTC GAATTAGGTA GGGATACCCG

```

C

แผนภาพที่ 4.1 ลำดับเบสบริเวณ 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S ของราเอนโดไฟต์ 63LVM01

ข้อมูลลำดับ DNA ส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของราเอนโดไฟต์ 63LVM01 อยู่ใน GenBank
หมายเลข DQ508136

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

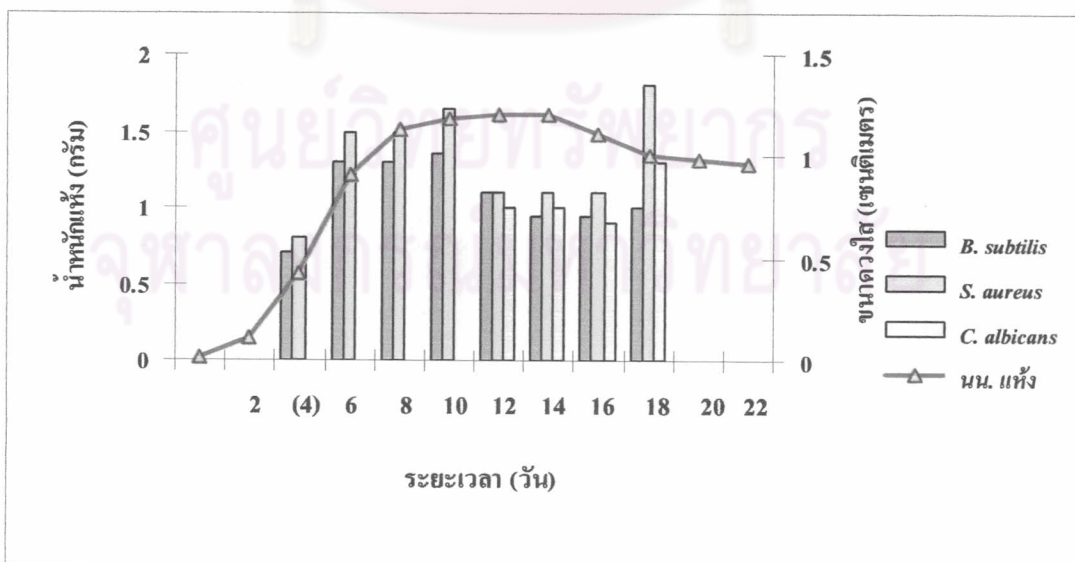
4.5.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Extract Sucrose Broth (YEB) ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ เก็บผลการทดลองวันเว้นวัน ครั้งละ 3 flask เป็นเวลา 22 วัน นำมากรองแยกเส้นใยกับน้ำเลี้ยงออกจากกัน เก็บน้ำเลี้ยงราไว้ทดสอบฤทธิ์ และนำเส้นใยเชื่อมาราน้ำหนักแห้ง เขียนกราฟเส้นระหว่างน้ำหนักแห้งกับวันที่เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.2

4.5.2 ผลการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

นำน้ำเลี้ยงราที่กรองได้จากข้อ 4.5.1 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar well diffusion (Acar, 1992 และ Jorgensen และคณะ, 1999) โดยวิธีนี้จะคล้ายกับวิธี Dual Agar diffusion แสดงผลในแผนภาพที่ 4.2 ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.9

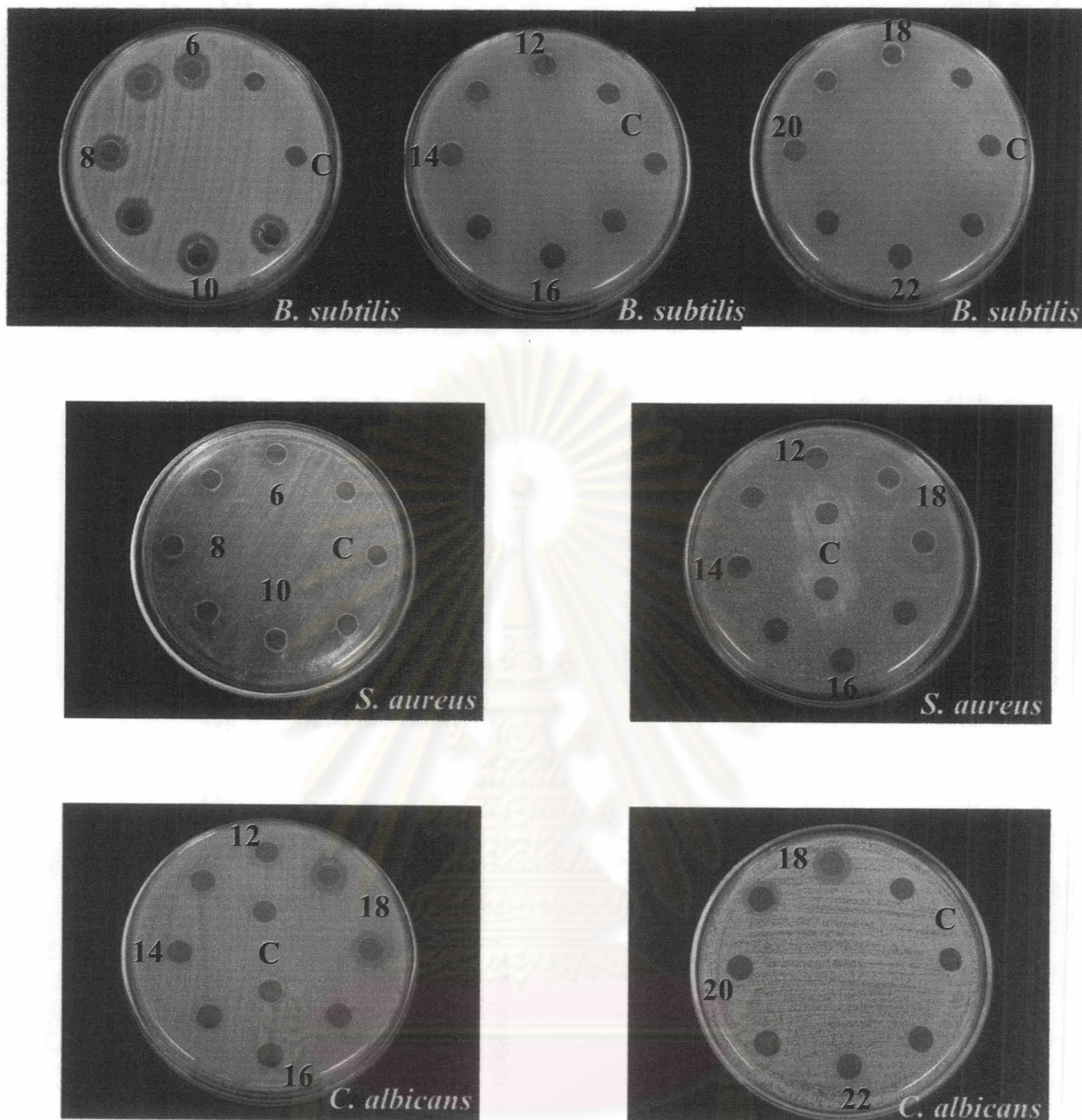
แผนภาพที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญและการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปเป็นระยะเวลา 22 วัน



จากแผนภาพที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา 63LVM01 มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากราชนิดนี้มีช่วง lag phase สั้นมากคือ ในช่วง 2 วันแรกเชื้อราจะมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อรากำลังปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ในช่วงนี้ยังไม่สร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ แต่เมื่อเริ่มปรับตัวได้แล้วเชื้อราจะเข้าสู่ช่วง log phase ช่วงนี้ราจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และเริ่มมีการสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ถึง 2 ชนิด คือ *B. subtilis* และ *S. aureus* ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จะแปรผันตรงกับระยะเวลา จนกระทั่งวันที่ 8 เชื้อเริ่มมีการเจริญเติบโตคงที่ คือมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย ช่วงนี้เรียกว่า stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่ราจะมีการสร้างสารเมแทบอลิต์ขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมภายนอกหลังจากที่ราใช้อาหารไปกับการเจริญเติบโตในช่วงแรก ในช่วงนี้ราสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ถึง 3 ชนิด คือ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *C. albicans* เชื้อราอยู่ในช่วงนี้ 6 วัน จากนั้นราจะเริ่มตาย ช่วงนี้เรียกว่า death phase ในวันที่ 18 ราสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด จะเห็นได้ว่าราชนิดนี้มีการเจริญอย่างรวดเร็วและมีอายุสั้นมาก คือสามารถเจริญได้เพียง 2 สัปดาห์เท่านั้น

ตารางที่ 4.6 ผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟต์ 63LVM01 ซึ่งทำการเก็บ 2 วันต่อครั้ง ภายในระยะเวลา 22 วัน

วันที่	บริเวณใสรอบโคโลนี (ซม.)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
4	0.70	0.80	-	-	-
6	1.30	1.60	-	-	-
8	1.20	1.50	-	-	-
10	1.35	1.75	-	-	-
12	1.10	1.10	-	-	1.10
14	0.95	-	-	-	1.00
16	0.95	1.10	-	-	0.90
18	1.00	1.80	-	-	1.30
20	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-



รูปที่ 4.9 วงใส (Inhibition Zone), ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 โดยที่ตัวเลข 6-22 แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของราเอนโดไฟต์

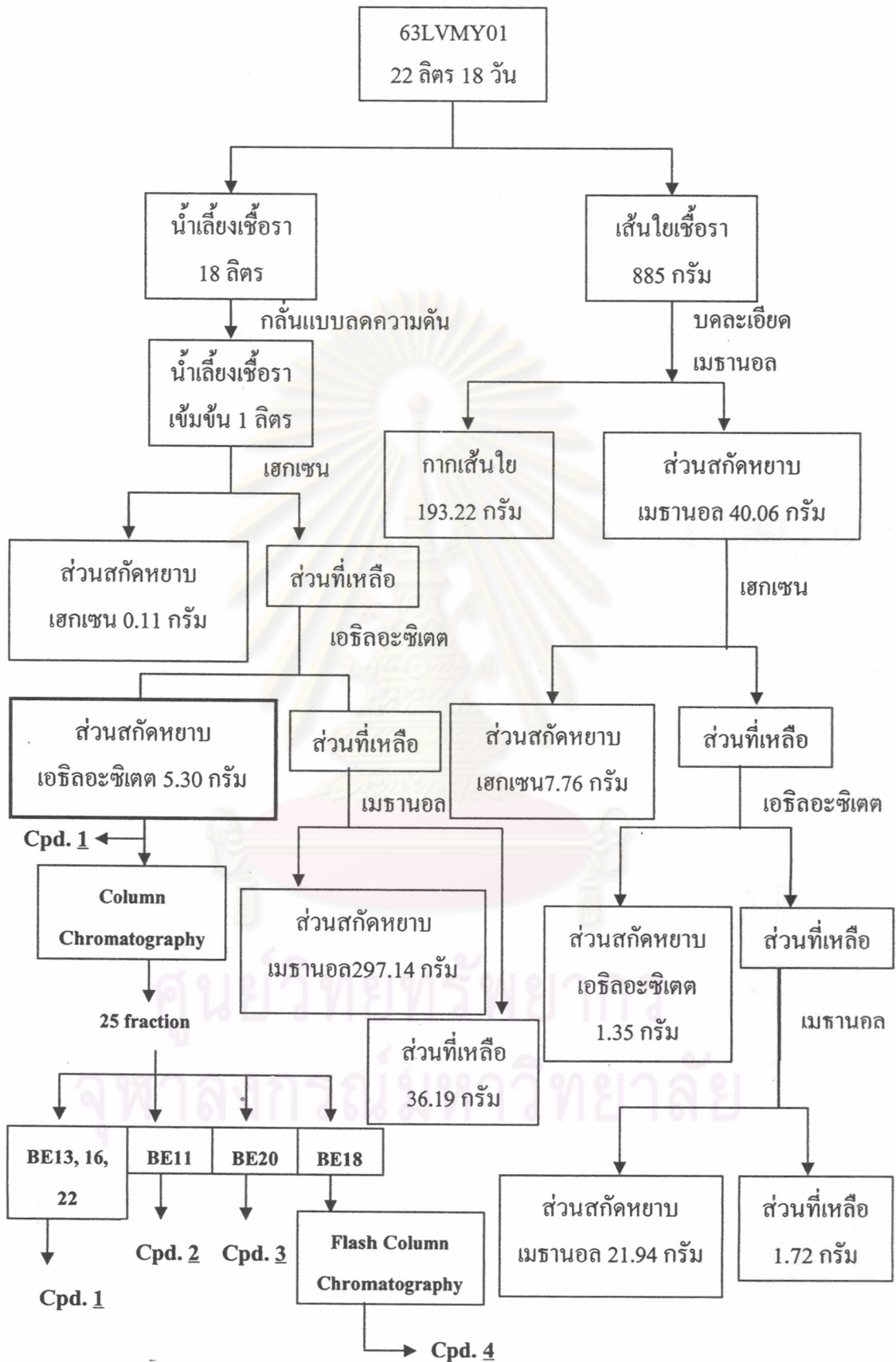
จากตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยงราได้เป็นระยะเวลา 18 วัน เชื้อราจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ถึง 3 ชนิด คือ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *C. albicans* ซึ่งสังเกตจากวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อลงไป โดยจะออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดกับเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 รองลงมาคือ *C. albicans* ATCC 10231 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ จากผลดังกล่าวจึงทำให้เลือกที่จะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ 63LVM01 เป็นระยะเวลา 18 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ราสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด

4.6 ผลการเลี้ยงเชื้อ การสกัด และการทดสอบส่วนสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากราเอนโคไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

เลี้ยงราเอนโคไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEA ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด เลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นที่มีราเจริญอยู่เต็มบนอาหารเพาะเชื้อโดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8.0 มิลลิเมตร นำชิ้นเชื้อราที่เจาะได้ถ่ายลงขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Extract Sucrose Broth (YEB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใส่ชิ้นวุ้น 5 ชิ้นต่อขวดแก้ว 1 ขวด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 18 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ราเอนโคไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 สร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สูงสุด โดยพิจารณาจากวงใสในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและจากการทำโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) เมื่อบ่มเชื้อไว้ครบ 18 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จะได้ส่วนของอาหารเลี้ยงราและเส้นใยรา

นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่กรองได้ทั้งหมด 18 ลิตรไประเหยน้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 34 °C จนกระทั่งได้อาหารเลี้ยงเชื้อราเข้มข้นประมาณ 1 ลิตร จากนั้นนำมาสกัดด้วยเฮกเซน ปริมาณเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อรา ทำการสกัดซ้ำจนกระทั่งสังเกตเห็นสีในชั้นเฮกเซนจางลงจนเกือบไม่มีสี นำสารสกัดที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 34 °C สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง ปริมาณ 0.11 กรัม เรียกว่า ครูดเฮกเซน (BH) นำส่วนที่เหลือจากการสกัดไปสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตต สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล ปริมาณ 5.30 กรัม เรียกว่า ครูดเอทิลอะซิเตต (BE) จากนั้นนำส่วนที่เหลือจากการสกัดไปสกัดต่อด้วยเมทานอล สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ ปริมาณ 297.14 กรัม เรียกว่า ครูดเมทานอล (BM) และได้ส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอล (BR) เป็นของแข็งสีน้ำตาลอ่อน ปริมาณ 36.19 กรัม

ส่วนของเส้นใยรานำมาบดให้ละเอียด แล้วนำไปแช่ในตัวทำละลายเมทานอล กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 93 ทำการสกัดซ้ำจนกระทั่งเมทานอลไม่มีสีหรือมีสีจางมาก รวมสารสกัดที่ได้แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 34 °C สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ ปริมาณ 40.06 กรัม จากนั้นนำครูดเมทานอลที่ได้มาสกัดด้วยเฮกเซน สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง ปริมาณ 7.76 กรัม เรียกว่า ครูดเฮกเซน (MH) นำส่วนที่เหลือจากการสกัดไปสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตต สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล ปริมาณ 1.35 กรัม เรียกว่า ครูดเอทิลอะซิเตต (ME) จากนั้นนำส่วนที่เหลือจากการสกัดไปสกัดต่อด้วยเมทานอล สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ ปริมาณ 21.94 กรัม เรียกว่า ครูดเมทานอล (MM) และได้ส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอล (MR) เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ ปริมาณ 1.72 กรัม



แผนภาพที่ 4.3 วิธีการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราและเส้นใยเชื้อราและการแยกสารประกอบ

เมื่อนำส่วนสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราทั้ง 8 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตต ส่วนสกัดหยาบเมธานอลและส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมธานอล มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด คือ *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ด้วยวิธี paper disk diffusion method สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ คือ BE และ ME ดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.10 และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. และ *Phytophthora* sp. โดยใช้ Captane Iprodione และ Ketokonazole ความเข้มข้น 10 µg เป็น Positive control และใช้ 10% DMSO ในน้ำ เป็น negative control พบว่าสารสกัดหยาบ BE มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium* sp. (รูปที่ 4.11) จากการทดลองนี้จึงเลือกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากส่วนเส้นใยและอาหารเลี้ยงเชื้อรา เอนโดไฟต์ 63LVM01 มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟี เนื่องจากคาดว่าน่ามีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ นำสารสกัดหยาบทั้ง 2 ส่วนมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตัวชะที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ แยกจนได้สารทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ สารประกอบ 1 สารประกอบ 2 สารประกอบ 3 และสารประกอบ 4

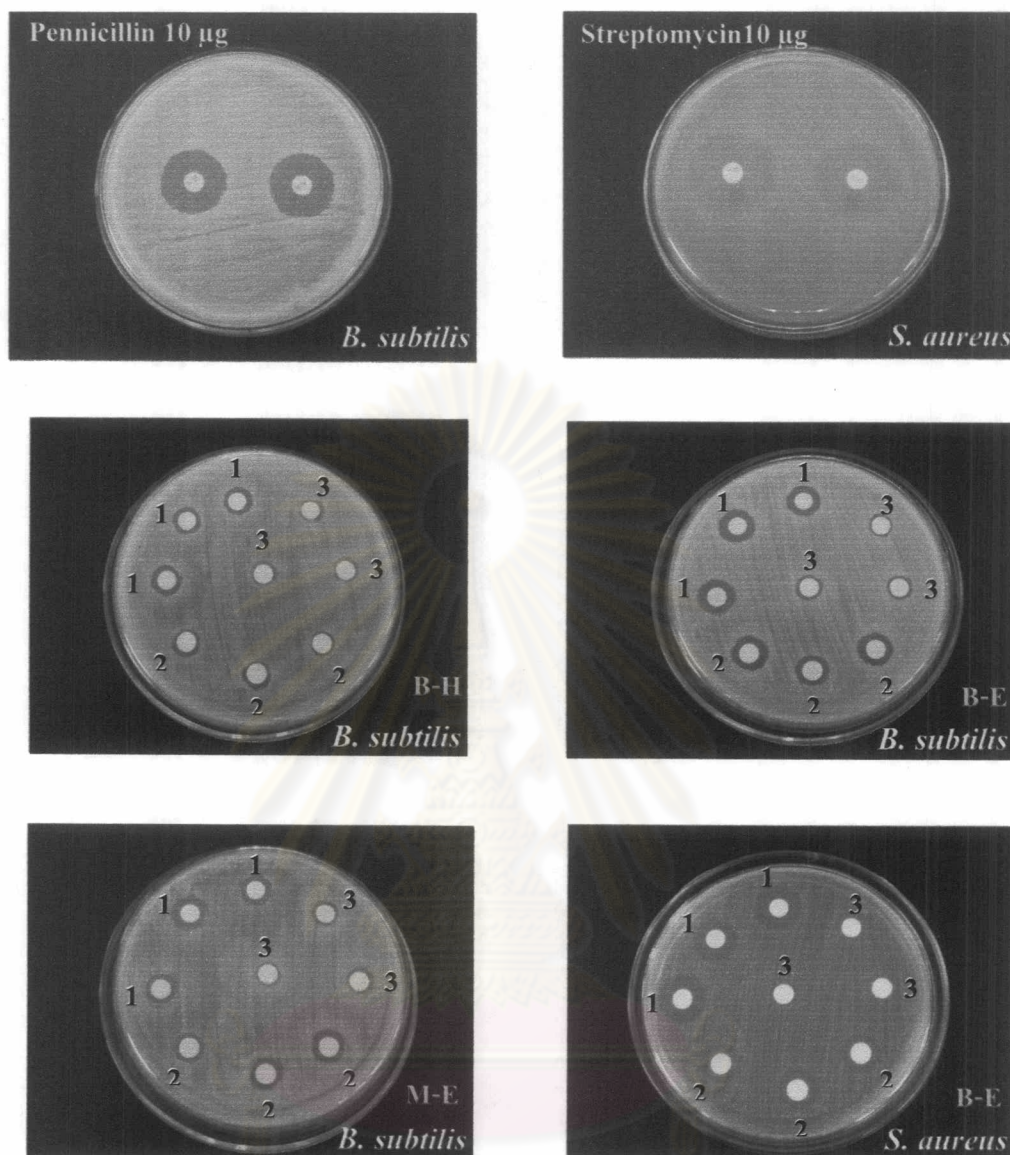
ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและอาหารเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

ส่วนสกัดหยาบ (50 µg/disk)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Inhibition Zone) (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 6633	ATCC 25923	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 10231
BH	8.5	7.0	-	-	-
BE	9.0	9.0	-	-	-
BM	7.0	-	-	-	-
BR	8.5	-	-	-	-
MH	8.0	8.5	-	-	-
ME	9.0	8.5	-	-	-
MM	7.5	-	-	-	-
MR	7.0	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 50 µg/disk

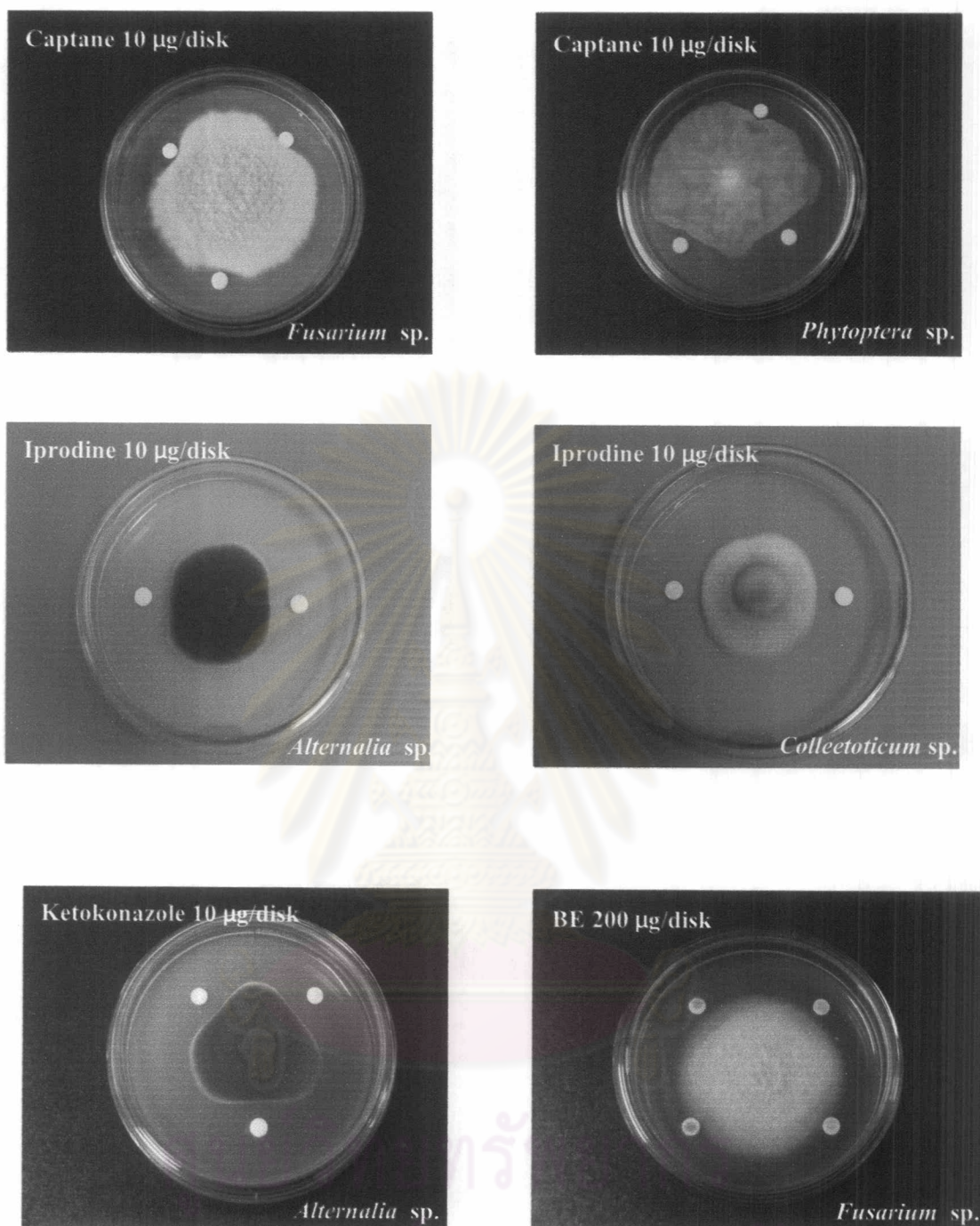
BH, BE, BM และ BR หมายถึง ส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราเมื่อสกัดด้วยเฮกเซน, เอธิลอะซิเตต, เมธานอล และส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมธานอล ตามลำดับ

MH, ME, MM และ MR หมายถึง ส่วนสกัดหยาบจากเส้นใยเมื่อสกัดด้วยเฮกเซน, เอธิลอะซิเตต, เมธานอล และส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมธานอล ตามลำดับ



รูปที่ 4.10 วงใส (Inhibition Zone), ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงรา
 เอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01 โดยวิธี paper disk diffusion ทำการทดลอง 3 ซ้ำใน
 แต่ละความเข้มข้นของส่วนสกัดหยาบ

- โดยที่
- 1 หมายถึง paper disk ที่จุ่มในสารสกัดหยาบความเข้มข้น 200 µg/disk
 - 2 หมายถึง paper disk ที่จุ่มในสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 µg/ disk
 - 3 หมายถึง paper disk ที่จุ่มในสารสกัดหยาบความเข้มข้น 50 µg/ disk
- B-H หมายถึง ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนจากส่วนอาหารเลี้ยงรา
 B-E หมายถึง ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากส่วนอาหารเลี้ยงรา
 M-E หมายถึง ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตจากส่วนเส้นใยรา



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.11 ถูรีซัยยังราก่อ โรคของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01
เปรียบเทียบกับ Ketoconazole 50 $\mu\text{g}/\text{disk}$

4.7 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ 63LVM01 ให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

4.7.1. การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ 63LVM01

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์ 63LVM01 น้ำหนัก 5.30 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (320 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร ชะคอลัมน์โดยเพิ่มสภาพขั้วตัวชะจากต่ำไปสูง นั่นคือจาก เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การแยกสารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ 63LVM01

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-23	BE01	50-50 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	น้ำมันใสไม่มีสี	8.2
24-126	BE02	50-50 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	น้ำมันสีเหลืองอ่อน	56.6
127-153	BE03	50-60 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	น้ำมันสีเหลืองอ่อน	3.5
154-187	BE04	60 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	สารสกัดสีเหลือง	13.1
188-245	BE05	60-70 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	สารสกัดสีเหลืองอ่อน	6.5
246-325	BE06	70 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	สารสกัดสีเหลือง	17.4
326-503	BE07	70 % ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน-2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลืองอมน้ำตาล	16.3
504-565	BE08	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลือง	6.2
566-596	BE09	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาล	47.4
597-607	BE10	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาลแดง	12.9
608-624	BE11	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	191.2
625-651	BE12	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลืองส้ม	176.1
652-703	BE13	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาลเข้ม	134.9
704-811	BE14	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาลส้ม	198.8
812-838	BE15	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาลเข้มอ่อนเหนียว	410.7
839-863	BE16	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลืองเข้ม	7.0
864-879	BE17	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลืองส้ม	31.4

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
880-989	BE18	2-4 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาลอมเหลือง	398.2
990-1009	BE19	4 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลือง	69.6
1010-1045	BE20	4-6 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาลปนของแข็ง สีขาว	228.0
1046-1085	BE21	4-6 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาลเข้มปน น้ำมัน	293.4
1086-1205	BE22	6-10 % เมธานอลในไดคลอโรมี เทน	สารสกัดสีน้ำตาลเข้มปน น้ำมัน	385.2
1206-1260	BE23	15 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีน้ำตาลเข้มเหนียว	127.4
1261-1290	BE24	15-20 % เมธานอลในไดคลอโรมี เทน	สารสกัดสีน้ำตาลเข้ม	34.8
1291-1341	BE25	20-100 % เมธานอลในไดคลอโรมี เทน	สารสกัดสีน้ำตาลเข้มปน น้ำมัน	382.4

4.7.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 880-989 (BE18)

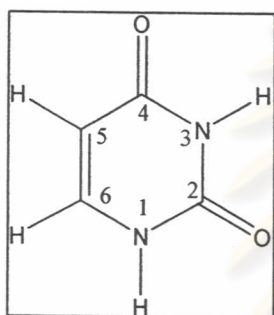
นำลำดับส่วนที่ 880-989 (BE18) น้ำหนัก 398.2 มิลลิกรัม มาแยกอีกครั้งด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (80 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ตัวชะที่ใช้จะเพิ่มสภาพขั้วเป็นลำดับขั้นดังนี้ ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของลำดับส่วนที่ 880-989 (BE18) จากส่วนสกัดหยาบเอธิลเอซิดจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-131	RBE01	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลืองเข้ม	3.9
132-259	RBE02	2-4 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลืองอมน้ำตาล	5.4
260-339	RBE03	4-6 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดสีเหลืองอมน้ำตาล	104.7
340-750	RBE04	6-50 % เมธานอลในไดคลอโรมี เทน	สารสกัดสีน้ำตาลค้ำเหนียว	123.8
751-768	RBE05	50-100 % เมธานอลในไดคลอโรมี เทน	สารสกัดสีน้ำตาลเข้ม	12.5

4.7.3 การทำให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 1

สารประกอบ 1 เป็นของแข็งสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งได้มาจากส่วนที่เหลือจากการนำสารสกัดหยาบเอธิลเอซิติเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดลำดับส่วนด้วยเอธิลเอซิติเตตและเมธานอล ล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมธานอล ได้ของแข็งสีครีมหนัก 800 มิลลิกรัม และได้มาจากลำดับส่วนที่ BE13, 16 และ BE22 ของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิติเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2-10% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกของแข็งโดยการกรองและล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมธานอล ได้ของแข็งสีน้ำตาลอ่อนหนัก 820 มิลลิกรัม (สารประกอบ 1) สารประกอบที่ได้มีสมบัติดังนี้



ละลายได้ใน DMSO และ EtOH ผสม H₂O ในอัตราส่วน 1:1;

m.p. : 326-327 °C;

$[\alpha]_D^{20}$: -14 (c 0.075 ใน EtOH:H₂O);

UV λ_{max} (EtOH:H₂O) (ε): 259 nm ; (รูปที่ 1 ใน

ภาคผนวก ค)

FT-IR สเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนแสงของการสั่นต่างๆ มีแสดงไว้ในตารางที่ 4.10 และรูปที่ 2 ในภาคผนวก ค.

¹H-NMR spectrum (DMSO, 400 MHz) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ, ppm): 5.46 (1H, dd, *J*= 0.60 และ 2.6 Hz, 5-H) และ 7.40 (1H, d, *J*= 5.6, 6-H) (รูปที่ 4 ในภาคผนวก ค)

¹³C-NMR spectrum (DMSO, 100 MHz ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ, ppm): 100.7 (C-5), 142.7 (C-6), 152.0 (C-2) และ 164.3 (C-4) (รูปที่ 5 ในภาคผนวก ค)

แมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 1 มีมวลโมเลกุล [M+H]⁺ *m/z*: 113.0370; cal 113.0351 (รูปที่ 3 ในภาคผนวก ค)

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ 1 ประกอบด้วย gHSQC, gHMBC, gCOSY และ gNOESY แสดงไว้ดังรูปที่ 6-9 ในภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.10 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 1

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3123	ปานกลาง	N-H สันแบบยืดของ Amide
2928	สูง	C-H สันแบบยืดของ Alkane
1728	ปานกลาง	C=O สันแบบยืดของ Amide
1407	ปานกลาง	C=C สันแบบยืดของ Aromatic
1238	สูง	C-N สันแบบยืดของ Amide
995	สูง	C-H สันแบบงอนอกระนาบ
858	สูง	C-H สันแบบงอนอกระนาบ

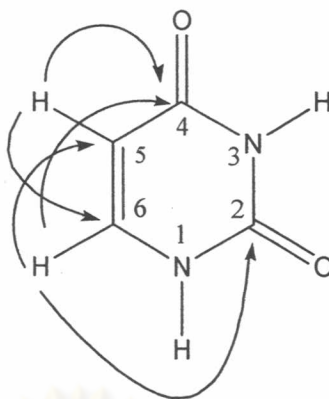
จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 1 แสดงในรูปที่ 3 ภาคผนวก ค. พบว่าสารประกอบนี้มีมวลโมเลกุล $[M+H]^+$ m/z : 113.0370; cal 113.0351 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 1 คือ $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 4

โดยอาศัยข้อมูลจากคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมและ HSQC แสดงในรูปที่ 5 ภาคผนวก ค. พบสัญญาณ amide carbonyl carbons ที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_c 152.0 และ 164.3 ppm และเมไธน์คาร์บอน (methine carbon) ที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_c 100.7 และ 142.7 ppm ดังนั้นสารประกอบ 1 มีหมู่คาร์บอนิล 2 หมู่ พันธะคู่ 1 พันธะ และมีวง 1 วง

จากผลของ HSQC พบว่า C ที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_c 142.7 และ 100.7 ppm แสดงถึงคาร์บอนที่เป็น CH ของโอเลฟินิกคาร์บอน (olefinic carbon) ซึ่งคาร์บอนที่ตำแหน่งดังกล่าวจะมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H , ppm) ที่ตำแหน่งโปรตอน 7.40 และ 5.46 ppm

จากผลของ $^1\text{H-NMR}$ และ COSY พบว่า โปรตอน H-5 และ H-6 ที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_H 7.40 และ 5.46 ppm ตามลำดับ อยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกันและมีค่า coupling constant = 2.4 Hz และสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_H 11.04 และ 10.88 ppm เป็นของไนโตรเจน

จากผลของ HMBC แสดงให้เห็นว่าโปรตอน H-5 มีความสัมพันธ์กับคาร์บอน C-4 และ C-6 ส่วนโปรตอน H-6 มีความสัมพันธ์กับคาร์บอน C-2, C-4 และ C-5 จากความสัมพันธ์ของ HMBC นี้ แสดงให้เห็นว่าควรมีลักษณะโครงสร้างดังนี้

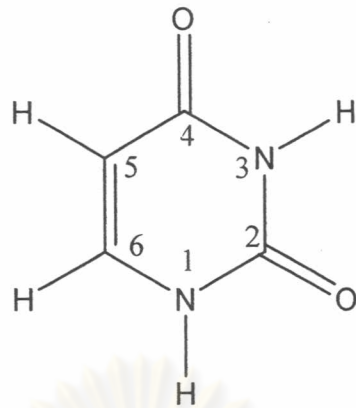


จากผลของสเปกโทรสโกปีทั้งหมดสรุปได้ว่าสารประกอบ 1 มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.12 คือ pyrimidine-2,4(1H, 3H)-dione หรือ uracil

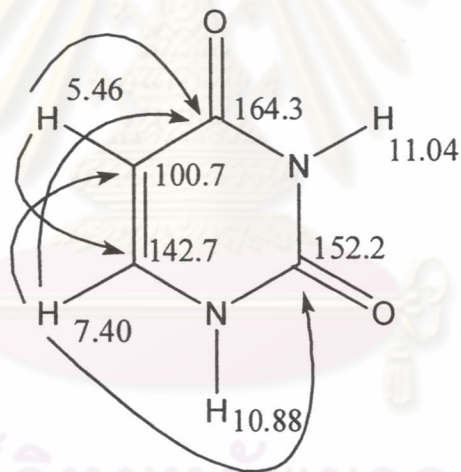
ตารางที่ 4.11 ข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 1

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_c),	$^1\text{H-NMR}$ (δ_H)	gHMBC	gCOSY	gNOESY
1	NH	10.88	-	H-6	H-6
2	152.0	-	-	-	-
3	NH	11.04	-	-	H-6
4	164.3	-	-	-	-
5	100.7	5.46 (1H, dd, $J=$ 0.60 และ 2.6 Hz, 5- H)	C-4, C-6	H-6	H-6
6	142.7	7.40 (1H, d, $J=$ 5.6, 6-H)	C-2, C-4, C-5	H-1, H-5	H-1, H-3, H-5

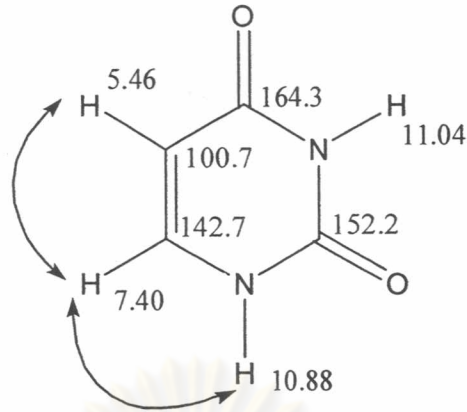
จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY (รูปที่ 6-9 ในภาคผนวก ค) ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.11 และข้อมูลจากแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 1 คือ Uracil หรือ pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.12-4.15



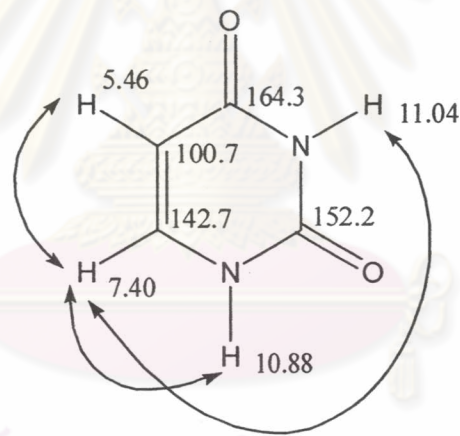
รูปที่ 4.12 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 1



รูปที่ 4.13 gHMBC ของสารประกอบ 1



รูปที่ 4.14 gCOSY ของสารประกอบ 1

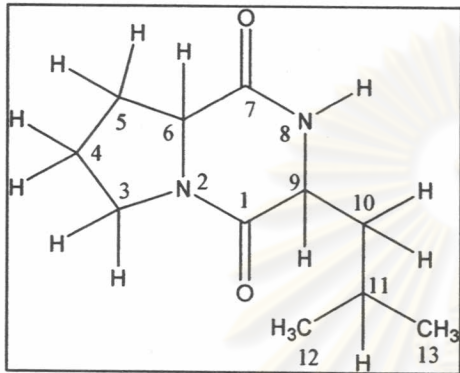


รูปที่ 4.15 gNOESY ของสารประกอบ 1

Alyssa และคณะ, 2005 พบว่า Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus brevis* sp. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* sp. และ *Leuconostoc mesenteroides*) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* และ *Debaryomyces hansenii*) และเชื้อรา (*Alternaria solani* และ *Cladosporium* sp.) สามารถสร้าง Uracil ได้จากการเปลี่ยน Uridine ที่มีอยู่ในมะเขือเทศสุกให้เป็น Uracil ดังนั้นจึงเอาไปใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ได้ว่าถ้าพบ Uracil ในน้ำมะเขือเทศ แสดงว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ Lactic Acid Bacteria

4.7.4 การทำให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 2

สารประกอบ 2 เป็นผลึกสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE11 ของสารสกัดหยาบเอริธโรซิเตดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกผลึกออกมาโดยการตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน ได้ผลึกสีขาวหนัก 11 มิลลิกรัม (สารประกอบ 2) สารประกอบที่ได้มีสมบัติ ดังนี้



ละลายได้ใน CH_2Cl_2 และ CHCl_3

R_f ของสารเท่ากับ 0.638 โดยใช้ 100% ไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

m.p. : 156-157 °C ; 157-158 (Nitecki, 1968)

$[\alpha]_D^{20}$: -132 (c 0.24 ใน CH_2Cl_2)

-133 (c 1 ใน EtOH) (Nitecki, 1968)

FT-IR สเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนแสงของการสั่นต่างๆ ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4.12 และรูปที่ 11 ในภาคผนวก ค.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum (CDCl_3 , 400 MHz) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ , ppm): 0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 13-H), 1.04 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 12-H), 1.56 (1H, ddd, $J = 4.8, 9.9$ และ 10 Hz, 10- H_b), 1.76 (1H, m, 11-H), 1.94 (1H, m, 4- H_b), 2.06 (1H, m, 4- H_a), 2.10 (1H, m, 10- H_a), 2.17 (1H, m, 5- H_b), 2.39 (1H, ddd, $J = 2.8, 7.2$ และ 13.2 Hz, 5- H_a), 3.61 (2H, m, 3-H), 4.06 (1H, dd, $J = 3.2$ และ 10 Hz, 9-H) และ 4.10 (1H, dd, $J = 8.0$ และ 8.8 Hz, 6-H) (รูปที่ 13 ในภาคผนวก ค)

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (CDCl_3 , 100 MHz) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ , ppm): 21.2 (C-13), 22.8 (C-4), 23.4 (C-12), 24.7 (C-11), 28.2 (C-5), 38.6 (C-10), 45.6 (C-3), 53.4 (C-9), 59.0 (C-6), 166.2 (C-1) และ 170.2 (C-7) (รูปที่ 14 ในภาคผนวก ค)

แมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 2 มีมวลโมเลกุล $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 211.1443; cal 211.1446 (รูปที่ 12 ในภาคผนวก ค)

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ 2 ประกอบด้วย gHSQC, gHMBC, gCOSY และ gNOESY แสดงไว้ดังรูปที่ 15-18 ในภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.12 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 2

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3253	สูง	N-H สั่นแบบยืด
2954	สูง	C-H สั่นแบบยืด
1672	สูง	C=O สั่นแบบยืดของ Amide
1637	สูง	N-H สั่นแบบงอของ Amide
1554	สูง	N-H สั่นแบบงอของ Amide
1434	สูง	C-H สั่นแบบงอของ CH_2 , CH_3

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 2 แสดงในรูปที่ 12 ภาคผนวก ค. พบว่าสารประกอบมีมวลโมเลกุล $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 211.1443; cal 211.1446 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 2 คือ $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 4

จากผลของ HSQC พบสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_c , ppm) ที่ตำแหน่ง 21.2 และ 23.4 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของหมู่เมทิล โดยคาร์บอนดังกล่าวจะมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_H 0.55 และ 1.04 ppm ตามลำดับ สัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_H 22.8 ppm เป็นสัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene carbon) ซึ่งมีสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง 1.97 และ 2.07 ppm จาก ^{13}C -NMR พบว่าคาร์บอนที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_c 28.6 ppm เป็นสัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene carbon) ซึ่งมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H , ppm) ที่ตำแหน่ง 2.17 และ 2.39 ppm คาร์บอนที่ตำแหน่ง 38.6 ppm เป็นสัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene carbon) ซึ่งมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H , ppm) ที่ 1.56 และ 2.10 ppm คาร์บอนที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_c 45.6 ppm เป็นสัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene carbon) ที่ต่ออยู่กับไนโตรเจนซึ่งมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H , ppm) ที่ตำแหน่ง 3.60 ppm คาร์บอนที่ตำแหน่ง 22.7, 53.6 และ 59.0 ppm เป็นสัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methine carbon) ซึ่งมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H , ppm) ที่ตำแหน่ง 1.82, 4.06 และ 4.16 ppm ตามลำดับ โดยคาร์บอนที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_c , ppm) ที่ตำแหน่ง 53.6 และ 59.0 ppm เป็นคาร์บอนที่ต่อกับไนโตรเจน

จาก ^1H -NMR spectrum และ COSY พบว่าโปรตอน H-3 และ H_α -4, H_β -4 ซึ่งมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H , ppm) 3.61 และ 1.94, 2.06 ตามลำดับ อยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกันและยังพบว่าโปรตอน H-4 และ H-5 ซึ่งมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H , ppm) 2.70 และ 2.17 ppm ตามลำดับ

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ HSQC แสดงในรูปแบบที่ ภาคผนวก ค พบ 2 สัญญาณของหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ คาร์บอนที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{C} , ppm) 170.2 และ 166.2 ppm พบ 3 สัญญาณของเมไธน์คาร์บอนที่ 24.7, 53.4 และ 59.0 ppm พบ 4 สัญญาณของ methylene sp^3 -carbon ที่ 22.8, 28.2, 38.6 และ 45.6 ppm และพบ 2 สัญญาณของ methyl carbon ที่ 21.2 และ 23.4 ppm ดังนั้นสารประกอบ 2 มีหมู่คาร์บอนิล 2 หมู่ และมีวง 2 วง

จากผลของ $^1\text{H-NMR}$ และ COSY พบว่า โปรตอน H-3 และ H_α -4, H_β -4 ที่มีค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{H} , ppm) 3.61 และ 1.94, 2.06 ppm ตามลำดับ อยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกัน และยังพบว่า โปรตอน H-4 และ H-5 ที่มีค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_{H} 2.17 และ 2.39 ppm ตามลำดับ

จากผลของ COSY ยังพบความสัมพันธ์ระหว่าง H-5 และ H-6 ซึ่งมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{H} , ppm) 2.17 และ 4.16 ppm ตามลำดับซึ่งอยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกัน

จากผลของ HMBC จะเห็นความสัมพันธ์ระหว่าง H-5 และ H-6 กับหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ที่ 172.2 ppm จึงทำให้ทราบว่า สารประกอบ 2 มีลิวซีนเป็นส่วนประกอบ

จากผลของ $^1\text{H-NMR}$ และ COSY พบว่า โปรตอน H-12 และ H-13 ที่มีค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{H} , ppm) 1.04 และ 0.99 ppm อยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกับ H-11 กับ H-10 ที่มีค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{H} , ppm) 2.10 ppm แสดงว่า H-11 กับ H-10 อยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกัน

และจากความสัมพันธ์ของ COSY ยังพบว่า H-9 ที่ติดกับในโตรเจน และ H-10 ที่มีค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_{H} 4.06 และ 2.10 ppm ตามลำดับที่อยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกัน

ข้อมูล HMBC และความสัมพันธ์ระหว่าง H-10 และ H-9 กับคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{C} , ppm) 166.2 ppm จากข้อมูลที่กล่าวข้างต้นทำให้พบว่า สารประกอบ 2 มีโปรลีนเป็นองค์ประกอบ

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโคปีทั้งหมดกล่าวได้ว่าสารประกอบ 2 เป็น dipeptide ซึ่งมีกรดอะมิโนลิวซีนและโปรลีนเป็นองค์ประกอบซึ่งมีโครงสร้างดังรูป 4.16

ศูนย์วิทยาศาสตร์พยากรณ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

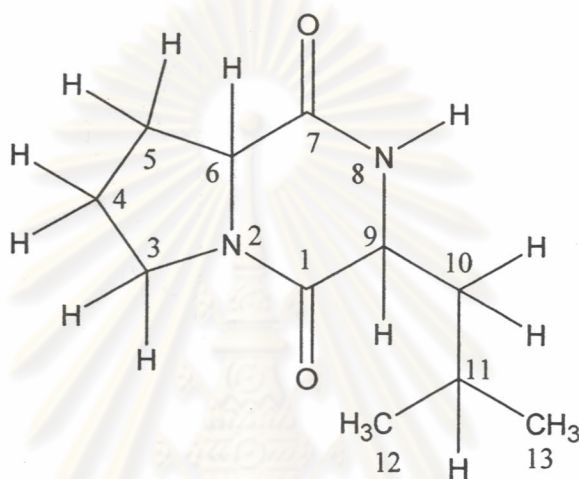
ตารางที่ 4.13 ข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 2

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}),	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	gHMBC	gCOSY	gNOESY
1	166.2	-	-	-	-
2	NH	-	-	-	-
3	45.6	3.61 (2H, m, 3-H)	C-2, C-3, N-4	H-3	H-4
4	22.8	2.06 (1H, m, 4-H)	C-3	H-3, H-5	H-3, H-5
		1.94 (1H, m, 4-H)	C-3	H-3, H-5	H-3
5	28.2	2.39 (1H, ddd, $J = 2.8, 7.2$ และ 13.2 Hz, 5-H)	C-4, C-5	H-4	H-4, H-6
		2.17 (1H, m, 5-H)	C-4, C-5	H-4	H-4
6	59.0	4.10 (1H, dd, $J = 8.0$ และ 8.8 Hz, 6-H)	C-3, C-4, C-7	-	-
7	170.2	-	-	-	-
8	NH	-	-	-	-
9	53.4	4.06 (1H, dd, $J = 3.2$ และ 10 Hz, 9-H)	C-1, C-10, C-11	H _a -10	H-10, H-13
10	38.6	2.10 (1H, m, 10-H _a)	C-1, C-9, C-11, C-12, C-13	H-9, H-11, H-12, H-13	H-9, H-13
		1.56 (1H, ddd, $J = 4.8, 9.9$ และ 10 Hz, 10-H _b)	C-1, C-9, C-11, C-12, C-13	H-11	H-9, H-13
11	24.7	1.76 (1H, m, 11-H)	C-12, C-13	H-10, H-12, H-13	H-12, H-13
12	23.4	1.04 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 12-H)	C-10, C-11, C-13	H-11	H-10, H-11, H-13
13	21.2	0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 13-H)	C-10, C-11, C-12	H-11	H-9, H-10, H-11, H-12

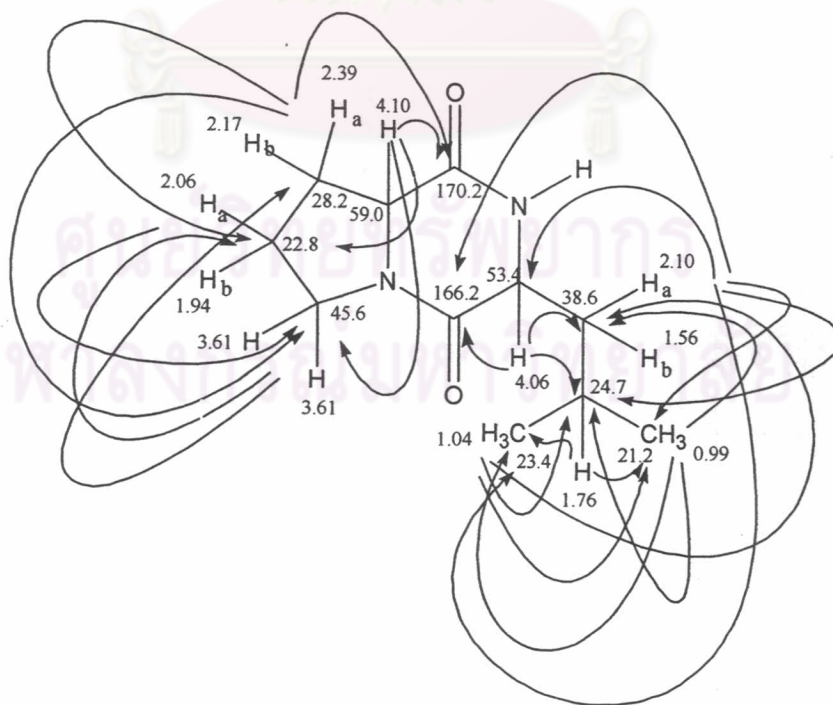
ตารางที่ 4.14 ค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}) ของสารประกอบ 2 เทียบกับ Cyclo(L-Leu-L-Pro)
(Yan และคณะ, 2004 และ Adamczeski และคณะ, 1995)

ตำแหน่ง	สารประกอบ <u>2</u> (CDCl_3 , 400 MHz)		Cyclo(L-Leu-L-Pro) (CDCl_3 , 500 MHz)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	-	166.2	-	166.1
2	-	NH	-	-
3	3.61 (2H, m, 3-H)	45.6	3.56 (2H, m, 3-H)	45.4
4	2.06 (1H, m, 4-H)	22.8	1.98-2.09 (2H, m, 4-H)	22.7
	1.94 (1H, m, 4-H)		1.90 (1H, m, 4-H)	
5	2.39 (1H, ddd, $J = 2.8, 7.2$ และ 13.2 Hz, 5-H)	28.2	2.35 (1H, dddd, $J = 3.2,$ 8.0, 8.0 และ 12.8 Hz, 5-H)	28.1
	2.17 (1H, m, 5-H)		2.13 (1H, m, 5-H)	
6	4.10 (1H, dd, $J = 8.0$ และ 8.8 Hz, 6-H)	59.0	4.11 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, 6- H)	59.0
7	-	170.2	-	170.1
8	-	NH	-	-
9	4.06 (1H, dd, $J = 3.2$ และ 10 Hz, 9-H)	53.4	4.01 (1H, dd, $J = 3.4$ และ 9.6 Hz, 9-H)	53.4
10	2.10 (1H, m, 10-H)	38.6	1.98-2.09 (2H, m, 10-H)	38.6
	1.56 (1H, ddd, $J = 4.8, 9.9$ และ 10 Hz, 10-H)		1.52 (1H, ddd, $J = 5.0, 9.6$ และ 14.8 Hz, 9-H)	
11	1.76 (1H, m, 11-H)	24.7		24.7
12	1.04 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 12- H)	23.4	1.00 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, 12- H)	23.3
13	0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 13- H)	21.2	0.96 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 13-H)	21.2

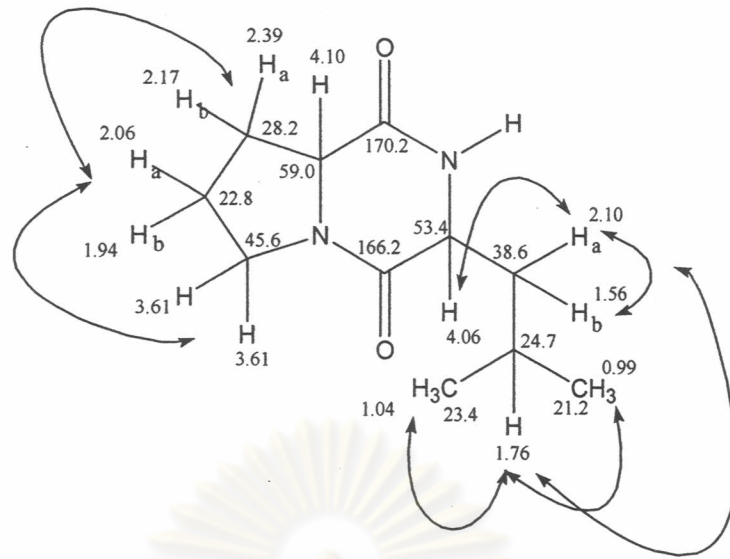
จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY (รูปที่ 15-18 ในภาคผนวก ค) ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.13 ข้อมูลจากแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) และการเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ 2 กับ Cyclo(L-Leu-L-Pro) (Pei-Sheng และคณะ, 2004 และ Madeline และคณะ, 1995) พบว่าสารทั้งสองมีค่าเคมีคัลชิฟท์ใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 2 คือ Cyclo(L-Leu-L-Pro) หรือ 3-isobutyl-hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.16-4.19



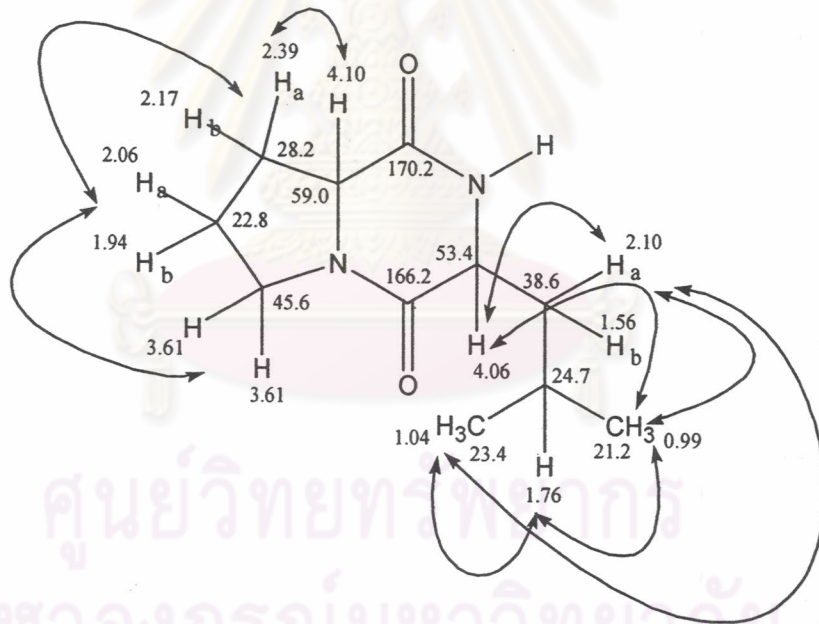
รูปที่ 4.16 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 2



รูปที่ 4.17 gHMBC ของสารประกอบ 2



รูปที่ 4.18 gCOSY ของสารประกอบ 2



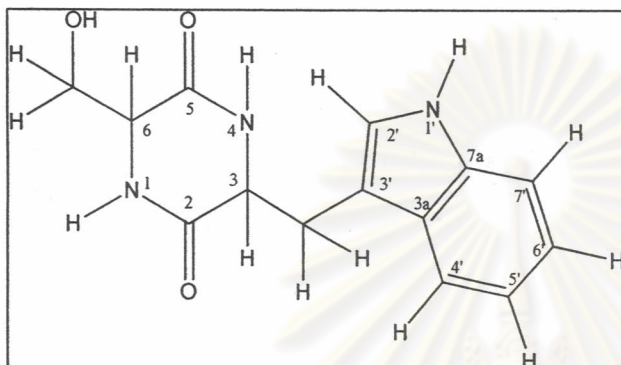
รูปที่ 4.19 gNOESY ของสารประกอบ 2

Cyclo (L-Leu-L-Pro) เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพบได้ราและไซยาโนแบคทีเรีย (Pei-Sheng และคณะ, 2004 และ Madeline และคณะ, 1995) มีรายงานศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าว โดยสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HPLC พบว่าสามารถยับยั้งการผลิตสาร aflatoxin และการเจริญของ *Aspergillus parasiticus* (Pei-Sheng และคณะ, 2004)

4.7.5 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 3

4.7.5 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 3

สารประกอบ 3 เป็นของแข็งสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE20 ของสารสกัดหยาบเอซิลแอซิเตดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 4-6% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกของแข็งโดยการกรองจากนั้นล้างของแข็งที่ได้ด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ได้ของแข็งสีขาวหนัก 5 มิลลิกรัม (สารประกอบ 3) สารประกอบที่ได้มีสมบัติ ดังนี้



ละลายได้ใน MeOH

R_f ของ สารเท่ากับ 0.326 โดยใช้ 15% เมธานอลในไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

m.p. : 245-246 °C

$[\alpha]_D^{20}$: -67 (c 0.050 ใน MeOH)

UV λ_{max} , MeOH (ϵ): 280 นาโนเมตร

(รูปที่ 19 ในภาคผนวก ค)

FT-IR สเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนแสงของการสั่นต่างๆ ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4.15 และรูปที่ 20 ภาคผนวก ค

$^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 400 MHz) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ , ppm): 2.75 (1H, dd, $J = 6.0$ และ 11.2 Hz, $-\text{CH}_2\text{H}_b\text{OH}$), 3.21 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 14.0 Hz, $-\text{CH}_2\text{H}_b$), 3.26 (1H, dd, $J = 3.6$ และ 11.2 Hz, $-\text{CH}_2\text{H}_a\text{OH}$), 3.29 (1H, m, $-\text{CH}_2\text{H}_a$), 3.73 (1H, dd, $J = 3.6$ และ 4.8 Hz, 6-H), 4.13 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 6.0 Hz, 3-H), 6.92 (1H, dd, $J = 7.6$ และ 6.8 Hz, 5'-H), 7.00 (1H, dd, $J = 8.0$ และ 7.2 Hz, 6'-H), 7.02 (1H, s, 3'-H), 7.26 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 4'-H) และ 7.51 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, 7'-H) (รูปที่ 22 ในภาคผนวก ค)

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 100 MHz) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ , ppm): 30.5 ($-\text{CH}_2$), 56.0 (C-3), 57.4 (C-6), 63.4 ($-\text{CH}_2\text{OH}$), 108.6 (C-2'), 110.9 (C-4'), 118.3 (C-7'), 118.7 (C-5'), 121.2 (C-6'), 124.1 (C-3'), 127.5 (C-3a), 136.5 (C-7a), 166.6 (C-5) และ 168.7 (C-2) (รูปที่ 23 ในภาคผนวก ค)

แมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 3 มีมวลโมเลกุล $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 274.1191; cal 274.1191 (รูปที่ 21 ในภาคผนวก ค)

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ 3 ประกอบด้วย gHSQC, gHMBC, gCOSY และ gNOESY แสดงไว้ดังรูปที่ 24-27 ในภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.15 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 3

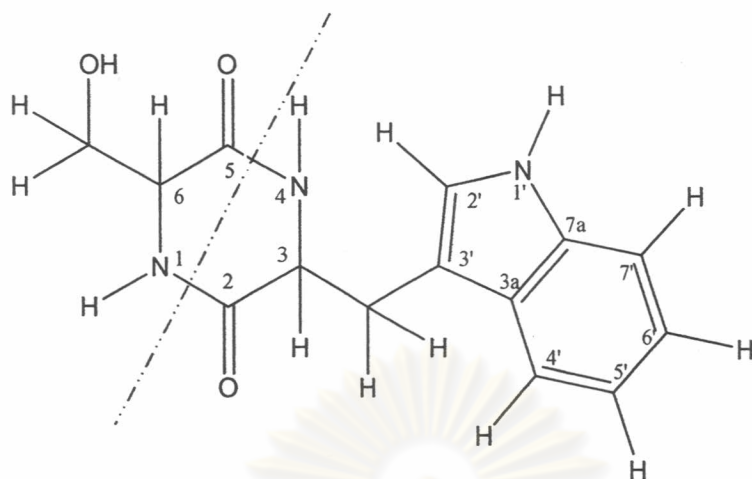
แถบการดูดกลืนแสง (cm ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3430	สูง	N-H, O-H สั้นแบบยืด
2875-3164	ต่ำ	C-H สั้นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1644	สูง	C=O สั้นแบบยืดของ Amide
1450	ปานกลาง	C=C สั้นแบบยืดของ Aromatic
1059-1326	ปานกลาง	C-N สั้นแบบยืดของ Amide
841	ปานกลาง	C-H สั้นแบบงอนอกระนาบ
744	ปานกลาง	N-C=O สั้นแบบงอ

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 3 แสดงในรูปแบบที่ 21 ภาคผนวก ค. พบว่าสารประกอบมีมวลโมเลกุล [M+H]⁺ *m/z*: 274.1191; cal 274.1191 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 3 คือ C₁₄H₁₅N₃O₃ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 9

ข้อมูล ¹³C-NMR และ HSQC แสดงในรูปแบบที่ 14 ภาคผนวก ค. พบ 2 สัญญาณคาร์บอนิลที่ค่าเคมีคอลชิฟต์ δ_c 168.0 และ 170.1 ppm พบ 8 สัญญาณ quaternary olefinic carbon ที่ 110.0, 128.9 และ 137.9 ppm พบ methine olefinic carbon ที่ 112.3, 120.1, 122.6, 119.7 และ 125.5 ppm พบ methylene sp³-carbon ที่ 31.9 และ 64.8 ppm และ พบ methine sp³-carbon ที่ 57.4 และ 58.8 ppm นอกจากนี้จากข้อมูล ¹³C-NMR และค่า DBE ทำให้ทราบว่าสารประกอบ 3 ประกอบด้วย 2 คาร์บอนิล 4 พันธะคู่ และ 3 วง

จากข้อมูล 1D NMR และ 2D NMR ซึ่งประกอบด้วย COSY, TOCSY, HMBC (ตารางที่) สามารถหาการเชื่อมต่ออะตอมภายในโมเลกุลของสารประกอบ 3 ได้เป็นสารประกอบ cyclic dipeptide ชนิดใหม่ เรียกว่า cyclo(Serine-Tryptophan) หรือ 2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-6-(hydroxymethyl)piperazine-2,5-dione ดังแสดงไว้ในรูป

Serine



Tryptophan

จากข้อมูล HMBC สารประกอบ 3 มีความสัมพันธ์ของโปรตอน CH_2OH (δ_{H} 2.85 และ 3.26 ppm) กับ C-5 และ C-6 และของโปรตอน H-6 กับ C-2 และ C-5 ทำให้ทราบว่า C-2 ต่อกับไนโตรเจนของส่วน Serine

จาก COSY พบโปรตอน H-4', H-5' และ -6' อยู่บนคาร์บอนที่เชื่อมต่อกัน และจากข้อมูล HMBC แสดงให้เห็นว่า H-2' มีความสัมพันธ์กับ C-3', C-3a และ C-7a จากข้อมูลของ COSY และ HMBC ประกอบกับค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_{C} และค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_{H} ของสารประกอบ 3 สอดคล้องกับ Tryptophan

จาก HMBC แสดงให้เห็นว่า โปรตอนของ CH_2 (δ_{H} 3.31 และ 3.39 ppm) มีความสัมพันธ์กับ C-2', C-3a, C-3', C-2 และ C-3 จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบถึงการเชื่อมต่อระหว่าง Serine และ Tryptophan

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

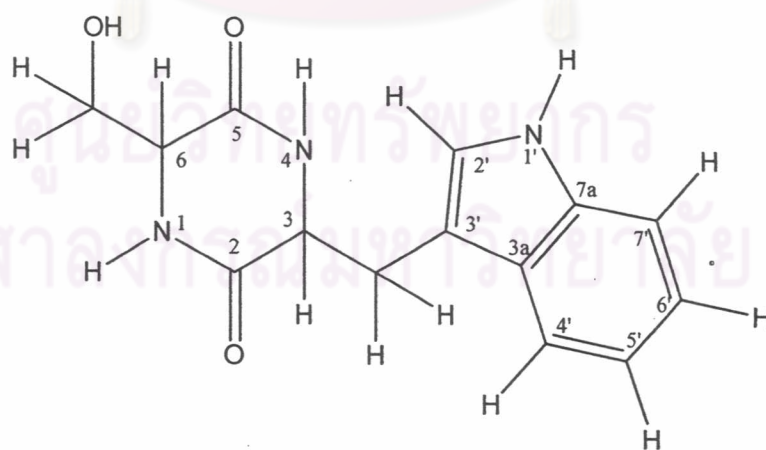
ตารางที่ 4.16 ข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 3

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}),	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	gHMBC	gCOSY	gNOESY
1	NH	-	-	-	-
2	170.1	-	-	-	-
3	57.4	4.23 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 6.0 Hz, 3-H)	C-2, C-5, -CH ₂ , C-3'	-CH ₂	-CH ₂
4	NH	-	-	-	-
5	168.0	-	-	-	-
6	58.8	3.83 (1H, dd, $J = 3.6$ และ 4.8 Hz, 6-H)	C-2, C-5, -CH ₂ OH	-CH ₂ OH	-CH ₂ OH
CH ₂ OH	64.8	3.36 (1H, dd, $J = 3.6$ และ 11.2 Hz, CH ₂ OH)	C-5	H-6	H-6
		2.85 (1H, dd, $J = 6.0$ และ 11.2 Hz, CH ₂ OH)	C-6, C-5	H-6	H-6
CH ₂	31.9	3.39 (1H, m, CH ₂)	C-2, C-3, C-2', C-3', C-3a	H-3	H-3
		3.31 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 14.0 Hz, CH ₂)	C-2, C-3, C-2', C-3', C-3a	H-3	H-3
1'	NH	-	-	-	-
2'	125.5	7.12 (1H, s, 3'-H)	C-3', C-3a, C-7a	-	-
3'	110.0	-	-	-	-
3a	128.9	-	-	-	-
4'	112.3	7.36 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 4'-H)	C-3a, C-5'	H-5'	H-5'

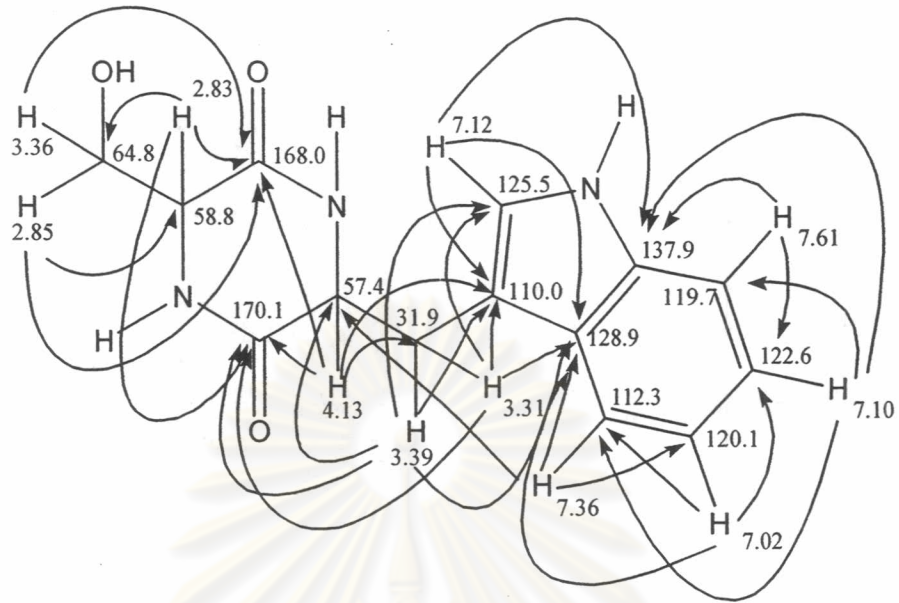
ตารางที่ 4.16 (ต่อ) แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 3

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_c),	$^1\text{H-NMR}$ (δ_H)	gHMBC	gCOSY	gNOESY
5'	120.1	7.02 (1H, dd, $J = 7.6$ และ 6.8 Hz, 5'-H)	C-3a, C-4', C-6'	H-4', H-6'	H-4', H-6'
6'	122.6	7.10 (1H, dd, $J = 8.0$ และ 7.2 Hz, 6'-H)	C-7a, C-4', C-7'	H-5', H-7'	H-5', H-7'
7'	119.7	7.61 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, 7'-H)	C-3a, C-6', C-7a	H-6'	H-6'
7a	137.9	-	-	-	-

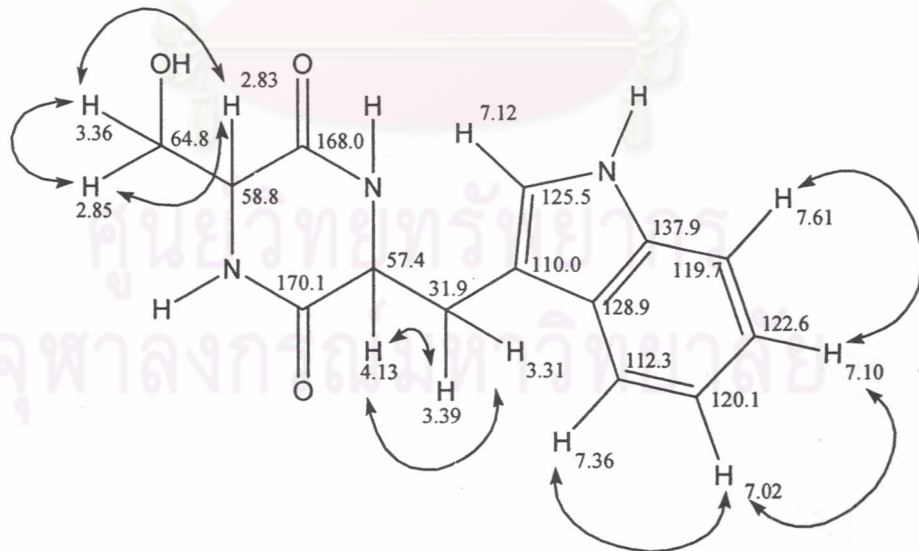
จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY (รูปที่ 24-27 ในภาคผนวก ค) ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.16 และข้อมูลจากแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 3 คือ cyclo(Ser-Tryp) หรือ 2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-6-(hydroxymethyl)piperazine-2,5-dione ซึ่งเป็นสารที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.20-4.23



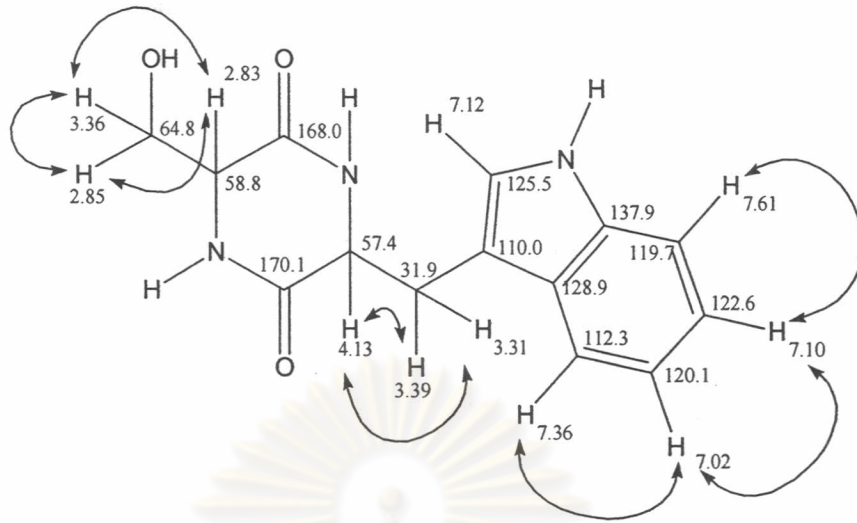
รูปที่ 4.20 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 3



รูปที่ 4.21 gHMBC ของสารประกอบ 3



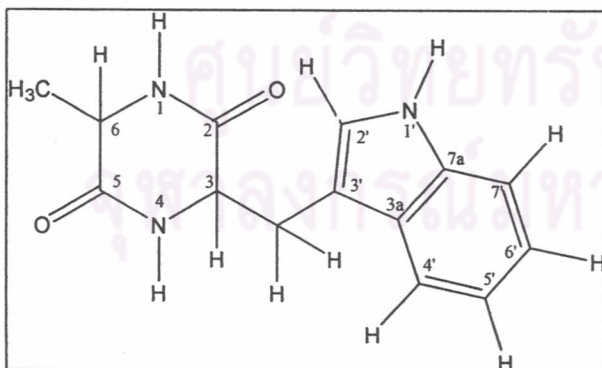
รูปที่ 4.22 gCOSY ของสารประกอบ 3



รูปที่ 4.23 gNOESY ของสารประกอบ 3

4.7.6 การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ 4

สารประกอบ 4 เป็นของแข็งสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ RBE03 ซึ่งได้มาจากการนำ BE18 ของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิติเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกอีกครั้งด้วยเฟลซคอตมันน์โครมาโทกราฟี และใช้ 4-6 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกของแข็งออกมาโดยการกรองจากนั้นล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมธานอล ได้ของแข็งสีขาวหนัก 15 มิลลิกรัม (สารประกอบ 4) สารประกอบที่ได้มีสมบัติ ดังนี้



ละลายได้ใน DMSO, EtOH ผสม H₂O ในอัตราส่วน 1:1 และละลายได้เล็กน้อยใน MeOH;

R_f ของสารเท่ากับ 0.353 โดยใช้ 15 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่
m.p. : 281-282 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +16 (c 0.10 ใน EtOH:H₂O)

UV λ_{max} (EtOH :H₂O) (ε): 279 นาโนเมตร (รูปที่ 28 ในภาคผนวก ก)

FT-IR สเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนแสงของการสั่นต่างๆ ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4.17 และรูปที่ 29 ในภาคผนวก ก

$^1\text{H-NMR}$ spectrum (DMSO, 400 MHz) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ , ppm): 0.01 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_3$), 6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 4'-H), 2.85 (1H, dd, $J = 7$ และ 14.4 Hz, $-\text{CH}_2\text{H}_b$), 2.85 (1H, dd, $J = 4.0$ และ 14.4 Hz, $-\text{CH}_2\text{H}_a$), 3.19 (1H, brq, $J = 7.2$ Hz, 6-H), 3.71 (1H, m, 3-H), 6.54 (1H, dt, $J = 8.0$ และ 7.2 Hz, 4'-H), 6.64 (1H, dt, 6'-H), 6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 4'-H) และ 7.17 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 7'-H) (รูปที่ 31 ในภาคผนวก ค)

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (DMSO, 100 MHz) (รูปที่ 32 ในภาคผนวก ค) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ , ppm): 20.0 ($-\text{CH}_3$), 29.3 ($-\text{CH}_2$), 50.2 (C-6), 55.8 (C-3), 108.9 (C-2'), 111.5 (C-5'), 118.8 (C-4'), 119.4 (C-7'), 121.2 (C-6'), 125.0 (C-3'), 128.2 (C-3a), 136.2 (C-7a), 167.2 (C-2) และ 168.2 (C-5)

แมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 3 มีมวลโมเลกุล $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 258.1239; cal 258.1242 (รูปที่ 30 ในภาคผนวก ค)

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ 4 ประกอบด้วย gHSQC, gHMBC, gCOSY และ gNOESY แสดงไว้ดังรูปที่ 33-36 ในภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.17 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 4

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3407	ปานกลาง	N-H สันแบบยืดของ Amide
2854-3059	ต่ำ	C-H สันแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1673	สูง	C=O สันแบบยืดของ Amide
1461	ปานกลาง	C=C สันแบบยืดของ Aromatic
1320	ปานกลาง	C-N สันแบบยืดของ Amide
841	ปานกลาง	C-H สันแบบงอนอกระนาบ
793	สูง	N-C=O สันแบบงอ

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 4 แสดงในรูปที่ 30 ภาคผนวก ค. พบว่าสารประกอบมีมวลโมเลกุล $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z : 258.1239; cal 258.1242 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 4 คือ $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 9

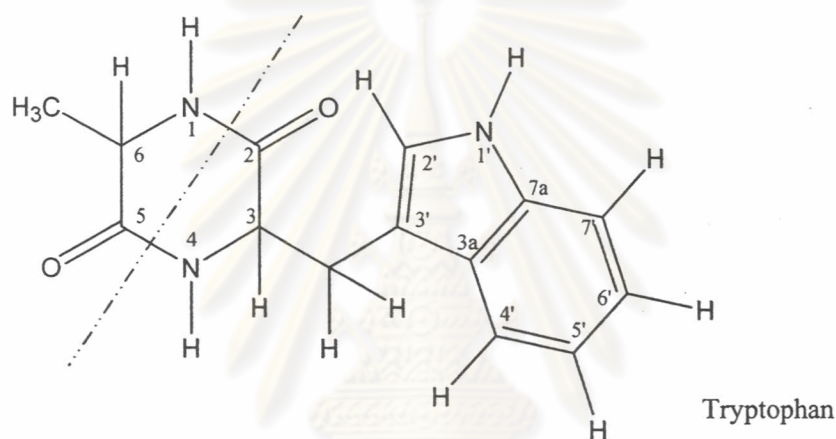
ข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ HSQC แสดงในรูปที่ 32-33 ภาคผนวก ค. พบ 2 สัญญาณคาร์บอนิลที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_c 166.8 และ 167.8 ppm พบ 8 สัญญาณ quaternary olefinic carbon ที่ 108.1, 127.9 และ 135.8 ppm พบ methine olefinic carbon ที่ 111.1, 118.4, 119.0, 120.8, และ

124.6 ppm พบ methylene sp^3 -carbon ที่ 28.9 ppm methine sp^3 -carbon ที่ 49.8 และ 55.4 ppm และ พบ methyl sp^3 -carbon ที่ 19.6 ppm

นอกจากนี้จากข้อมูล ^{13}C -NMR และค่า DBE ทำให้ทราบว่าสารประกอบ 4 ประกอบด้วย 2 คาร์บอนิล 4 พันธะคู่ และ 3 วง

จากข้อมูล 1D NMR และ 2D NMR ซึ่งประกอบด้วย COSY, TOCSY, HMBC (ตารางที่ 4.16) สามารถหาการเชื่อมต่ออะตอมภายในโมเลกุลของสารประกอบ 4 ได้เป็นสารประกอบ cyclic dipeptide ชนิดใหม่ เรียกว่า cyclo(Alanine- Tryptophan) ดังแสดงไว้ในรูป

Alanine



Tryptophan

จากข้อมูล HMBC สารประกอบ 3 มีความสัมพันธ์ของโปรตอน CH_3 (δ_H 0.41 ppm) กับ C-6 และของโปรตอน H-6 กับ คาร์บอน CH_3 และ C-5 และของโปรตอนของ N-1 กับ C-6 และ C-2 ทำให้ทราบว่า C-2 ต่ออยู่กับไนโตรเจนของส่วน Alanine

จาก COSY พบโปรตอน H-4', H-5' และ H-6' อยู่บนคาร์บอนที่เชื่อมต่อกัน และจากข้อมูล HMBC แสดงให้เห็นว่า H-2' มีความสัมพันธ์กับ C-3', C-3a และ C-7a จากข้อมูลของ COSY และ HMBC ประกอบกับค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_C และค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_H ของสารประกอบ 4 สอดคล้องกับ Tryptophan

จาก HMBC แสดงให้เห็นว่า โปรตอนของ CH_2 (δ_H 3.25 ppm) มีความสัมพันธ์กับ C-2', C-3a, C-3', C-2 และ C-3 จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบถึงการเชื่อมต่อระหว่าง Alanine และ Tryptophan

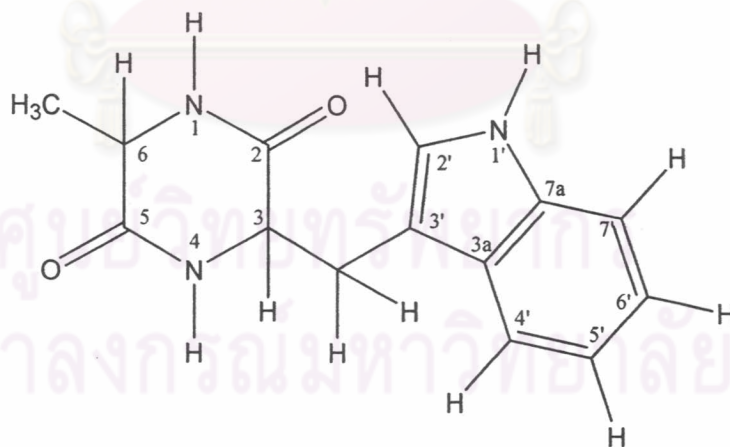
ตารางที่ 4.18 ข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 4

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_c),	$^1\text{H-NMR}$ (δ_H)	gHMBC	gCOSY	gNOESY
1	NH	7.92	C-2, C-6	H-6	H-6
2	166.8	-	-	-	-
3	55.4	4.11 (1H, m, 3-H)	C-2, C-3'	H-4, -CH ₂	H-4
4	NH	8.04	C-3, C-5, C-6	H-3	H-3
5	167.8	-	-	-	-
6	49.8	3.59 (1H, br q, $J = 7.2$ Hz, 6-H)	C-5, -CH ₃	H-1, -CH ₃	H-1
CH ₃	19.6	0.41 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH ₃)	C-6, -CH ₃	H-6	-
CH ₂	28.9	3.25 (1H, dd, $J = 7.6$ และ 14.4 Hz, CH ₂)	C-2, C-3, C-2', C-3', C-3a	H-3	-
		3.25 (1H, dd, $J = 4.0$ และ 14.4 Hz, CH ₂)	C-2, C-3, C-2', C-3', C-3a	H-3	-
1'	NH	10.90	C-2', C-3', C-3a, C-7a	H-2'	H-2'
2' α	124.6	7.05 (1H, m, 3'-H)	C-3', C-3a, C-7a	H-1	H-1
3' β	108.5	-	-	-	-
3a	127.8	-	-	-	-
4'	118.4	6.94 (1H, dt, $J = 8.0$ และ 7.2 Hz, 4'-H)	C-3a, C-5', C-6'	H-5'	-
5'	111.1	7.31 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 4'-H)	C-4', C-3a	H-4', H-6'	H-6'

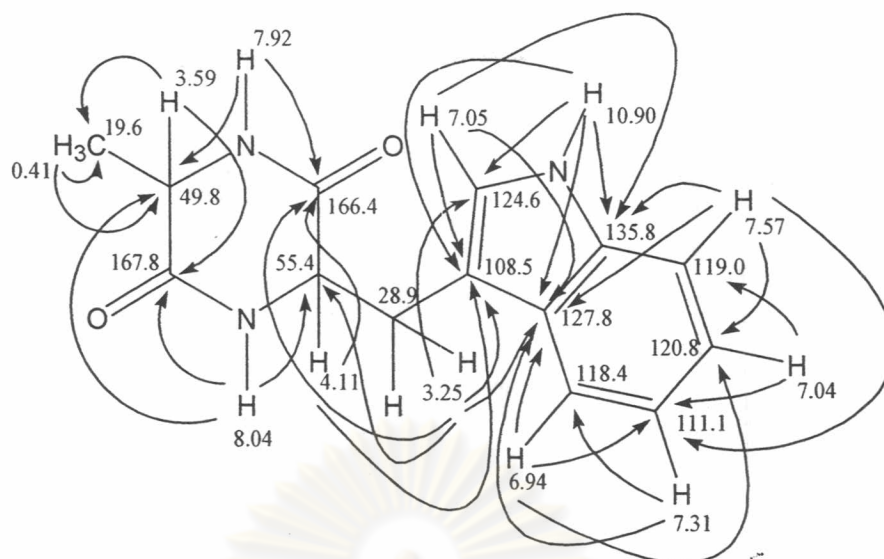
ตารางที่ 4.18 (ต่อ) แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 4

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_c),	$^1\text{H-NMR}$ (δ_H)	gHMBC	gCOSY	gNOESY
6'	120.8	7.04 (1H, dt, 6'-H)	C-5', C-7'	H-5', H-7'	H-5', H-7'
7'	119.0	7.57 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 7'-H)	C-3a, C-5', C-6', C- 7a	H-6'	H-6'
7a	135.8	-	-	-	-

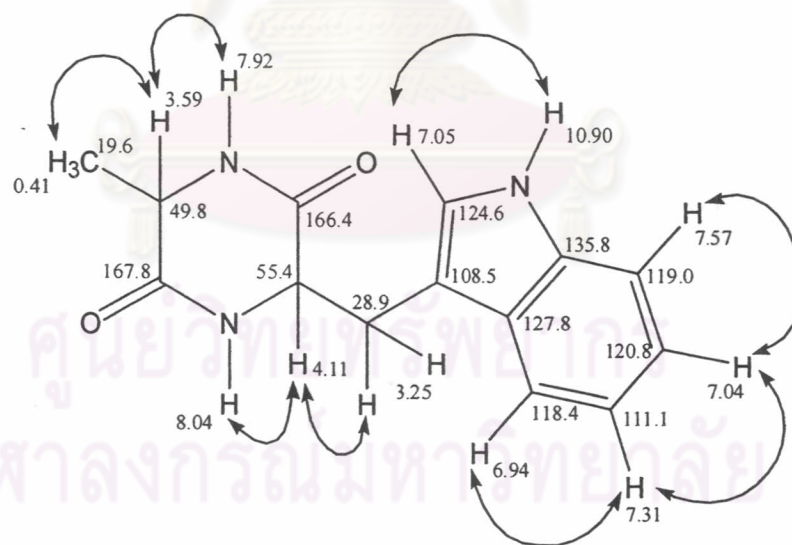
จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY (รูปที่ 33-36) ในภาคผนวก ค ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.18 และข้อมูลจากแมสสเปกตรัม (HRES/TOF spectrum) สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 4 คือ cyclo(Alanine- Tryptophane) หรือ 2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-6-methylpiperazine-2,5-dione ซึ่ง เป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานว่าได้จากธรรมชาติ มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.24-4.27



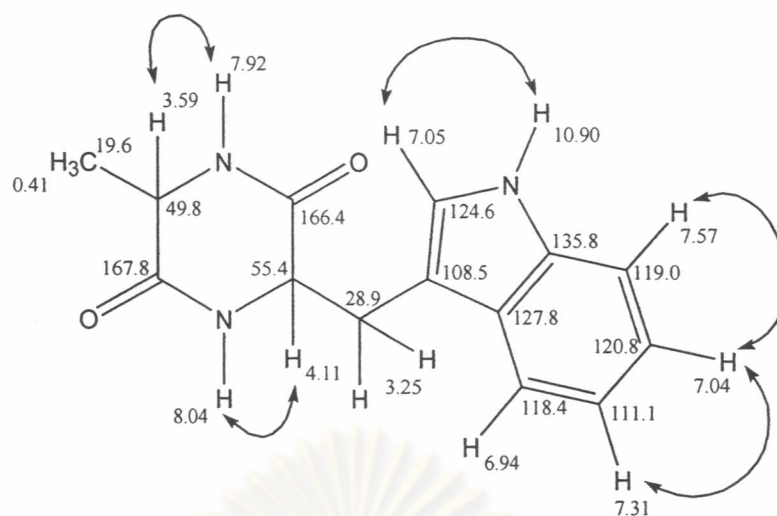
รูปที่ 4.24 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 4



รูปที่ 4.25 gHMBC ของสารประกอบ 4



รูปที่ 4.26 gCOSY ของสารประกอบ 4



รูปที่ 4.27 gNOESY ของสารประกอบ 4

สารในกลุ่ม Diketopiperazines (DKPs) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตมากมาย มีรายงานว่าพบสารในกลุ่มนี้ใน รังไหม (Mitscher และคณะ, 1967) โลกน ฟองน้ำ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา (Madeline และคณะ, 1995) สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมน ตัวพาประจุ สารยับยั้งพิษ และสารปฏิชีวนะ (Yan และคณะ, 2004 และ Adamczeski และคณะ, 1995)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบที่แยกได้ ด้วยวิธี **Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC)** (Jorgensen และคณะ, 1999)

จากสารประกอบที่ทำการแยกได้ คือ สารประกอบ 1, สารประกอบ 2, สารประกอบ 3 และ สารประกอบ 4 นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.19 ค่า MIC ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

สาร	ค่า MIC ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ [$\mu\text{g/ml}$ (μM)]				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
สารประกอบ 1	-	-	-	-	-
สารประกอบ 2	1.96 (9.33)	-	62.5 (297.62)	-	31.25 (148.81)
สารประกอบ 3	15.63 (57.25)	125.0 (457.86)	-	-	1.96 (7.18)
สารประกอบ 4	-	-	62.5 (243.19)	-	62.5 (243.19)
Penicillin G	0.5 (1.40)	0.5 (1.40)	-	-	-
Erythromycin	0.025 (0.03)	0.025 (0.03)	-	-	-
Sulfadimidine	0.5 (1.80)	0.5 (1.80)	-	-	-
Streptomycin	0.5 (0.34)	0.5 (0.34)	0.5 (0.34)	0.5 (0.34)	-
Iprodine	-	-	-	-	50 (30.29)
Ketoconazole	-	-	-	-	50 (18.82)

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งที่ความเข้มข้น $\geq 125 \mu\text{g/ml}$

Penicillin G, Erythromycin, Sulfadimidine คือ positive control ของแบคทีเรียแกรมบวก

Streptomycin คือ positive control ของแบคทีเรียแกรมบวกและลบ

Iprodine, Ketoconazole คือ positive control ของรา

จากตารางที่ 4.17 จะเห็นได้ว่า สารประกอบ 1 ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ในขณะที่สารประกอบ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ที่ความเข้มข้นเพียง 1.96 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อใช้ Penicillin G, Erythromycin, Sulfadimidine และ Streptomycin เป็น positive control และสารประกอบ 3 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ดีกว่า Ketoconazole และ Iprodine ซึ่งใช้เป็น positive control ถึง 2.6 และ 4.2 เท่า ตามลำดับ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย