



ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ราเอนโคไฟต์ที่แยกจากพุลควา

ผลการแยกราเอนโคไฟต์จากพุลควาทั้งหมด 5 จังหวัดได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ราชบุรีและนครปฐม ได้ราเอนโคไฟต์ทั้งหมด 64 ไอโซเลต ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนราเอนโคไฟต์ที่แยกได้จากพุลควา

จังหวัด	จำนวนราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)
เชียงใหม่ (50)	11
เชียงราย (57)	18
ราชบุรี (70)	18
นครปฐม (73)	17
รวม (ไอโซเลต)	64

นำราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ CMA (Corn Meal Agar), MEA (Malt Extract Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) และ YEA (Yeast Extract Sucrose Agar) จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานจนกระทั่งราเจริญเต็มงานเพาะเชื้อ (เนื่องจากเชื้อราแต่ละชนิดมีระยะเวลาการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน) และปล่อยให้ทิ้งไว้นาน 30 วัน เพื่อดูลักษณะของราเอนโคไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆที่แยกได้ เช่นลักษณะของรา สีของเส้นใย สรีรกวัตถุ การสร้างสปอร์ ซึ่งลักษณะต่างๆของราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ (ภาคผนวก ข ตารางที่ 4.2-4.5) และรูปตัวอย่างราเอนโคไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ(ภาคผนวก ข รูป 4.1-4.16)

จากการทดลองเลี้ยงราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างชนิดกัน พบว่าอาหารจะมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ลักษณะของโคโลนีและสีของเส้นใย รวมไปถึงการสร้างสรีรกวัตถุ (pigment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดได้ไม่เท่ากัน เนื่องจากในอาหารแต่ละชนิดนั้นจะมีธาตุอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ต่างกันด้วย

จากการจัดจำแนกราเอนโคไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้โดยการทำ slide culture แล้วย้อมด้วยแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (Lactophenol Cotton Blue) พบว่าราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดแบ่งได้เป็น 6 ประเภทดังแสดงในตารางที่ 4.6 และลักษณะราเอนโคไฟต์ที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.17-4.22

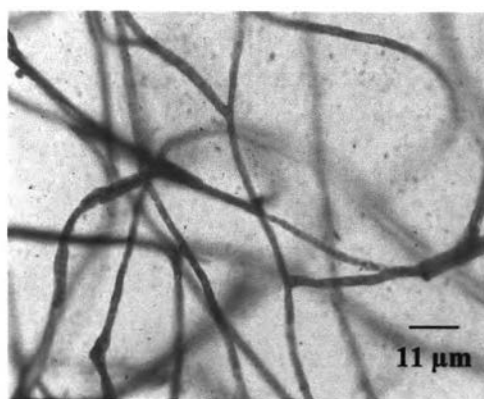
ตารางที่ 4.6 การจัดจำแนกราเอนโคไฟต์ที่แยกได้จากพลูควา

ชนิดราเอนโคไฟต์	Isolates*	จำนวนที่พบ	% ที่พบ
<i>Mycelia Sterilia</i>	50MLY-1, 50MLY-3, 50MLM-3, 50MLM-4, 50CLM-1, 50S-1, 50S-2, 50S-4, 50S-6, 57CLM-3, 57S-1, 57S-3, 57S-4, 57S-6, 57S-7, 57S-9, 57S-10, 57MLM-4, 57MLM-7, 57MLM-9, 57MLM-10, 57MLM-12, 57MLM-13, 57MLM-14, 70MLM-1, 70CLY-1, 70S-1, 70 S-4, 70 S-6, 70 S-7, 70 S-8, 70S-9, 70S-11, 70MLM-11, 70CLM-1, 70CLM-3, 70CLM-5, 70CLM-6, 70MLY-1, 73MLM-1, 73MLM-3, 73S-1, 73S-2, 73CLY-1, 73CLY-2, 73CLY-5, 73CLM-2, 73CLM-3, 73CLM-5, 73CLM-6, 73CLM-7, 73CLM-8, 73CLM-10, 73CLM-11, 73CLM-12	55	85.94
<i>Fusarium sp.</i>	57S-8, 70S-2	2	3.13
<i>Phomopsis sp.</i>	57MLY-1, 57MLM-10, 57MLM-11, 70CLY-2	4	6.25
<i>Nodulisporium sp.</i>	73MLM-5	1	1.56
<i>Bipolaris sp.</i>	50MLM-2	1	1.56
<i>Alternaria sp.</i>	50MLY-5	1	1.56

หมายเหตุ * รหัสไอโซเลต ตัวอย่างเช่น 50MLY-1 มีความหมายดังนี้ รหัส 2 ตัวแรก (50) หมายถึง รหัสจังหวัด, รหัส 3 ตัว (MLY) หมายถึง รหัสตำแหน่งของใบ และ ตัวเลข (1) หมายถึง ลำดับที่

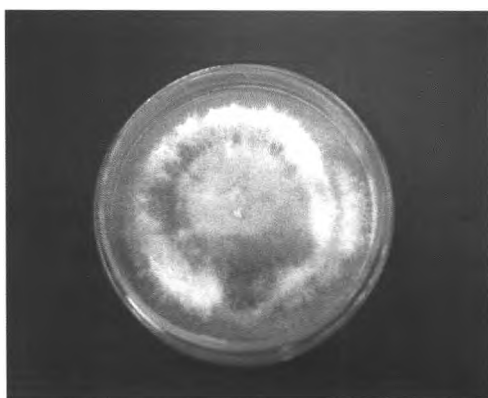


A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน PDA อายุ 14 วัน

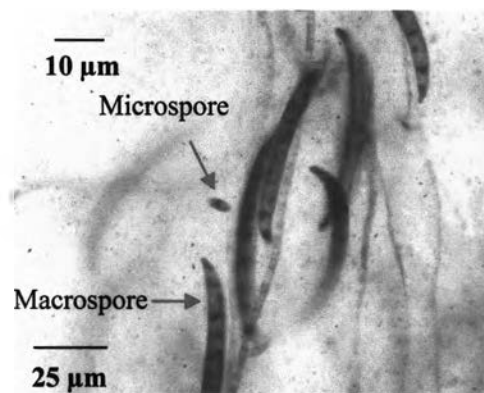


B. mycelia

รูปที่ 4.17 ราเอนโคไฟต์ Mycelia Sterilia isolate 50MLM-2

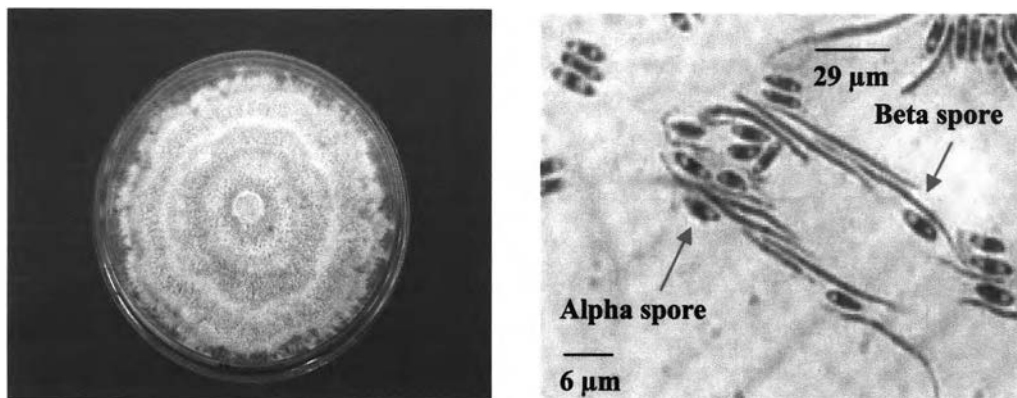


A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน PDA อายุ 14 วัน



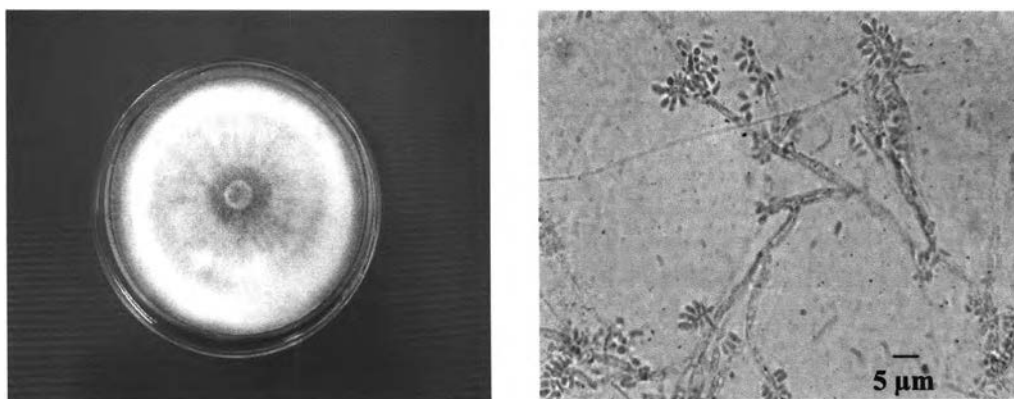
B. Macrospore และ Microspore

รูปที่ 4.18 ราเอนโคไฟต์ *Fusarium* sp. isolate 57S-8



A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน MEA อายุ 18 วัน

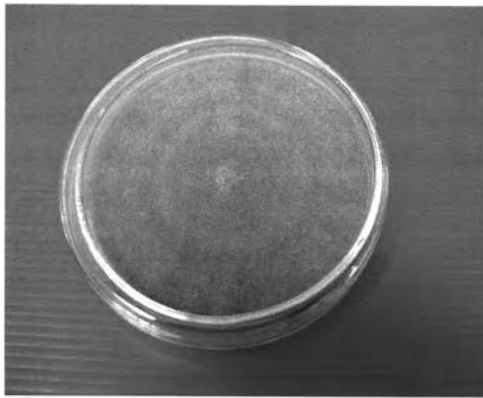
B. Alpha and beta conidia

รูปที่ 4.19 ราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. isolate 57MLM-11

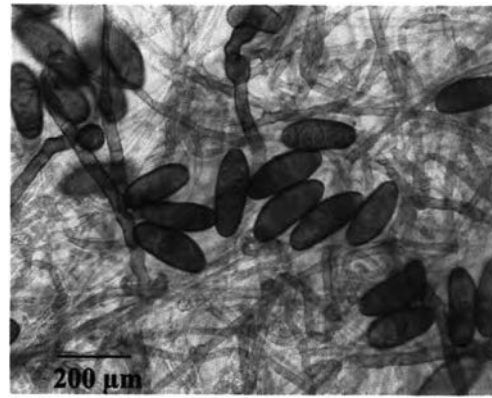
A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน PDA อายุ 16 วัน

B. conidia

รูปที่ 4.20 ราเอนโดไฟต์ *Nodulisporium* sp. isolate 73MLM-5



A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน PDA อายุ 16 วัน

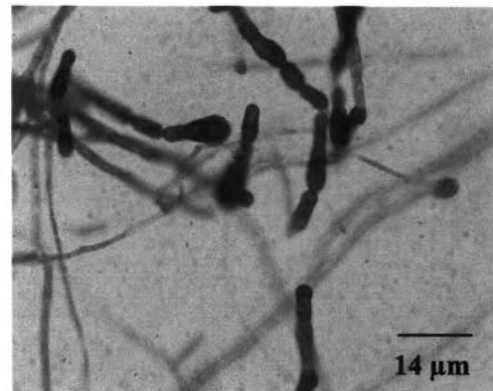


B. conidia

รูปที่ 4.21 ราเอนโดไฟต์ *Bipolaris* sp. isolate 50MLM-2



A. ลักษณะโคโลนีเจริญบน PDA อายุ 16 วัน



B. conidia

รูปที่ 4.22 ราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. isolate 50MLY-5

4.2 การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

โดยการคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ CMA, MEA, PDA, SDA และ YEA จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้แสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารต่างชนิดกัน*

ราเอนโคไฟต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสล้อมรอบจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร)				
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
50CLM-1	MEA	9	-	-	-	8
50MLY-5	MEA	10				
	YEA	9	-	13	-	-
57MLM-10	PDA	8.5	-	9	-	-
	MEA	9	-	-	-	-
57MLM-13	PDA	-	-	9	-	-
	SDA	-	9	-	-	-
57S-4	MEA	9	-	-	-	-
	YEA	9.5	-	-	-	-
	SDA	8	-	-	-	-
57S-7	CMA	8	-	-	-	-
	YEA	10	-	-	-	-
	SDA	8.5	-	-	-	-
57S-8	MEA	9.5	8	-	-	-
	YEA	9	9	-	-	-
70CLY-2	MEA	-	-	-	8	9
	YEA	-	-	-	7.5	8
70S-2	MEA	9	-	8	-	8
70S-3	YEA	-	-	9	-	8
	PDA	-	-	9.5	-	8
70S-9	MEA	-	-	-	8.5	-
	PDA	-	-	-	8	-

ตารางที่ 4.7 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโคไฟต์ที่แยกได้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารต่างชนิดกัน*

ราเอนโคไฟต์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสล้อมรอบจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร)				
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
73MLM-1	MEA	10	-	-	-	-
	YEA	8	-	-	-	-
73MLM-5	PDA	9	-	-	-	-
73S-1	YEA	10	-	-	-	-
73S-2	MEA	9	-	8	-	-

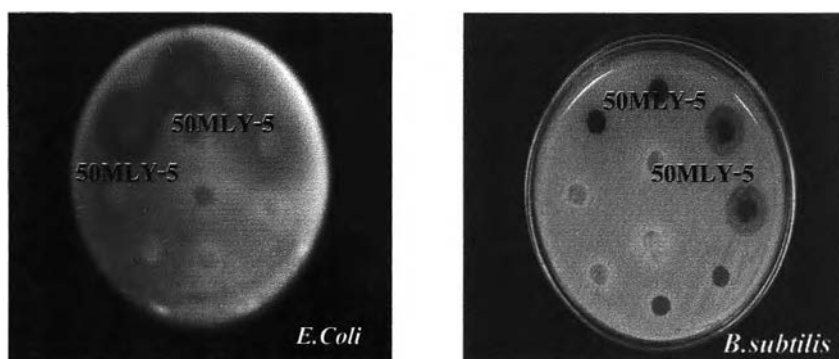
หมายเหตุ (-) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

CMA (Corn Meal Agar), MEA (Malt Extract Agar), PDA (Potato Dextrose Agar)
SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) และ YEA (Yeast Extract Sucrose agar)

* ทดสอบด้วยวิธี Dual culture agar diffusion method

พบว่าราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดในการทดลอง โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เป็นวงใส 13 มิลลิเมตร และ *B. subtilis* ได้ 9 มิลลิเมตร ในอาหารแข็งชนิด YEA (รูปที่ 4.22) และยังยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ 10 มิลลิเมตร ในอาหารแข็งชนิด MEA รองลงมาคือราเอนโคไฟต์ 57 S-8 ในอาหารแข็ง MEA และ YEA สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* 9.5, 9 มิลลิเมตร และ *C. albican* 8, 9 มิลลิเมตร ราเอนโคไฟต์ 70CLY-2 ในอาหารแข็ง YEA และ MEA สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ได้ 8, 7.5 มิลลิเมตร และ 9, 8 มิลลิเมตร ตามลำดับ

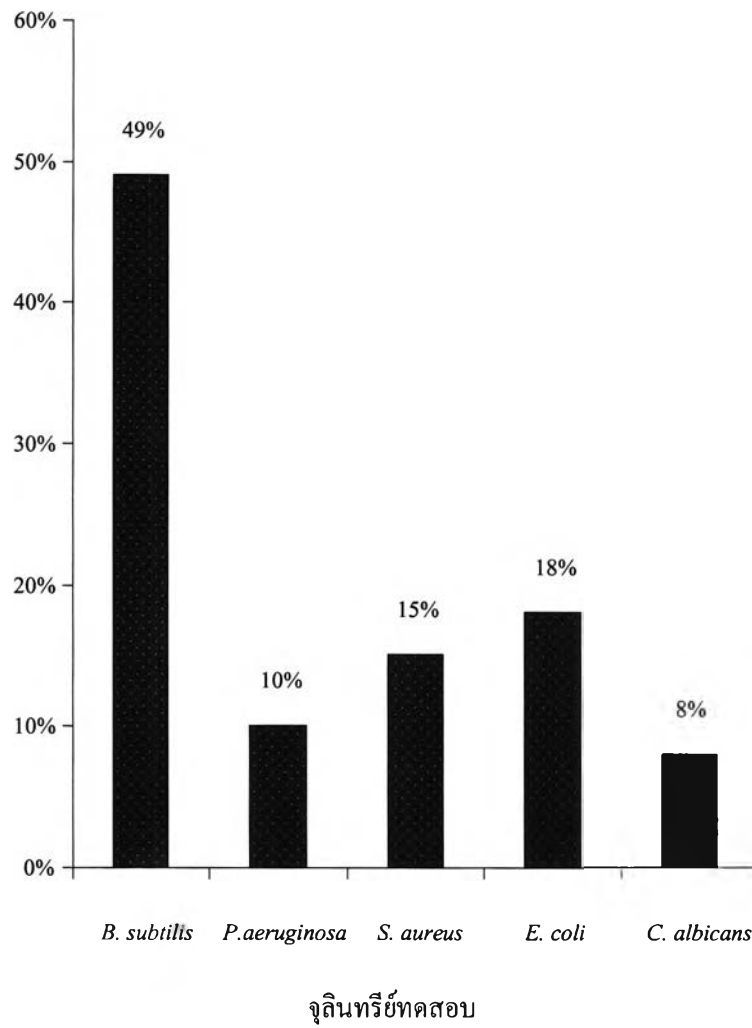
ดังนั้นจึงเลือกราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดในอาหารแข็ง YEA



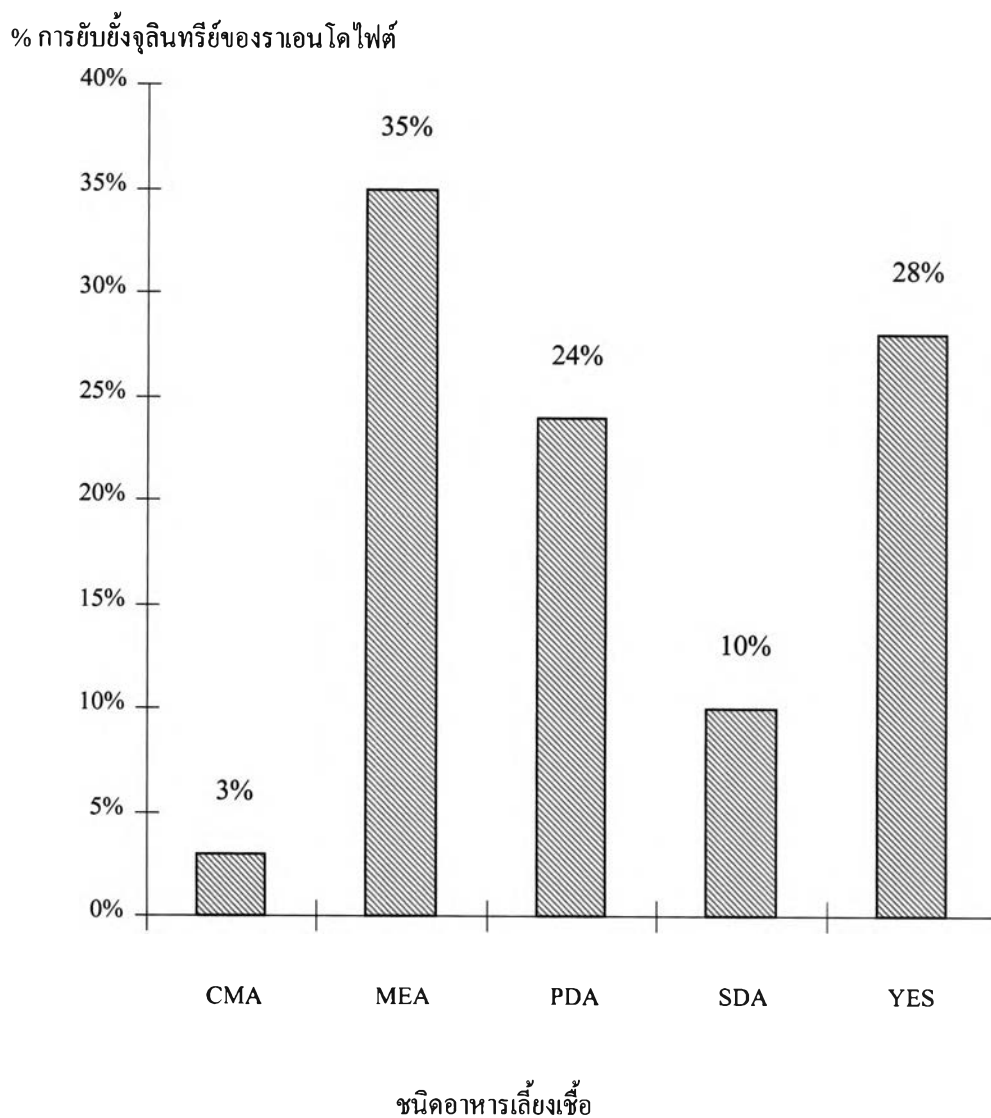
รูปที่ 4.23 แสดงฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ของราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ในอาหารแข็ง YEA

จากผลการทดลองเมื่อคำนวณหา % ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดว่ามีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ใดได้ดีที่สุด พบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* 49 % , *E. Coli* 18 % , *S.aureus* 15 % , *P. aeruginosa* 10 % และ *C. albican* 8 % ตามลำดับ (แผนภาพที่ 4.1) และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่เหมาะสมในการสร้างสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดในการทดลองครั้งนี้ คือ MEA 35 % , YEA 28% , PDA 24 % , SDA 10 % และ CMA 3 % ตามลำดับ (แผนภาพที่ 4.2)

% ราเอน โคไฟต์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์



แผนภาพที่ 4.1 แสดงผลการการยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอน โคไฟต์ที่แยกได้

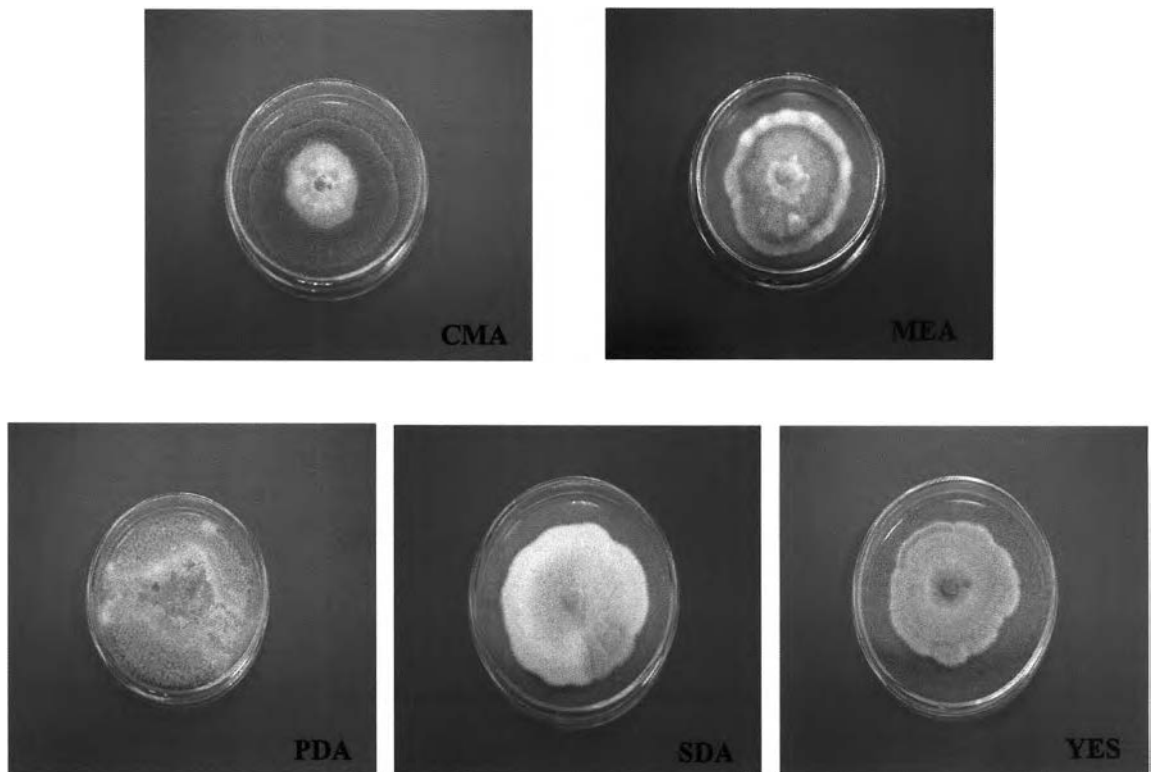


แผนภาพที่ 4.2 แสดงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมด

4.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ 50MLY-5

4.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ 50MLY-5

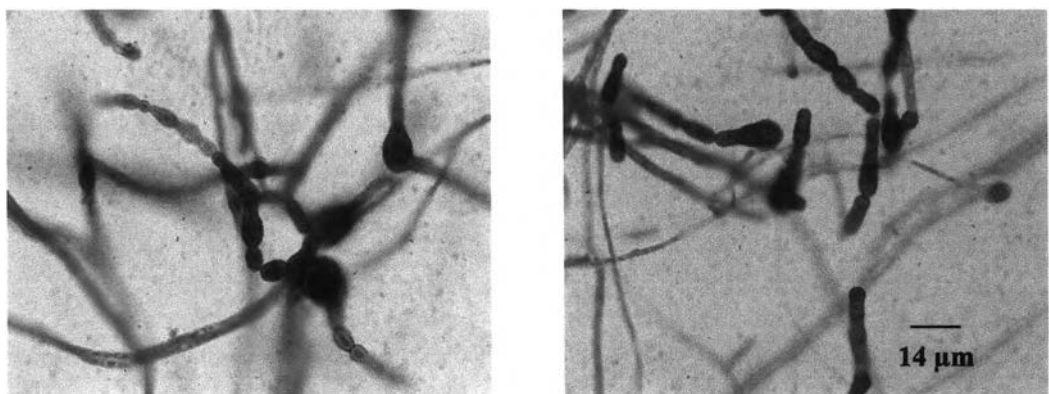
เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟต์ 50MLY-5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันในระยะเวลา 14 วัน (รูปที่ 4.23) พบว่าลักษณะของราเอนโดไฟต์ เช่น สีของเส้นใยและลักษณะของเส้นใย สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ อัตราการเจริญเติบโตจะแตกต่างกัน โดยสีของอาหารแข็ง CMA และ YES จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้น ส่วนในอาหาร PDA ราเอนโดไฟต์จะมีอัตราการเจริญเร็วที่สุด สำหรับลักษณะของเชื้อราแสดงในตารางที่ 4.2 (ภาคผนวก ข)



รูปที่ 4.24 ภาพแสดงลักษณะโคโลนีของราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 อายุ 14 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
แข็งชนิดต่างๆ

นำราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 มาทำ slide culture เทคนิคย้อมด้วย lactophenol blue เพื่อดู
ลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

พบว่าราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 สร้างสปอร์ได้ในอาหาร PDA เมื่อเลี้ยงนาน 7 เดือน ผล
แสดงดังรูปที่ 4.25 ซึ่งลักษณะของสปอร์จะมีลักษณะต่อกันเป็นสายยาว



รูปที่ 4.25 ลักษณะสปอร์ของราเอนโคไฟต์ 50MLY-5

จากการพิสูจน์ทางอณูชีววิทยา เมื่อเทียบส่วน ITS region ของราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 กับข้อมูลใน GenBank พบว่า เหมือนกับราเอนโคไฟต์ *Alternaria* sp. 100% ดังนั้นจึงจัดราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 เป็น *Alternaria* sp. (แผนภาพที่ 4.3)

```

          10          20          30          40          50
CGTAGGTGAA CCTGCGGAGG GATCATTACA CAAATATGAA GCGGGGCTGG
AATCTCTCGG GGTTACAGCC TTGCTGAATT ATTCACCCTT GTCTTTTGCG
TACTTCTTGT TTCCTTGGTG GGTTCGCCCA CCACTAGGAC AACATAAAC
CTTTTGTAAT TGCAATCAGC GTCAGTAACA AATTAATAAT TACAACCTTC
AACAAACGGAT CTCTTGGTTC TGGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG
ATAAGTAGTG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC
ACATTGCGCC CTTTGGTATT CCAAAGGGCA TGCCTGTTCG AGCGTCATTT
GTACCCTCAA GCTTTGCTTG GTGTTGGGCG TCTTGTCTCT AGCTTTGCTG
GAGACTCGCC TTAAAGTAAT TGGCAGCCGG CCTACTGGTT TCGGAGCGCA
GCACAAGTCG CACTCTCTAT CAGCAAAGGT CTAGCATCCA TTAAGCCTTT
TTTCAACTTT TGACCTCGGA TCAGGTAGG

```

แผนภาพที่ 4.3 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโคไฟต์ 50MLY-5

ข้อมูลลำดับ DNA ส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 อยู่ใน GenBank หมายเลข DQ459367

รายงานวิจัยเกี่ยวกับสารเมแทบอลิต์ทุติภูมิที่สร้างจาก *Alternaria* sp. ที่เคยรายงานไว้แล้ว ตัวอย่างเช่น

Suemitsu และคณะ, 1995 รายงานการพบ Zinnimidine and 5-(3',3'-Dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methylphalide จากน้ำเลี้ยงรา *Alternaria porri* สารทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น phytotoxins

Thomas และคณะ, 2003 รายงานการพบสารเมแทบอลิต์ทุติภูมิชนิดใหม่คือ Infectopyrone ซึ่งได้จากเส้นใยรา *Alternaria infectoria* โดยสารนี้มีคุณสมบัติเป็น mycotoxin

Michele และคณะ, 2004 แยกสาร Radicinols and Radicinins จาก *Alternaria radicina* ซึ่งสาร 2 ชนิดนี้จะลดการงอกของรากแครอท

Zhang, H.L. และคณะ, 2005 แยกสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิจากน้ำเลี้ยงรา *Alternaria* sp. ที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตและ n-butanol แล้วแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สาร 6 ชนิดคือ p-benzyloxy-phenol (I), p-hydroxy phenyl ethylamine (II), 3-hydroxymethyl-8-hydroxyl-pyrrolo piperazine-2, 5-dione (III), 3-isobutyl-6-secbutyl-piperazine-2,5-dione (IV), 5alpha, 8alpha-epidioxy-ergosta-6, 22-diene-3beta-ol (V) และ 3beta-hydroxy-cholesta-5-ene (VI) โดยสาร (I), (II) และ (III) พบเป็นครั้งแรกในราจีนัสนี้

4.4 ผลการศึกษาช่วงเวลาการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

เมื่อทำการคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด คือ ราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ในอาหาร YEB ได้แล้ว จากนั้นนำมาหาอัตราการเจริญเติบโต (รูปที่ 4.25) พบว่าในช่วงวันแรกถึงวันที่ 6 รมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 8 รมีอัตราการเจริญสูงสุดแล้วเริ่มลดลงจนถึงวันที่ 12 เนื่องจากปริมาณอาหารที่ใช้เริ่มลดลงหลังจากนั้นรมีอัตราการเจริญคงที่แสดงว่าเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่ราจะมีการสร้างสารเมแทบอลิต์ขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมภายนอกซึ่งสารที่สร้างขึ้นมาเป็นสารที่มีประโยชน์

เมื่อนำราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร YEB มาหาช่วงเวลาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ผลแสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ช่วงเวลาต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

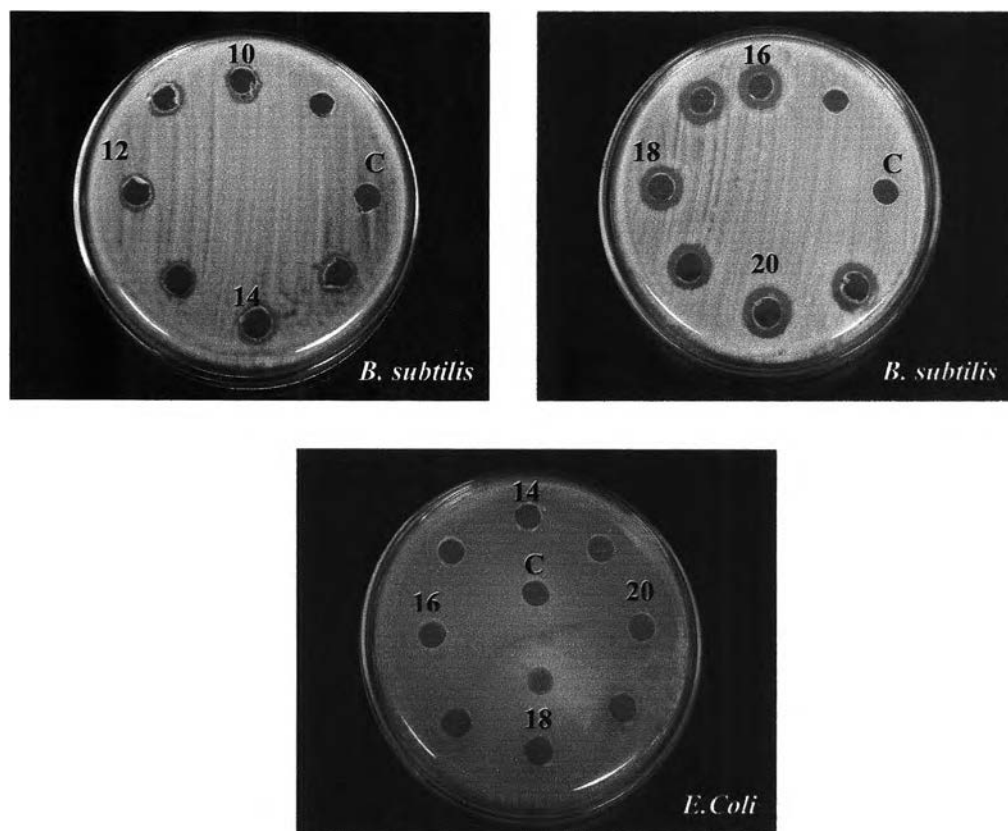
เวลา วัน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสล้อมรอบจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
0	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
10	7.5	-	-	-	-

ตารางที่ 4.8 ช่วงเวลาต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟต์ 50MLY-5 (ต่อ)

เวลา วัน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสล้อมรอบจุลินทรีย์ทดสอบ (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
12	8	-	-	-	-
14	8	-	-	-	-
16	9	-	10.5	-	-
18	9	-	11	-	-
20	10	-	13	-	-
22	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-

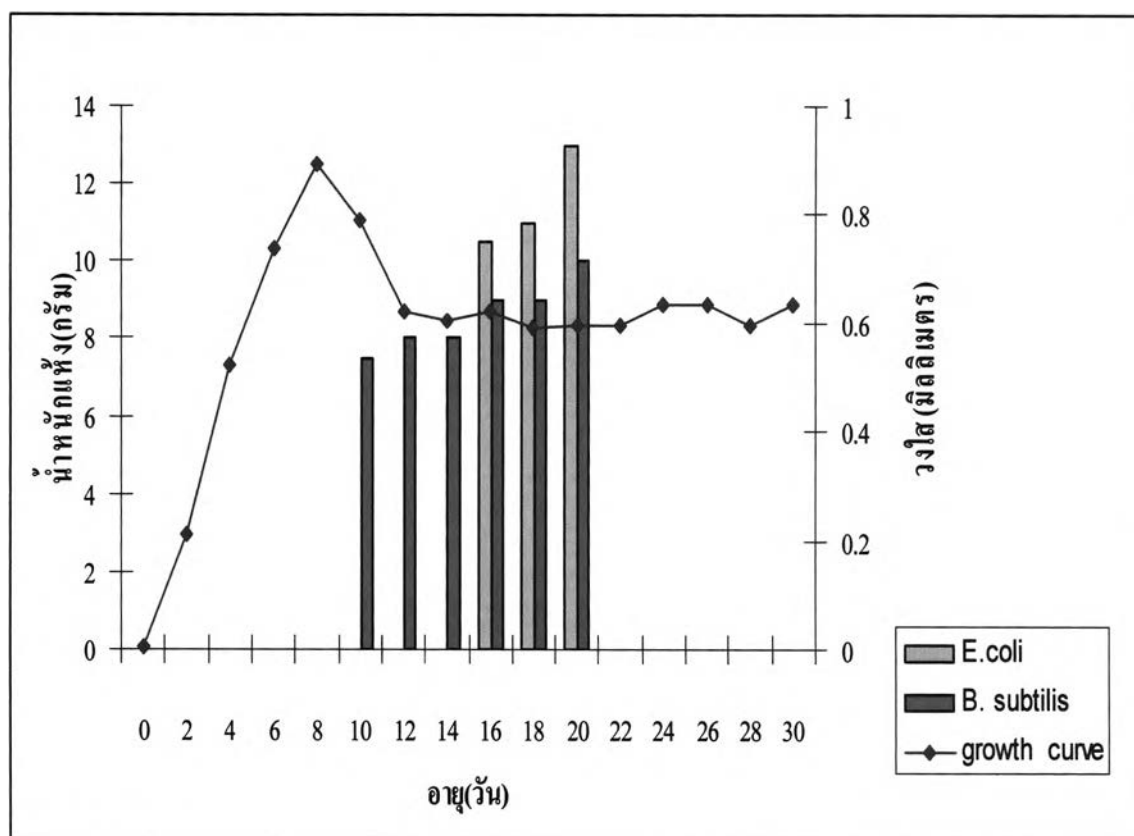
หมายเหตุ (-) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

พบว่าช่วงเวลาต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดคือเมื่อรามีอายุ 20 วัน โดยจะออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดกับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ (รูปที่ 4.26)



รูปที่ 4.26 ภาพแสดงการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟด์ *Alternaria* sp. ที่เลี้ยงในอาหาร YEB ในระยะเวลาต่างกัน

เมื่อนำอัตราการเจริญของราเอนโคไฟด์มาเปรียบเทียบกับช่วงเวลาที่มิฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (รูปที่ 4.27) พบว่าราอายุ 10-14 วัน เริ่มมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* พอราอายุ 16-20 วัน จะมีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* และ *E. coli* โดยวันที่ 20 จะมีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงเลือกเลี้ยงราเอนโคไฟด์ *Alternaria* sp. ที่อายุ 20 วันในอาหาร YEB



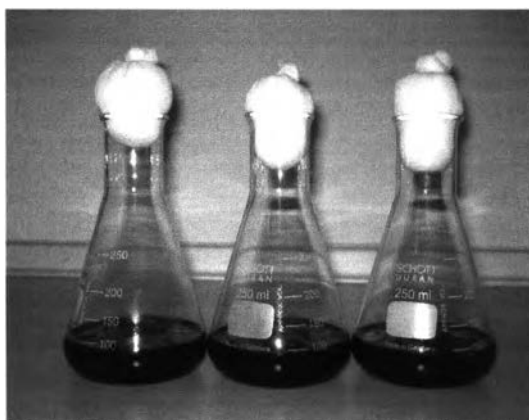
รูปที่ 4.27 แสดงเวลาต่อการสร้างสารเมแทบอลิซึมของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ

นอกจากนั้นได้ทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีอย่างคร่าวๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ YEB ของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่คัดเลือกได้ที่อายุแตกต่างกันคือ 7 วัน 14 วัน 20 วัน และ 28 วัน โดยเทคนิค NMR พบว่าราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. เมื่อมีอายุ 20 วัน มีสารที่น่าสนใจและสามารถแยกออกเป็นสารบริสุทธิ์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดที่อายุ 20 วัน ดังนั้นจึงเลือกที่จะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่อายุ 20 วัน

4.5 ผลการสกัดและการแยกสารประกอบของสารสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

4.5.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

ลักษณะราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 4.28) อายุ 20 วัน พบว่าสีของน้ำเลี้ยงราจะสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำและเส้นใยราสีน้ำตาลลอยอยู่บนผิวอาหาร



รูปที่ 4.28 ภาพแสดงการเจริญของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YEB

4.5.2 การสกัดสารชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

นำราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 4.5.1 มาทำการกรองแยกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงรา แล้วนำทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และเมทานอล ดังแผนภาพที่ 4.4 และลักษณะและปริมาณของสารสกัดหายาที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ลักษณะและปริมาณส่วนสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ในตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	เส้นใย			น้ำเลี้ยงเชื้อ		
	ลักษณะส่วนสกัดหยาบ	น้ำหนัก (กรัม)	% yield (w/v)	ลักษณะส่วนสกัดหยาบ	น้ำหนัก (กรัม)	% yield (w/v)
เฮกเซน	สีน้ำตาลส้ม เหนียวคล้ายน้ำมัน	6.93	3.15 %	สีน้ำตาลส้ม เหนียวคล้ายน้ำมัน	1.03	0.47 %
เอธิลอะซิเตต	สีเหลืองส้ม เหนียวหนืดคล้ายน้ำมัน	0.79	0.35 %	สีน้ำตาลส้ม เหนียวคล้ายน้ำมัน	11.66	5.3 %
เมธานอล	สีดำ ข้นหนืด	4.64	2.11 %	สีดำเหนียว	182.20	82.82 %
ส่วนที่เหลือ	สีน้ำตาลเข้ม ข้นหนืด	31.72	14.42 %	สีดำ ข้นหนืด	40.99	18.63 %

4.6 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของส่วนสกัดหยาบที่ได้จากราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

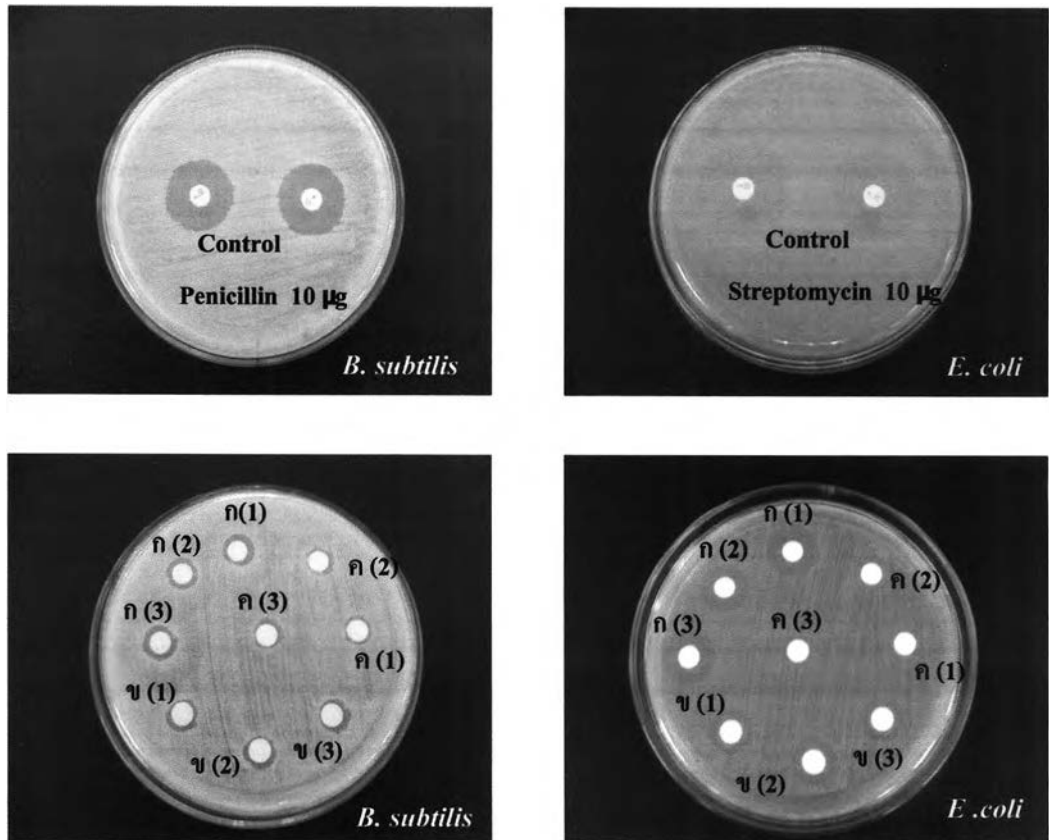
เมื่อนำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด คือ *B. subtilis*, *C. albican*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ทำ 3 ซ้ำ ผลแสดงในตาราง 4.10 พบว่า ครูดเฮกเซนจากเส้นใย ครูดเมธานอลจากเส้นใย ครูดเมธานอลจากน้ำเลี้ยงรา ส่วนที่เหลือจากเส้นใย ส่วนที่เหลือจากน้ำเลี้ยงราที่ความเข้มข้น 200 µg มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ส่วนครูดเฮกเซนจากน้ำเลี้ยงรา ครูดเอธิลอะซิเตตจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราที่ความเข้มข้น 200 µg สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli* ได้ ผลแสดงดังรูปที่ 4.29

ตารางที่ 4.10 ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟด์

Alternaria sp. ความเข้มข้น 200 μ g

ส่วนสกัดหยาบ ความเข้มข้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Inhibition Zone) (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
	ATCC 6633	ATCC 10231	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 25923
เฮกเซนจากเส้นใย	8	-	-	-	-
เฮกเซนจากน้ำเลี้ยงรา	8	-	8	-	-
เอธิลอะซิเตตจากเส้นใย	7.5	-	8	-	-
เอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา	8	-	10	-	-
เมธานอลจากเส้นใย	8	-	-	-	-
เมธานอลจากน้ำเลี้ยงรา	7.5	-	-	-	-
ส่วนที่เหลือจากเส้นใย	8	-	-	-	-
ส่วนที่เหลือจากน้ำเลี้ยงรา	8.5	-	-	-	-

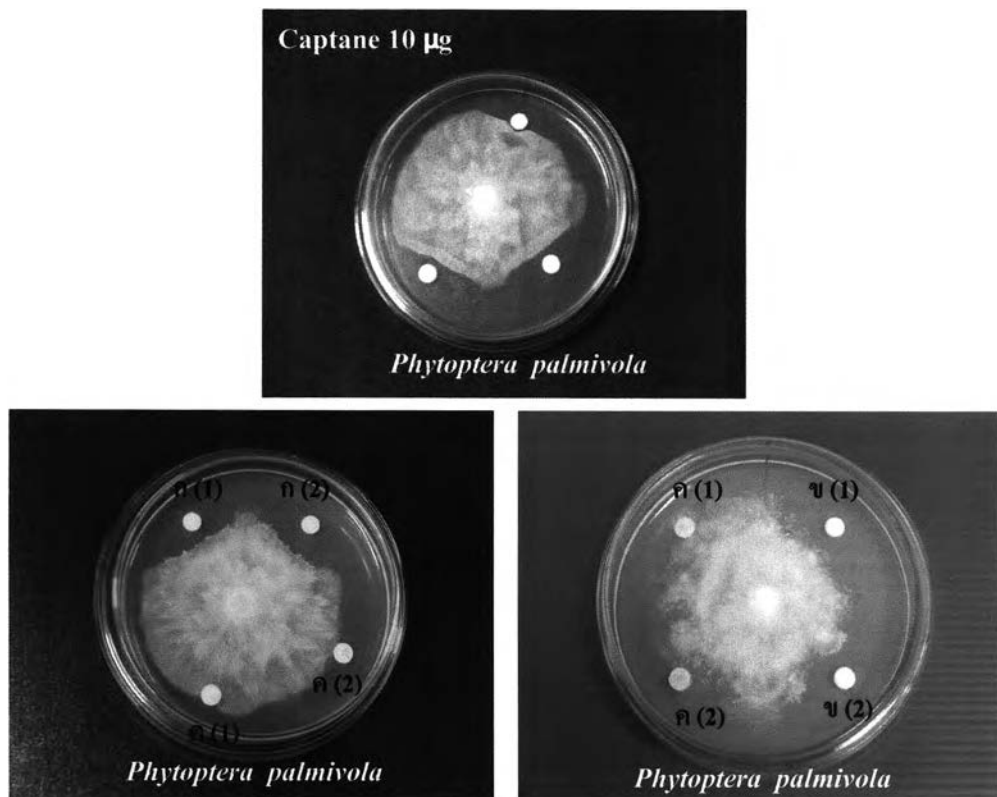
หมายเหตุ (-) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 200 μ g



รูปที่ 4.29 ภาพแสดงการทดสอบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ *Alternria* sp. ความเข้มข้น 200 µg เทียบกับ negative control (10 % DMSO ในน้ำ) และ positive control (Penicillin และ Streptomycin ความเข้มข้น 10 µg ในน้ำ)

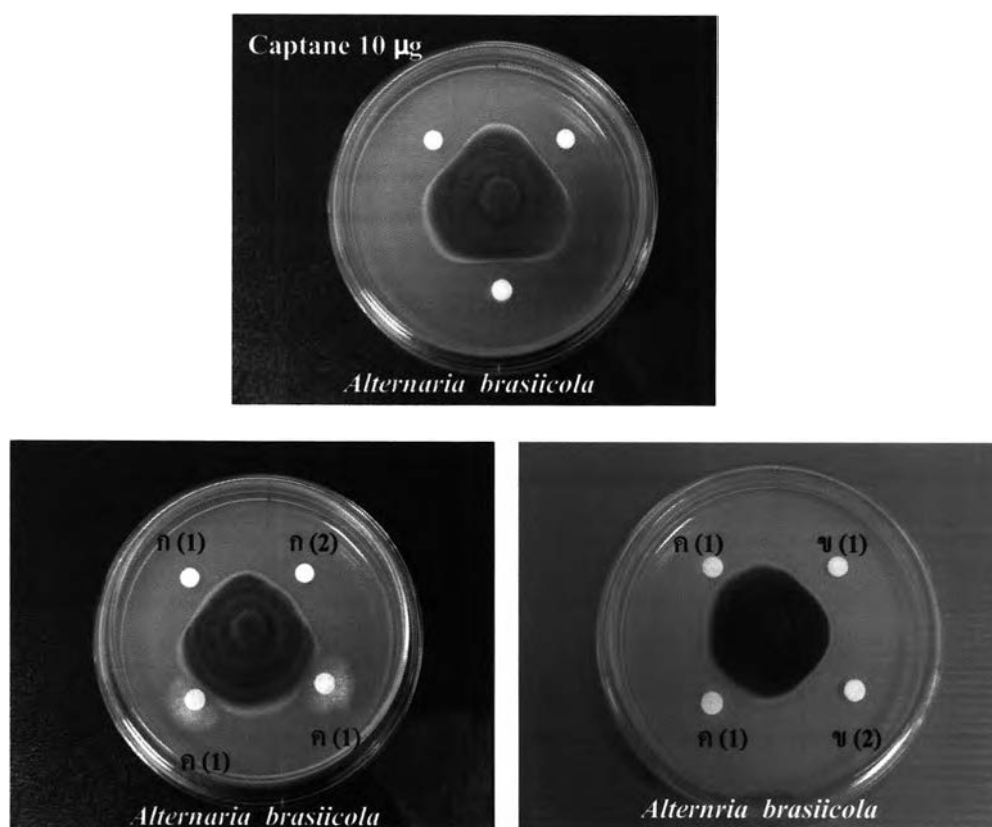
หมายเหตุ ก (1), (2) และ (3): ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยง (ความเข้มข้น 200 µg)
 ข (1), (2) และ (3): ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย (ความเข้มข้น 200 µg)
 ค (1), (2) และ (3): negative control (10 % DMSO ในน้ำ)

รวมทั้งได้ทดสอบเชื้อราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Phytophthora palmivola*, *Alternaria brassicola*, *Collectotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* โดยใช้ Captane, Iprodione และ Ketokonazole ความเข้มข้น 10 µg เป็น positive control และใช้ 10% DMSO ในน้ำ เป็น negative control พบว่าส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราที่ความเข้มข้นความเข้มข้น 200 µg มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช *Phytophthora palmivola* (รูปที่ 4.30) และ *Alternaria brassicola* (รูปที่ 4.31) ได้ตามลำดับ จากการทดลองนี้จึงเลือกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *SOMLY-5* มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีเนื่องจากคาดว่าน่าจะมีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้



รูปที่ 4.30 ภาพแสดงการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งราที่ก่อโรคพืช *Phytophthora palmivola* ของ ส่วนสกัดหยาบจากราแอนโดไฟต์ *Alternaria sp.* ความเข้มข้น 200 µg เทียบกับ Captane ความเข้มข้น 10 µg (positive control)

หมายเหตุ ก (1) และ (2) : ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากน้ำเลี้ยง (ความเข้มข้น 200 µg)
 ข (1) และ (2) : ส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย (ความเข้มข้น 200 µg)
 ค (1) และ (2) : negative control (10 % DMSO ในน้ำ)



รูปที่ 4.31 ภาพแสดงการทดสอบการออกฤทธิ์การยับยั้งราที่ก่อโรคพืช *Alternaria brasiliicola* ของ ส่วนสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์ *Alternaria brasiliicola* ความเข้มข้น 200 µg เทียบ กับ Ketokonazole ความเข้มข้น 10 µg (positive control)

หมายเหตุ ก (1) และ (2) : ส่วนสกัดหยาบเอริลอะซิเตดจากน้ำเลี้ยง (ความเข้มข้น 200 µg)

ข (1) และ (2) : ส่วนสกัดหยาบเอริลอะซิเตดจากเส้นใย (ความเข้มข้น 200 µg)

ค (1) และ (2) : negative control (10 % DMSO ในน้ำ)

จากผลการทดลองได้เลือกส่วนสกัดหยาบเอริลอะซิเตดจากส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. มาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟี เนื่องจากคาดว่าน่ามีสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดยมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตัวชะที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ได้สารทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ สารประกอบ 1 สารประกอบ 2 สารประกอบ 3 สารประกอบ 4 และสารประกอบ 5

4.7 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราการทำให้อริสุทธิและสมบัติทางเคมีของสารประกอบที่ได้จากราเอนโคไฟต์ *Alternaria* sp.

4.7.1 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอริลอะซีเตดจากน้ำเลี้ยงรา

นำส่วนสกัดหยาบเอริลอะซีเตดจากน้ำเลี้ยงรา น้ำหนัก 11.66 กรัม มาทำ partition ด้วยเมธานอล ได้สารสกัดหยาบ 6.95 กรัม และส่วนตะกอนที่ไม่ละลายในเมธานอลปริมาณ 4.41 กรัม (uracil) จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (แผนภาพที่ 4.5) ปริมาณ 5.30 กรัม โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (320 กรัม) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร สูง 80.0 เซนติเมตร ตัวชะที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ได้สารผ่านคอลัมน์ทั้งหมด 55.3 %

ตารางที่ 4.11 การแยกส่วนสกัดหยาบเอริลอะซีเตดจากน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟต์ *Alternaria* sp.

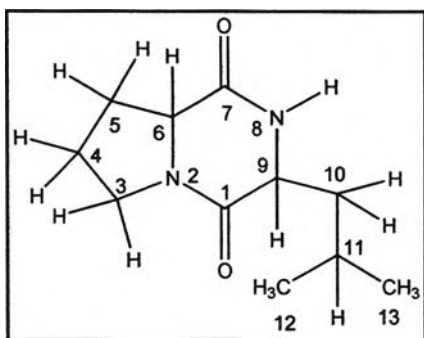
ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-11	BE01	50 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	4.08
12-21	BE02	50 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	2.68
22-34	BE03	50 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	3.64
35-69	BE04	50-40 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	4.41
70-110	BE05	40-30 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	4.28
111-148	BE06	30-10 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	3.37
149-195	BE07	10 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	3.86
196-230	BE08	10-0 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	3.75
231-243	BE09	100 % ไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	33.70
244-274	BE010	100 % ไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	88.63
275-294	BE011	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีดำ	4.07
295-354	BE012	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีดำ	3.52
355-372	BE013	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีดำ	19.7
373-402	BE014	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองปน ของแข็งสีขาว	135.0
403-428	BE015	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองปน ของแข็งสีขาว	80.3

ตารางที่ 4.11 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลเอซิดจากน้ำเลี้ยงราเอนโคไฟต์ *Alternaria* sp. (ต่อ)

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
429-529	BE016	2 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	79.0
530-736	BE017	2 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	677.2
737-900	BE018	2-4 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้มปน ของแข็งสีขาว	900.0
901-980	BE019	4 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	409.8
981-1044	BE020	4-6 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	233.7
1045-1064	BE021	6 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	137.0
1065-1120	BE022	6 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	146.3
1121-1174	BE023	6-10 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้มผสม ของแข็งสีขาว	127.2
1175-1189	BE024	10-15 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	88.1
1190-1250	BE025	15 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	280.1
1251-1264	BE026	15-20 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	69.0
1265-1370	BE027	20-40% เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้มอมน้ำตาล	315.7
1371-1387	BE028	40-100% เมธานอลในไคคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	339.1

4.7.1.1 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ 1

สารประกอบ 1 เป็นผลึกสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE014-BE015 ของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิดจากน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 2 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทนเป็นตัวชะจะได้ครูดสีเหลืองปนของแข็งสีขาวแล้วนำมาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน จากนั้นนำไปตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-ไคคลอโรมีเทน จะได้ผลึกสีขาวหนัก 44.33 มิลลิกรัม (0.20 % w/v) (สารประกอบ 1) ซึ่งสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม



$R_f = 0.36$ (10 % MeOH ใน CH_2Cl_2)

mp = 156-157 °C

mp = 157-158 °C (Nitech และคณะ, 1967)

$[\alpha]_D^{20} -132$ (c 0.024, CH_2Cl_2)

$[\alpha]_D^{20} -133$ (c 1.0, EtOH) (Nitech และคณะ, 1967)

$[\alpha]_D^{24} -124$ °C (c 0.4, ethanol) (Pei-Sheng Yan, 2004)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของสารประกอบ 1 (รูปที่ 1 ภาคผนวก ก) ดังแสดงใน ตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 1

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3213	ต่ำ	N-H สันแบบขีดของ Amine
2966	ต่ำ	C-H สันแบบขีดของ Alkane
1677	สูง	C=O สันแบบขีดของ Aldehyde
1558	ปานกลาง	N-H สันแบบงอของ Amine
1430	ปานกลาง	C-H สันแบบงอของ CH_3

δ_H (CDCl_3 , 400 MHz): 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_a), 2.10 (1H, m, 4- H_b), 2.10 (1H, m, 10- H_a), 2.17 (1H, m, 5- H_a), 2.39 (1H, ddd, $J = 2.8, 7.2$ และ 13.2 Hz, 5- H_b), 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) ppm (รูปที่ 3 ในภาคผนวก ก)

δ_C (CDCl_3 , 100 MHz): 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) ppm (รูปที่ 4 ในภาคผนวก ก)

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ 1 ประกอบด้วย gHSQC, gHMBC, gCOSY และ gNOESY (รูปที่ 5-8 ในภาคผนวก ก)

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ **1** (รูปที่ 2 ภาคผนวก ก) พบว่าสารประกอบ **1** m/z : 211.1443 $[M+H]^+$; cal 211.1446 ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของ สารประกอบ **1** คือ $C_{11}H_{18}N_2O_2$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 4 จากข้อมูล ^{13}C -NMR พบ 2 สัญญาณของคาร์บอนคาร์บอนิลที่ δ_c 166.2 และ 170.22 ppm และทำให้ทราบว่า สารประกอบ **1** ประกอบด้วยวง 2 วง

จากผลของ HSQC พบ 21.2 และ 23.4 2 สัญญาณของหมู่เมทิล ($d, J = 6.8$ Hz) δ_H 0.55 และ 1.04 ppm ซึ่งเป็นของคาร์บอนที่ δ_c 21.2 และ 23.4 ppm ตามลำดับ และคาร์บอนที่ตำแหน่งค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_c 22.8 ppm เป็นสัญญาณของเมทิลีนคาร์บอน (methylene carbon) ซึ่งปรากฏสัญญาณโปรตอนที่มี δ_H 1.97 และ 2.07 ppm จากคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (^{13}C -NMR spectrum, $CDCl_3$, 100 MHz) 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) ที่ตำแหน่ง 1.56 และ 2.10 ppm คาร์บอนที่ตำแหน่ง 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

จากผลของ 1H -NMR และ COSY พบว่าโปรตอน H-3 และ H_a -4, H_b -4 ซึ่งมีค่าเคมีคอลชิฟท์ (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}C -NMR และ HSQC (รูปที่ 5 ภาคผนวก. ก) พบ 2 สัญญาณของหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ คาร์บอนที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_c , ppm) 170.2 และ 166.2 ppm พบ 3 สัญญาณของเมทิลีนคาร์บอนที่ 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 **1** มีหมู่คาร์บอนิล 2 หมู่ และมีวง 2 วง

จากผลของ COSY ยังพบความสัมพันธ์ระหว่าง H-5 และ H-6 ซึ่งมีสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H , ppm) 2.17 และ 4.16 ppm ซึ่งอยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกัน

จากผลของ HMBC จะเห็นความสัมพันธ์ระหว่าง H-5 และ H-6 กับหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ที่ 172.2 ppm จึงทำให้ทราบว่า สารประกอบ **1** มีลิวซีนเป็นส่วนประกอบ

จากผลของ ของ $^1\text{H-NMR}$ 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 ที่ติดกับไนโตรเจนอะตอม และ H-10 ที่มีค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{H} , ppm) 4.06 และ 2.10 ppm ตามลำดับที่อยู่บนคาร์บอนที่อยู่ติดกัน

จากข้อมูล HMBC และความสัมพันธ์ระหว่าง H-10 และ H-9 กับคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอไมด์ที่มีค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{C} , ppm) 166.2 ppm ข้อมูลที่กล่าวข้างต้นทำให้พบว่า สารประกอบ **1** มีโพลินเป็นองค์ประกอบ

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดกล่าวได้ว่าสารประกอบ **1** เป็น cyclic ของ dipeptide ของกรดอะมิโนลิวซีนและโพลินเป็นองค์ประกอบ

รวมทั้งแสดงผลแสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ **1** ดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ **1**

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	5.9	-	-	-

ตารางที่ 4.13 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C})	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	gHMBC	gCOSY	gNOESY
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-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

เมื่อค้นหาข้อมูลการวิจัยของสารชนิดนี้พบว่าเคยมีรายงานแล้ว จึงเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้รายงานแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}) ของสารประกอบ 1 เทียบกับ
cyclo(L-Leu-L-Pro) (Pei-Sheng และคณะ, 2004 และ Madeline และคณะ, 1995)

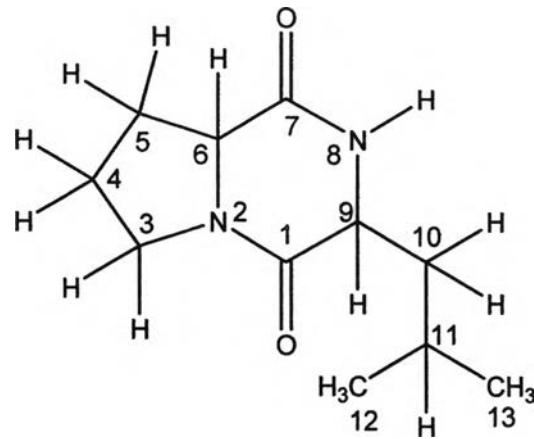
ตำแหน่ง	สารประกอบ 1 (CDCl ₃ , 400 MHz)		Cyclo(L-Leu-L-Pro) (CDCl ₃ , 500 MHz)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	-	166.2	-	166.1
2	-	NH	-	-
3	3.61 (2H, m, 3-H)	45.6	3.56 (2H, m, 3-H)	45.4
4	2.06 (1H, m, 4-H)	22.8	1.98-2.09 (2H, m, 4-H)	22.7
	1.94 (1H, m, 4-H)		1.90 (1H, m, 4-H)	

ตารางที่ 4.14 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}) ของสารประกอบ **1** เทียบกับ cyclo(L-Leu-L-Pro) (Pei-Sheng และคณะ, 2004 และ Madeline และคณะ, 1995) (ต่อ)

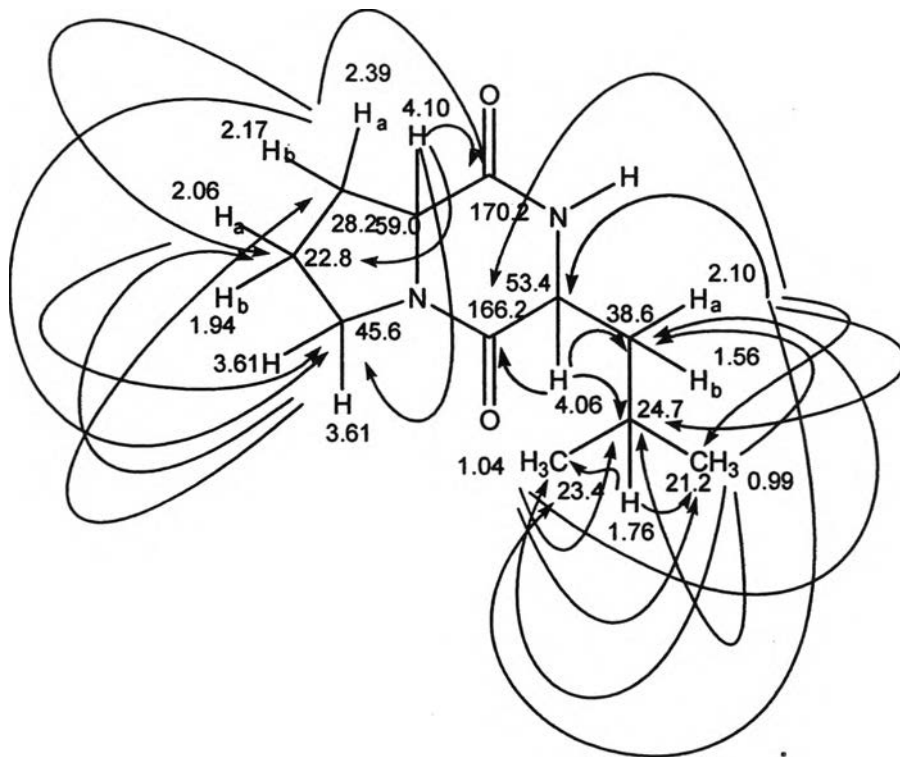
ตำแหน่ง	สารประกอบ 1 (CDCl_3 , 400 MHz)		Cyclo(L-Leu-L-Pro) (CDCl_3 , 500 MHz)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
5	2.39 (1H, ddd, $J = 2.8, 7.2$ และ 13.2 Hz, 5-H)	28.2	2.35 (1H, dddd, $J = 3.2, 8.0,$ 8.0 และ 12.8 Hz, 5-H)	28.1
	2.17 (1H, m, 5-H)		2.13 (1H, m, 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, 10-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 5-8 ในภาคผนวก ค) ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.14 ข้อมูลจากแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) และการเปรียบเทียบ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ **1** กับ Cyclo(L-Leu-L-Pro) (Pei-Sheng และคณะ, 2004 และ Madeline และคณะ, 1995) พบว่าสารทั้งสองมีค่าเคมีคอลชิฟท์ใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ **1** คือ

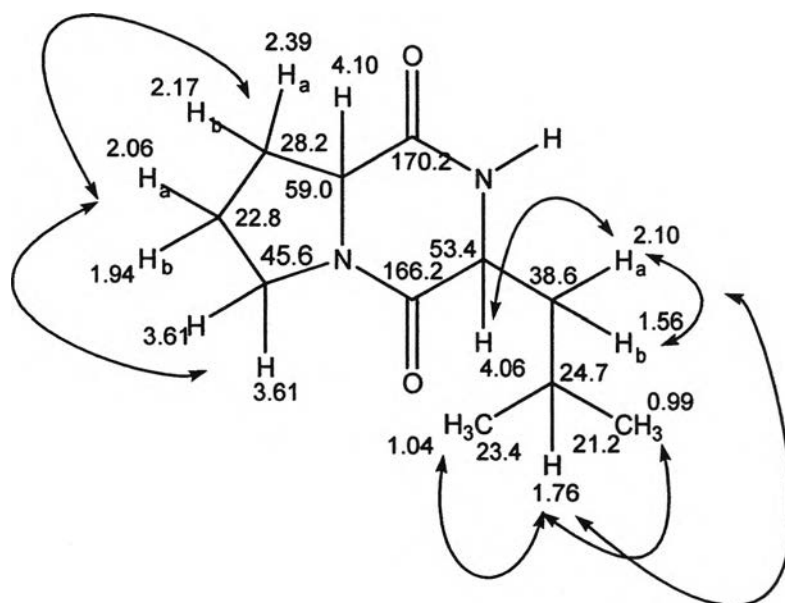
Cyclo(L-Leu-L-Pro) หรือ 3-isobutyl-hexahydropyrido [1, 2- α] pyrazine-1, 4-dione ที่มีโครงสร้างดัง
รูปที่ 4.32-4.35



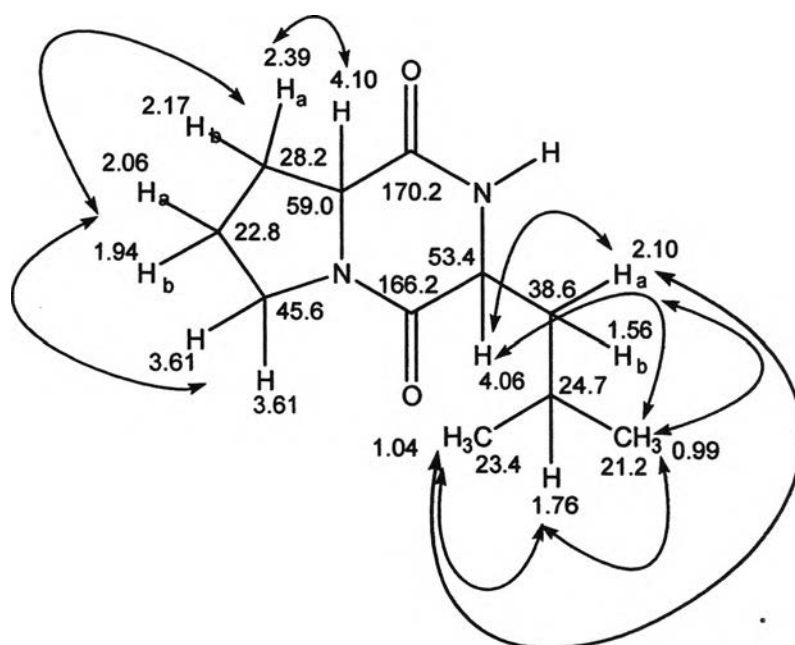
รูปที่ 4.32 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 1



รูปที่ 4.33 gHMBC ของสารประกอบ 1

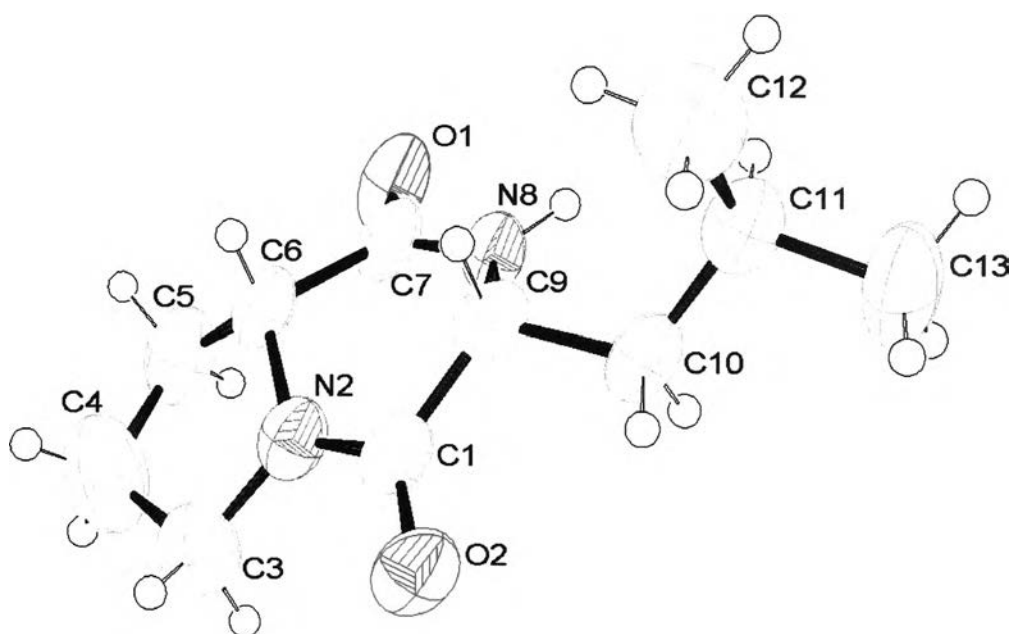


รูปที่ 4.34 gCOSY ของสารประกอบ 1



รูปที่ 4.35 gNOESY ของสารประกอบ 1

นอกจากนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารประกอบ 1 เป็น cyclo(L-Leu-L-Pro) จึงได้ทำ X-ray ซึ่งผลแสดงดังรูปที่ 4.36



รูปที่ 4.36 โครงสร้าง X-ray ของสารประกอบ 1

จากการทดลองนี้พบสาร cyclo(L-Leu-L-Pro) เป็นครั้งแรกในราจีนัส *Alternaria* sp. นอกจากนั้นเป็นรายงานการพบสาร cyclo(L-Leu-L-Pro) จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ตัวอย่างเช่น

ในปี 2002 Yongcheng Lin และคณะ ได้รายงานการพบ Cyclo(L-Leu-L-Pro) จากเชื้อรา *Veruculina enalia* No. 2606 จากต้นโกงการในทะเลสาบ Bahamas (Yongcheng Lin และคณะ, 2002)

Cyclo(L-Leu-L-Pro) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการผลิต aflatoxin จากเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ชนิดใหม่สามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรีย (Pei-Sheng และคณะ, 2004) โดยสารชนิดนี้จะไปยับยั้งการผลิตสาร norsolorinic acid ที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง aflatoxin จากเชื้อรา *A. parasiticus*

มีรายงานว่า Cyclo(L-Leu-L-Pro) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ vancomycin-resistance enterococci (VRE) และ pathogenic yeasts รวมทั้งยังมีคุณสมบัติเป็น anti-mutagenic activity ใน *Samonella typhimurium* TA 98 และ TA 100 (Ki-Hyeong, 2004)

นอกจากนั้นในปี 2005 มีรายงานการพบ Diketopiperazines จากส่วนสกัดของน้ำเลี้ยงรา *Aspergillus fumigatus* โดยพบสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ (Niego A. J. C. Furtado และคณะ, 2005)

4.7.1.2 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ 2

สารประกอบ 2 เป็นผลึกสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE017 ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซิเตดจากน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ จากนั้นนำมาลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งโดยใช้ 100% ไดคลอโรมีเทน-เมธานอลเป็นตัวชะ พบว่าส่วนที่ 129-132 โดยใช้ 5% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ มีผลึกสีขาวปนกับน้ำมันสีส้ม จากนั้นล้างน้ำมันสีส้มออกจากด้วยไดคลอโรมีเทนและเมธานอล แล้วกรองแยกผลึกออกมา แล้วนำมาตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ได้ผลึกสีขาวหนัก 21.2 มิลลิกรัม (0.0964%) ละลายได้ในคิวเทอร์เรียมออกไซด์

สารประกอบ 2 มีค่า

$$\text{mp} = 314\text{-}315\text{ }^{\circ}\text{C}$$

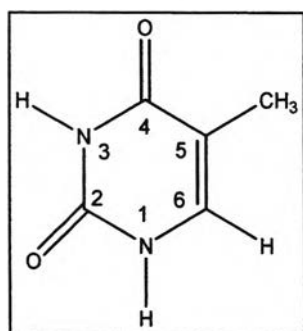
$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 6 \text{ (c 0.05, H}_2\text{O)}$$

$$\lambda_{\text{max}} \text{ CH}_2\text{Cl}_2 \text{ (}\epsilon\text{): 264.06 \text{ นาโนเมตร (รูปที่ 9 ในภาคผนวก ค)}$$

$$\lambda_{\text{max}} \text{ H}_2\text{O (}\epsilon\text{): 263.75 \text{ นาโนเมตร (Fashman, G.D.,1975)}$$

$$V_{\text{max}}(\text{KBr}): 3449 \text{ (m), 2925 (m), 1670 (s), 1448 (m)}$$

$$\text{และ } 770 \text{ (m) cm}^{-1} \text{ (รูปที่ 10 ในภาคผนวก ค)}$$



ตารางที่ 4.15 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 2

แถบการดูดกลืนแสง (cm ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3259	ปานกลาง	N-H สั่นแบบยืดของ Amine
2954	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ Alkane
1677	สูง	C=O สั่นแบบยืดของ Ketone
1439	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ CH ₃

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 2 (รูปที่ 11 ภาคผนวก ค) พบว่าสารประกอบนี้มีมวลโมเลกุล $[M+H]^+$ m/z : 127.0521; cal 127.0507 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 2 คือ C₇H₈N₂O₂ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 4

δ_{H} (DMSO, 400 MHz): 2.48 (3H, s, CH₃), 7.22 (1H, s, 6-H), 10.57 (1H, s, 1-H) และ 10.96 (1H, s, 3-H) ppm (รูปที่ 12 ในภาคผนวก ค)

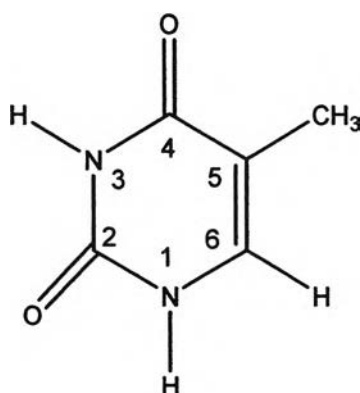
δ_{C} (DMSO, 100 MHz): 12.2 (C-5), 108.1 (C-5), 138.2 (C-6), 151.9 (C-4) และ 165.3 (C-2) ppm (รูปที่ 13 ในภาคผนวก ค)

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ (รูปที่ 13 ภาคผนวก ค) พบสัญญาณ carbonyl carbons ที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_{c} 151.9 และ 165.3 ppm พบสัญญาณ olefinic methine carbon ที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_{c} 137.8 ppm และ พบสัญญาณ methyl carbon ที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ δ_{c} 12.2 ppm ดังนั้นสารประกอบ 2 มีหมู่คาร์บอนิล 2 หมู่ พันธะคู่ 1 พันธะ และมีวง 1 วง

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีพบว่าสารประกอบ 2 คือ Thymine ซึ่งมีข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 2 เทียบกับ Thymine แสดงดังตารางที่ 4.16 และโครงสร้างของสารประกอบ 2 แสดงดังรูปที่ 4.37

ตารางที่ 4.16 เปรียบเทียบ $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 2 กับ Thymine

ตำแหน่ง	สารประกอบ 2		Thymine (Pretsch, 2000)	
	δ_{c} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{c} (125 MHz)	δ_{H} (500 MHz)
1	-	10.57	-	ไม่รายงาน
2	165.3 (s)	-	162.5 (s)	ไม่รายงาน
3	-	10.98	-	ไม่รายงาน
4	151.9 (s)	-	151.6 (s)	ไม่รายงาน
5	107.8 (s)	-	108.1 (s)	ไม่รายงาน
6	137.8 (s)	7.22	138.1 (s)	ไม่รายงาน
7	12.2 (s)	2.48	11.9 (s)	ไม่รายงาน

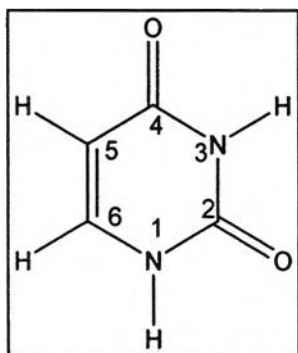


รูปที่ 4.37 โครงสร้างของสารประกอบ 2

4.7.1.3 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ 3

สารประกอบ 3 เป็นผงสีขาว ซึ่งได้มาจากสารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากส่วนน้ำเลี้ยง ปริมาณ 4.41 กรัม และได้จากลำดับส่วนที่ BE 018 ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากน้ำเลี้ยง เชื้อ ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2-4 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ กรองแยกผงสีขาวออกมาโดยล้างด้วยไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ได้ผงสีขาวหนัก 149 มิลลิกรัม (รวม 4.559 กรัม)(20.72 % w/v)

สารประกอบ 3



mp = 326-329 °C

$[\alpha]_D^{20}$ -10 (c 0.075, EtOAc+H₂O)

λ_{max} (EtOH :H₂O) (ε): 256.97 nm ; (รูปที่ 14 ในภาคผนวก ค)

V_{max} (KBr): 3420 (m), 1738(s), 1671 (m) และ 854 (s) cm⁻¹ (รูปที่ 15 ในภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.17 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 3

แถบการดูดกลืนแสง (cm ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3420	ปานกลาง	N-H สันแบบยืดของ Amine
1738	สูง	C-H สันแบบยืดของ Alkane
1671	ปานกลาง	C=O สันแบบยืดของ Ketone
858	สูง	C-H สันแบบงอของวงนารอบ

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 3 (รูปที่ 16 ภาคผนวก ค) พบว่าสารประกอบนี้มีมวลโมเลกุล $[M+H]^+$ m/z : 113.0370; cal 113.0351 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 3 คือ C₄H₄N₂O₂ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 4

δ_H (DMSO, 400 MHz): 3.73 (1H, dd, J = 3.6 และ 4.8 Hz, 6-H) และ 4.13 (1H, dd, J = 4.4 และ 6.0 Hz, 3-H) ppm (รูปที่ 17 ในภาคผนวก ค)

δ_C (DMSO, 100 MHz): 100.7 (C-5), 142.7 (C-6), 152.2 (C-2) และ 164.3 (C-4) ppm (รูปที่ 18 ในภาคผนวก ค)

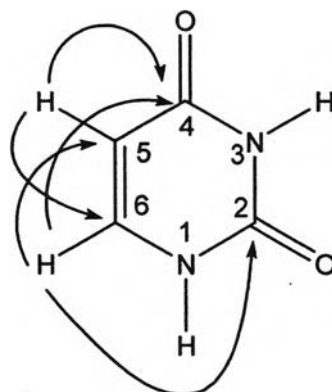
ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ **3** ประกอบด้วย gHSQC, gHMBC, gCOSY และ gNOESY (รูปที่ 19-22 ในภาคผนวก ค)

โดยอาศัยข้อมูลจากคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมและ HSQC (รูปที่ 19 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 **3** 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

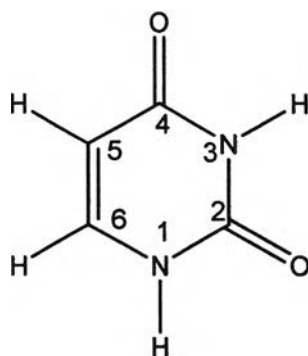


จากผลของสเปกโตรสโคปีทั้งหมดสรุปได้ว่าสารประกอบ **3** มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.38 คือ pyrimidine-2,4(1H, 3H)-dione หรือ uracil

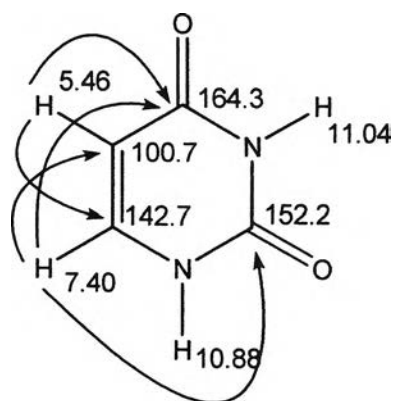
ตารางที่ 4.18 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 3

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

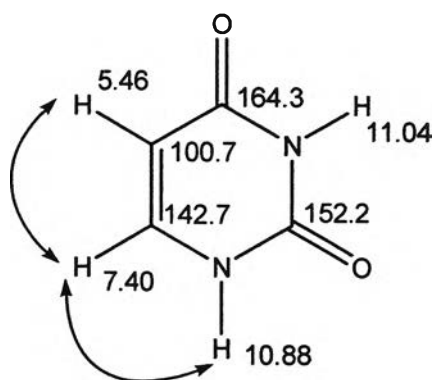
จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY (รูปที่ 19-22 ในภาคผนวก ค) ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (รูปที่ 17) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (รูปที่ 18) ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.16 และข้อมูลจากแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 3 คือ Uracil หรือ pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.38-4.41



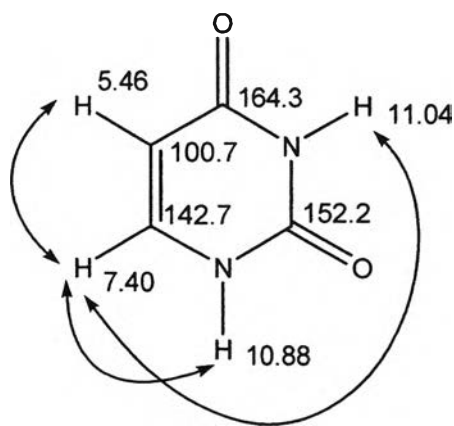
รูปที่ 4.38 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 3



รูปที่ 4.39 gHMBC ของสารประกอบ 3



รูปที่ 4.40 gCOSY ของสารประกอบ 3



รูปที่ 4.41 gNOESY ของสารประกอบ 3

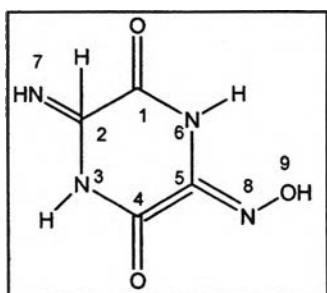
Alyssa และ คณะ พบว่า Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus brevis* sp. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* sp. และ *Leuconostoc mesenteroides*) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* และ *Debaryomyces hansenii*) และเชื้อรา (*Alternaria solani* และ *Cladosporium* sp.) สามารถเปลี่ยน Uridine ที่มีอยู่ในมะเขือเทศสุกให้เป็น Uracil ได้ (Alyssa และ คณะ, 2005)

จากงานวิจัยของ Rajendra, P. M. และคณะ, 2001 สามารถแยก Uracil ได้จากสารสกัดหยาบเอริลอะซีเตดจาก Limnic bacteria เมื่อเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani เป็นเวลา 3 วัน ที่ 28 °C

4.7.1.4 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ 4

สารประกอบ 4 เป็นผลึกสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ BE023 ของสารสกัดหยาบเอริลอะซีเตดจากน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 6-10 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะล้างน้ำมันสีส้มออกด้วยเมธานอลแล้วกรองแยกผลึกออกมา ได้ผลึกสีขาวหนัก 31.9 มิลลิกรัม (สารประกอบ 4) ละลายได้ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์

สารประกอบ 4



MW = 158

mp = 229-230 °C

$[\alpha]_{20}^D -7(c 0.05, EtOH:H_2O, 1:1)$

สารประกอบ **4** ละลายได้ในไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) และ EtOH : H₂O ในอัตราส่วน 50:50 มีจุดหลอมเหลว 229-230 °C

FT-IR สเปกตรัม (KBr), ν_{\max} (cm⁻¹): 3438 (s), 1720 (m), 1529 (s) และ 1181 (s) cm⁻¹
(รูปที่ 23 ในภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.19 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ **4**

แถบการดูดกลืนแสง (cm ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3438, 3337	สูง	N-H สั่นแบบยืดของ Amine
3061, 3186	สูง	NH ₂ สั่นแบบยืดของ Amine
1781,1720	ปานกลาง	C=O สั่นแบบยืดของ Ketone
2762	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ Ketone
1666	สูง	C-N สั่นแบบงอนอกระนาบ

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ **4** (รูปที่ 24 ภาคผนวก ค) พบว่าสารประกอบมีมวลโมเลกุล $[M+Na]^+$ m/z : 181.0038; cal 181.0036 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของ สารประกอบ **4** คือ C₄H₆N₄O₃ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 4

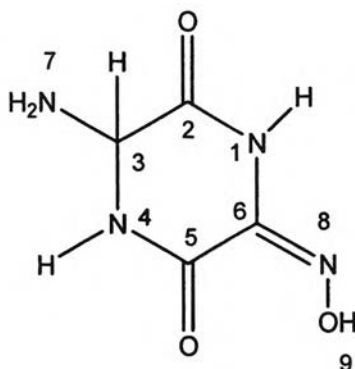
จากผลของ COSY พบว่า δ_H 5.21 ppm มีความสัมพันธ์กับ δ_H 6.92 ppm ทำให้ทราบว่าตำแหน่ง N-3 อยู่ใกล้เคียงกับ C-2

จากผลของ HMBC พบว่า H-4 มีความสัมพันธ์กับ C-2, C-3, C-5 และ H-3 มีความสัมพันธ์กับ C-2 และ C-5 ทำให้ทราบว่า C-3 และ C-4 อยู่ใกล้เคียงกับหมู่คาร์บอนิล และ H-7 มีความสัมพันธ์กับ C-3 ทำให้ทราบว่า N-7 ใกล้เคียงกับ C-3 และ H-9 มีความสัมพันธ์กับ C-6 ทำให้ทราบว่า O-9 อยู่ใกล้เคียงกับ C-6

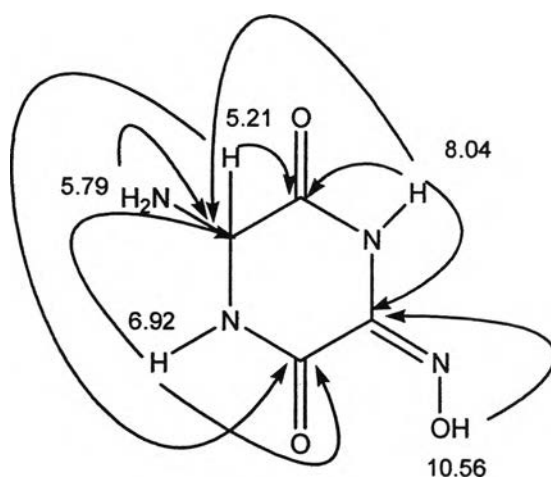
จากข้อมูล 2D-NMR (รูปที่ 27-30 ในภาคผนวก ค) ประกอบกับข้อมูล ¹H-NMR (รูปที่ 25) และ ¹³C-NMR (รูปที่ 26) ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.19 และข้อมูลจากแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ **4** คือ 3-amino-6-(hydroxyamino)piperazine-2,5-dione ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.42-4.45

ตารางที่ 4.20 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 4

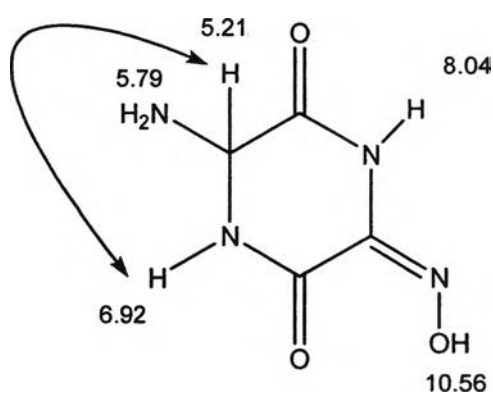
ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_c)	$^1\text{H-NMR}$ (δ_H)	gHMBC	gCOSY	gNOESY
1-NH	-	8.04 (s)	C-2, C-3, C-6	-	-
2	174.0	-	-	-	-
3	62.8	5.21 (2H, d, $J=8\text{Hz}$)	C-2, C-5	H-4	H-4
4-NH	-	6.92 (1H, d, $J=8\text{Hz}$)	C-2, C-3, C-5	H-3	H-3, H-7
5	157.9	-	-	-	-
6	157.2	-	-	-	-
7-NH ₂	-	5.79 (s)	-	-	H-4
8	-	-	-	-	-
9-OH	-	10.56 (s)	C-6	-	-



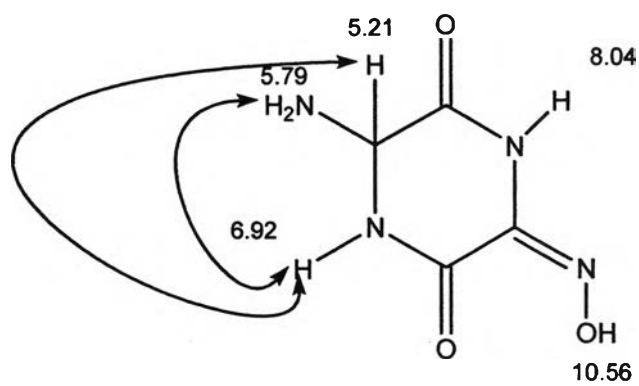
รูปที่ 4.42 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 4



รูปที่ 4.43 gHMBC ของสารประกอบ 4



รูปที่ 4.44 gCOSY ของสารประกอบ 4



รูปที่ 4.45 gNOESY ของสารประกอบ 4

4.7.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย น้ำหนัก 700 มิลลิกรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (81.40 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร ตัวชะที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ

ตารางที่ 4.21 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใยราเอนโคไฟต์ *Alternaria* sp.

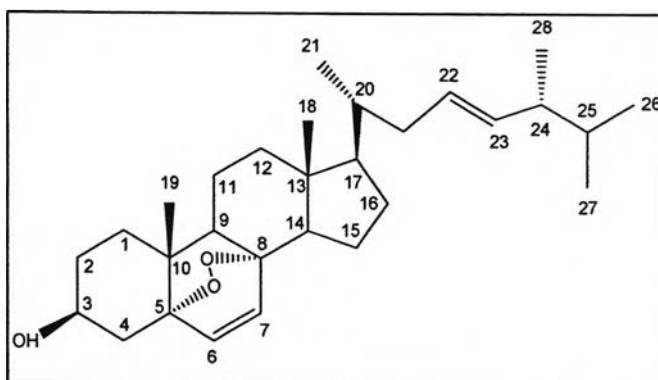
ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
1-8	ME01	50 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองใส	3.72
9-14	ME02	50 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	4.75
15-40	ME03	50 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	22.6
41-50	ME04	40 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองปน ของแข็งสีขาว	31.9
51-60	ME05	40 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองส้ม ปนน้ำมัน	19.8
61-89	ME06	40-30 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองปน น้ำมัน	2.25
90-143	ME07	30-25 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองอ่อน เหนียว	7.87
144-229	ME08	25-20% เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	2.63
230-260	ME09	20-15% เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล	10.5
261-464	ME010	15-0% เฮกเซนในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล	22.7
465-505	ME011	100% ไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล	30.1
506-514	ME012	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	12.1
515-549	ME013	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง	23.1
550-569	ME014	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองปน ของแข็งสีขาว	17.0
570-634	ME015	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองส้ม ปนน้ำมัน	23.3
635-669	ME016	2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลืองปน น้ำมัน	21.9

ตารางที่ 4.21 การแยกส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใยราเอนโคไฟต์ *Alternaria* sp. (ต่อ)

ลำดับส่วนที่ (ก่อน)	ลำดับส่วนที่ (หลัง)	ตัวชะ	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)
670-719	ME017	2-2. % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีเหลือง อ่อนเหนียว	22.2
720-815	ME018	2.5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีส้ม	19.9
816-894	ME019	2.5-3 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล	11.3
895-995	ME020	4-6 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล เข้ม	21.2
956-970	ME021	6% เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล เข้ม	23.4
971-10	ME022	6-8 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล เข้ม	15.5
1061-1127	ME023	8-15 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล	28.3
1128-1150	ME024	15 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล ส้ม	28.5
1151-1187	ME025	15-20 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล	16.5
1188-1209	ME026	20-30 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน	สารสกัดหยาบสีน้ำตาล เข้ม	10.2
1210-1217	ME027	50-100% เมธานอลในไดคลอโรมี เทน	น้ำมันสีเหลืองใส	79.8

4.7.2.1 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติทางเคมีของสารประกอบ 5

สารประกอบ 5 เป็นของแข็งสีขาว ซึ่งได้มาจากลำดับส่วนที่ ME04 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลอะซิเตตจากเส้นใย ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 40 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ได้น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว แล้วนำล้างส่วนน้ำมันออกด้วยเฮกเซนจะได้ของแข็งสีขาวหนัก 21.4 มิลลิกรัม (0.0973%)



$R_f = 0.65$ (50 % Hexane ใน CH_2Cl_2)

mp = 182-183°C

V_{max} (KBr): 3424 (br), 2953 (s), 2863(s), 1703 (m), 1633 (m), 1555 (m), 1450 (m), 1365(m), 1267 (w), 1225 (w), 1155 (w), 1038 (m) และ 960 (m) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.22 (รูปที่ 31 ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 4.22 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารประกอบ 5

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3424	กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของ alcohol
2953, 2863	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ Alkane
1633, 1555	ปานกลาง	C=C สั่นแบบยืดของ double bond
1450, 1365	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ Alkane
1267, 1225, 1155	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืดของ Ketone
1038	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดของ Ketone
960	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอนอกระนาบ

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารประกอบ 5 (รูปที่ 32 ภาคผนวก ค) พบว่าสารประกอบมีมวลโมเลกุล $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z : 433.1627; cal 433.1627 ทำให้รู้สูตรโมเลกุลของ สารประกอบ 5 คือ $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$

จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ 5 (รูปที่ 33 ภาคผนวก ค) พบตำแหน่งของโปรตอนที่สำคัญตามที่ค่าเคมีคอลชิฟต์ δ_{H} 6.53 (1H, d, $J = 4.8$, H-6), 6.27 (1H, d, $J = 8.4$, H-7) 5.25 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-22), 5.18 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-23), 4.00 (1H, m, H-3), 2.14 (1H, m, H-1), 2.07 (1H, m, H-20), 2.04 (1H, m, H-12), 1.98 (1H, m, H-4), 1.95 (1H, m, H-1), 1.89 (1H, m, H-24), 1.87 (1H, m, H-2), 1.78 (1H, m, H-15), 1.74 (1H, m, H-4), 1.64

(1H, m, H-11), 1.60 (1H, m, H-14), 1.58 (1H, m, H-2), 1.53 (1H และ 1H, m และ m, H-9 และ H-16), 1.52 (1H, m, H-25), 1.42 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-2), 1.28 (1H, m, H-12), 1.26 (1H และ 1H, m และ m, H-16 และ H-17), 1.03 (3H, d, $J = 6.0$, H-27), 0.95 (3H, d, $J = 6.8$, H-28), 0.93 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, $J = 6.0$, H-26), 0.85 (3H, s, H-18) และ 0.84 (3H, d, $J = 6.0$, H-21) ppm
 ที่ตำแหน่งของโปรตอน 6.53, 6.27, 5.25 และ 5.18 ppm แสดงโปรตอนของคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งโปรตอน 2.07, 1.89, 1.60, 1.53, 1.52 และ 1.26 ppm แสดงโปรตอนของเทอร์เชียรีคาร์บอน (-CH)

ที่ตำแหน่งโปรตอน 2.14, 2.04, 1.98, 1.95, 1.87, 1.78, 1.74, 1.64, 1.58, 1.53, 1.42, 1.38, 1.28 และ 1.26 ppm แสดงโปรตอนของเมทิลีนคาร์บอน (-CH₂)

ที่ตำแหน่งโปรตอน 1.03, 0.95, 0.91, 0.87, 0.85 และ 0.84 ppm แสดงโปรตอนของเมทิลคาร์บอน

จาก ¹³C-NMR ของสารประกอบ **5** (รูปที่ 34 ภาคผนวก ค) พบตำแหน่ง 135.44 (CH-7), 135.22 (CH-23), 132.31 (CH-22), 130.75 (CH-6), 82.20 (C-8), 79.46 (C-5), 66.46 (CH-3), 56.19 (CH-17), 51.69 (CH-14), 51.08 (CH-9), 44.58 (C-13), 42.79 (CH-24), 39.77 (CH-20), 39.35 (CH-12), 36.98 (C-10), 36.92 (CH₂-1), 34.70 (CH₂-4), 33.08 (CH-25), 30.10 (CH₂-2), 28.68 (CH₂-15), 23.42 (CH₂-16), 20.90 (CH₃-27), 20.65 (CH₂-11), 19.98 (CH₃-26), 19.67 (CH₃-21), 18.21 (CH₃-19), 17.59 (CH₃-28) และ 12.89 (CH₃-18) ppm

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 135.44, 135.22, 132.31 และ 130.75 ppm แสดงถึงคาร์บอนที่มีพันธะคู่

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 82.20, 79.46, 44.58 และ 36.98 ppm แสดงถึงควอเทอนารีคาร์บอน

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 56.19, 51.69, 51.08, 42.79, 39.77 และ 33.08 ppm แสดงถึงเทอร์เชียรีคาร์บอน

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 39.35, 36.92, 34.70, 30.10, 28.68, 23.42 และ 20.65 ppm แสดงถึงเมทิลีนคาร์บอน

ที่ตำแหน่งคาร์บอน 20.90, 19.98, 19.67, 18.21, 17.59 และ 12.89 ppm แสดงถึงเมทิลคาร์บอน

ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารประกอบ **5** ประกอบด้วย gHSQC, gHMBC, gCOSY และ gNOESY (รูปที่ 35-38 ในภาคผนวก ค)

รวมทั้งแสดงผลแสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ **5** ดังตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 5

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_c)	$^1\text{H-NMR}$ (δ_H)	gHMBC	gCOSY	gNOESY
1	36.92	2.14 (1H, m), 1.95 (1H, m)	C2, C-3, C-8, C-10 C-3	H-19 -	H-19 -
2	30.10	1.87 (1H, m), 1.58 (1H, m)	C-4 -	- H-3	H-9 -
3	66.46	4.00 (1H, m)	-	H-2	-
4	34.70	1.98 (1H, m), 1.74 (1H, m)	- -	-	- -
5	79.46	-	-	-	-
6	130.75	6.53 (1H, d, $J=$ 4.8)	C-5, C-8, C-9	H-7	H-7
7	135.44	6.27 (1H, d, $J=$ 8.4)	C-5, C-8	H-6	H-6
8	82.20	-	-	-	-
9	51.08	1.53 (1H, m)	C-5, C-7, C-14	-	H-2, H-19
10	36.98	-	-	-	-
11	20.65	1.64 (1H, m), 1.42 (1H, m)	C-9 C-14	- -	- H-14
12	39.35	2.04 (1H, m), 1.28 (1H, m)	C-17 C-9	- -	- -
13	44.58	-	-	-	-
14	51.69	1.60 (1H, m)	C-11, C-13, C-15	-	H-11
15	28.68	1.78 (1H, m), 1.38 (1H, m)	- C-14, C-17	- -	H-11 -

ตารางที่ 4.23 แสดงข้อมูล 1D และ 2D ของสารประกอบ 5 (ต่อ)

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR (δ_c)	¹ H-NMR (δ_H)	gHMBC	gCOSY	gNOESY
16	23.42	1.53 (1H, m), 1.26 (1H, m)	C-13, C-14 C-13, C-15	H-17 -	H-21, H-18
17	56.19	1.26 (1H, m)	C-13, C-15	H-16	H-16
18	12.89	0.85 (3H, s)	C-14, C-17	-	H-16, H-17
19	18.21	0.93 (3H, s)	C-1, C-4, C-8, C-9, C-10	-	H-1, H-9
20	39.77	2.07 (1H, m)	C-17	-	-
21	19.67	0.84 (3H, d, $J =$ 6.0)	C-13, C-14, C-17, C-20, C-24, C-25, C- 26	-	H-16
22	132.3113 2.31	5.25 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ J_2 $= 14.8$)	C-20, C-24, C-26	H-23	H-23
23	135.22	5.18 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ J_2 $= 14.8$)	C-20, C-24	H-22, H-24	H-22
24	42.79	1.89 (1H, m)	C-22, C-23	H-23, H-28	H-28
25	33.08	1.52 (1H, m)	C-22, C-24, C-26, C- 28	H-26	-
26	19.98	0.87 (3H, d, J $= 6.0$)	C-24, C-27	H-25	-
27	20.90	1.03 (3H, d, J $= 6.0$)	C-23, C-23	-	-
28	17.59	0.95 (3H, d, J $= 6.8$)	C-22, C-24, C-25	H-24	H-24

เมื่อทำการค้นหาข้อมูลการวิจัยของสารชนิดนี้พบว่าเคยมีรายงานแล้ว จึงทำการ
เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้รายงานแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 4.24

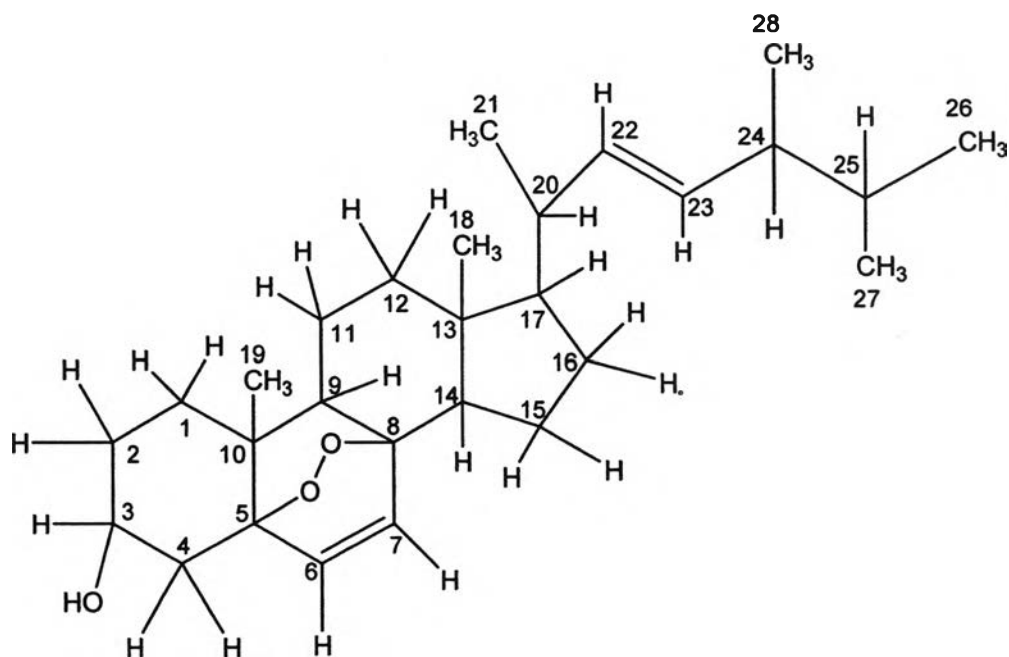
ตารางที่ 4.24 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสารประกอบ 5 กับ Ergosterol peroxide

ตำแหน่ง	สารประกอบ 5		Ergosterol peroxide (Bok, 1999)	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (50 MHz)	δ_{H} (500 MHz)
1	36.92 (t)	2.14 (m), 1.95 (m)	39.4 (t)	ไม่รายงาน
2	30.10 (t)	1.87 (m), 1.58 (m)	30.1 (t)	ไม่รายงาน
3	66.46 (d)	4.00 (m)	66.3 (d)	3.92 (m)
4	34.70 (t)	1.98 (m), 1.74 (m)	51.2 (t)	ไม่รายงาน
5	79.46 (s)	-	79.4 (s)	-
6	130.75 (d)	6.53 (d, $J = 4.8$)	130.7 (d)	5.95 (d, $J = 4.8$)
7	135.44 (d)	6.27 (d, $J = 8.4$)	135.4 (d)	6.29 (d, $J = 8.4$)
8	82.20 (s)	-	82.7 (s)	-
9	51.08 (d)	1.53 (m)	34.7 (d)	ไม่รายงาน
10	36.98 (s)	-	36.9 (s)	-
11	20.65 (t)	1.64 (m), 1.42 (m)	20.9 (t)	ไม่รายงาน
12	39.35 (d)	2.04 (m), 1.28 (m)	39.4 (d)	ไม่รายงาน
13	44.58 (s)	-	44.6 (s)	-
14	51.69 (d)	1.60 (m)	51.7 (d)	ไม่รายงาน
15	28.68 (t)	1.78 (m), 1.38 (m)	28.6 (t)	ไม่รายงาน
16	23.42 (t)	1.53 (m), 1.26 (m)	23.4 (t)	ไม่รายงาน
17	56.19 (d)	1.26 (m)	56.3 (d)	ไม่รายงาน
18	12.89 (q)	0.85 (s)	12.9 (q)	0.61 (s)
19	18.21 (q)	0.93 (s)	18.7 (q)	0.67 (s)
20	39.77 (d)	2.07 (m)	39.7 (d)	ไม่รายงาน
21	19.67 (q)	0.84 (d, $J = 6.0$)	19.6 (q)	1.00 (d, $J = 6.49$)
22	132.31 (d)	5.25 (dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$)	132.3 (d)	5.25 (dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 15.3$)

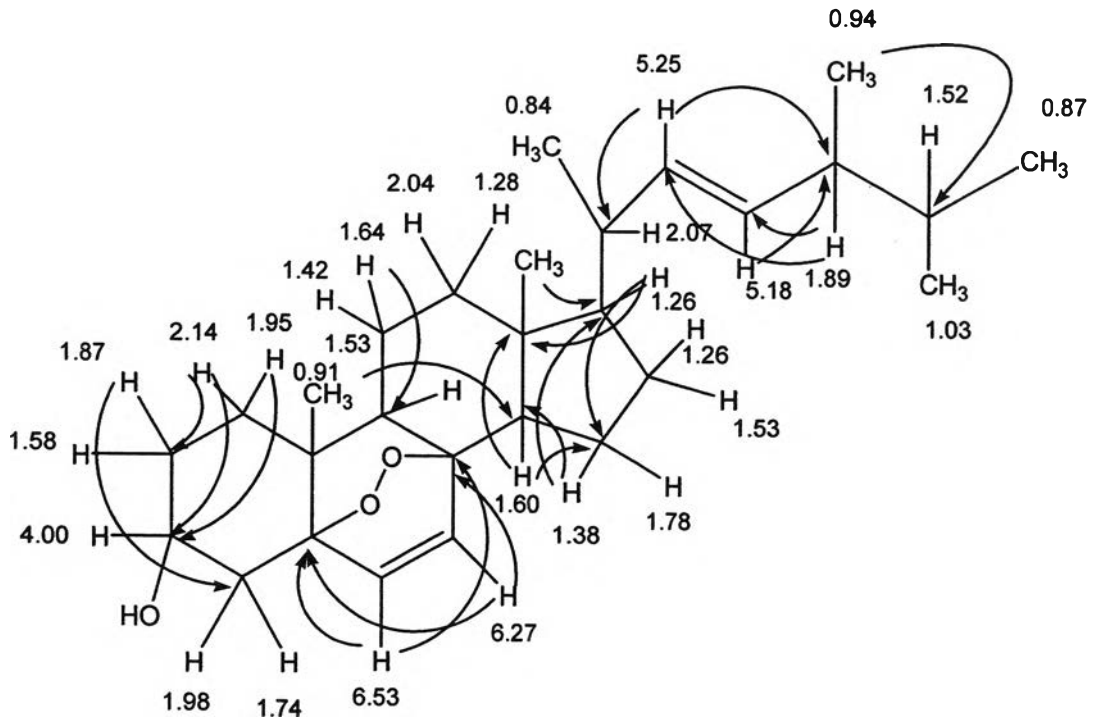
ตารางที่ 4.24 เปรียบเทียบ ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสารประกอบ 5 กับ Ergosterol peroxide (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ 5		Ergosterol peroxide (Bok, 1999)	
	δ_{C} (100 MHz)	δ_{H} (400 MHz)	δ_{C} (50 MHz)	δ_{H} (500 MHz)
23	135.22 (d)	5.18 (dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$)	135.2 (d)	5.14 (dd, $J_1 = 8.4$ และ $J_2 = 15.3$)
24	42.79 (d)	1.89 (m)	42.8 (d)	ไม่รายงาน
25	33.08 (d)	1.52 (m)	33.0 (d)	ไม่รายงาน
26	19.98 (q)	0.87 (d, $J = 6.0$)	19.9 (q)	0.91 (d, $J = 6.8$)
27	20.90 (q)	1.03 (d, $J = 6.0$)	20.7 (q)	0.91 (d, $J = 6.7$)
28	17.59 (q)	0.95 (d, $J = 6.8$)	17.5 (q)	

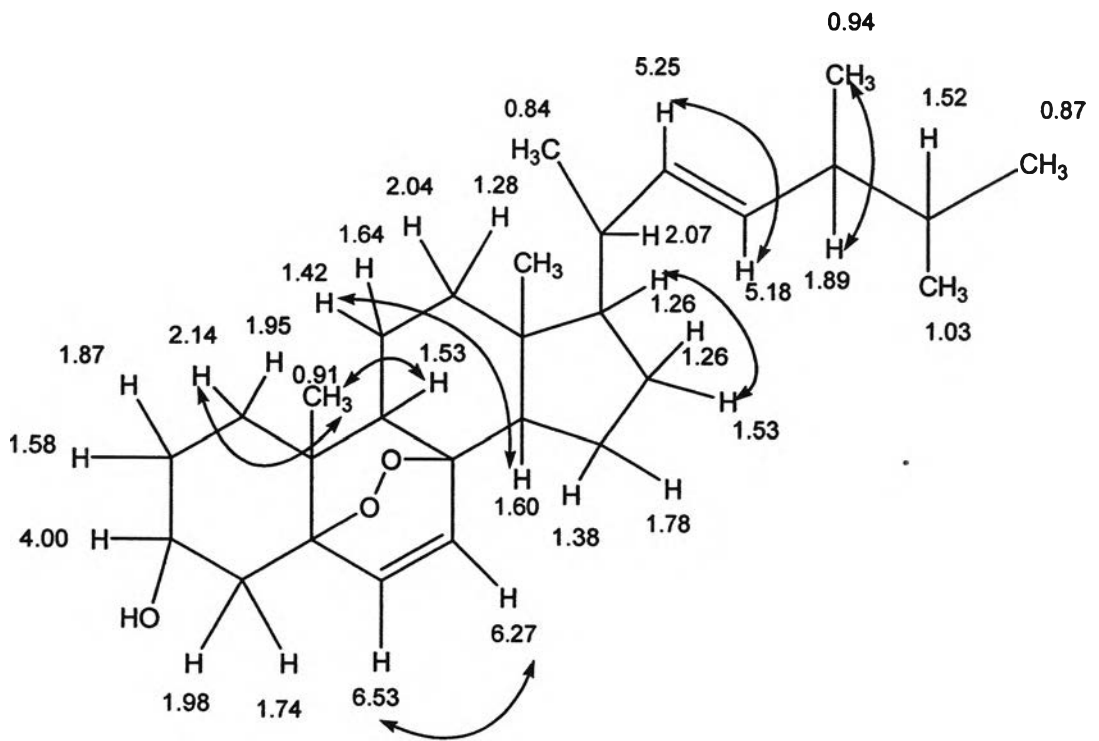
จากข้อมูลทางสเปกโทสโกปี และการเปรียบเทียบค่าเคมีคอลชิฟท์ของคาร์บอน-13 และโปรตอนของสารประกอบ 5 กับ ergosterol peroxide (Bok, 1999) พบว่า สารทั้งสองมีค่าเคมีคอลชิฟท์ใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 5 คือ ergosterol peroxide ($5\alpha,8\alpha$ -epidioxy-24(R)-methyl-cholesta-6,22-dien-3 β -ol) ซึ่งสารชนิดนี้มีรายงานเคยพบในรา *Alternaria* sp. (Zhang, H.L. และคณะ, 2005) มีโครงสร้างดังรูปที่ 4.46-4.49



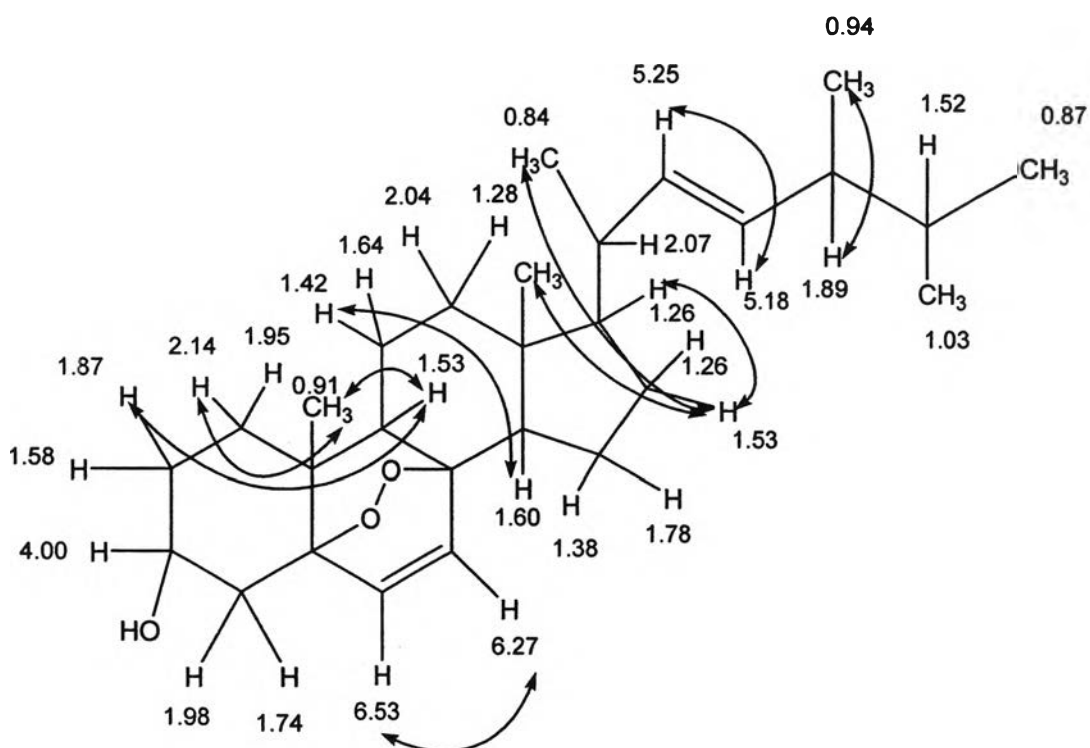
รูปที่ 4.46 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ 5



รูปที่ 4.47 gHMBC ของสารประกอบ 5



รูปที่ 4.48 gCOSY ของสารประกอบ 5



รูปที่ 4.49 g NOESY ของสารประกอบ 5

Ergosterol peroxide เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถพบได้ในราและพืชบางชนิด มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าว โดยสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดตัวอย่างเช่น

Kahlos และ คณะ ได้สกัดและแยก ergosterol peroxide จากรา *Inonotus rariatus* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งซาร์โคมา (Walker 256) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 42 และ 35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Kahlos และคณะ , 1989)

Bok และ คณะ สกัดและแยก ergosterol peroxide จากเชื้อรา *Cordyceps sinensis* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (K526, Jurkat, HL-60 และRPMI-8226), เซลล์มะเร็งผิวหนัง (WM-1341) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 65, 48, 60, 63 และ 49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Bok และ คณะ , 1999)

Cantrell และคณะ สกัดและแยก ergosterol peroxide จากต้น *Ajuga remota* Benth. และทดสอบความเป็นพิษต่อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Cantrell และคณะ, 1999)

Nam และ คณะ สกัดและแยก ergosterol peroxide จากเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1), เซลล์มะเร็งตับ (SNU-354) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่(SNU-C4) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.2, 2.2 และ 4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Nam และ คณะ , 2001)

Takei และ คณะ สกัดและแยก ergosterol peroxide จากเห็ด *Sarcodon asparatus* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Takei และ คณะ, 2005)

4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC)(Jorgensen และคณะ, 1999)

จากสารประกอบที่ทำการแยกได้ คือ Cyclo(L-Leu-L-Pro), Thymine, Uracil, 3-amino-6-(hydroxyamino)piperazine-2,5-dione (สารประกอบ 4) และ ergosterol peroxide นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) โดยใช้ Penicillin G, Erythromycin, Sulfadimidine และ Streptomycin เป็น positive control สำหรับแบคทีเรีย ใช้ Iprodine และ Ketoconazole เป็น positive control สำหรับยีสต์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.25

ตารางที่ 4.25 ค่า MIC ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

สาร	ค่า MIC ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ [$\mu\text{g} / \text{ml}$ (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
Cyclo(L-Leu-L-Pro)	1.96 (9.28)	-	62.5 (296.0)	-	31.25 (148)
Thymine	-	-	-	-	-
Uracil	-	-	-	-	-
สารประกอบ 4	15.63 (98.92)	-	-	-	1.96 (12.40)
ergosterol peroxide	7.82 (23.84)	-	31.25 (95.27)	-	62.5 (190.55)
Penicillin G	0.5 (1.40)	0.5 (1.40)	-	-	-
Erythromycin	0.025 (0.034)	0.025 (0.034)	-	-	-
Sulfadimidine	0.5 (1.797)	0.5 (1.797)	-	-	-
Streptomycin	0.5 (0.343)	0.5 (0.343)	0.5 (0.343)	0.5 (0.343)	-
Iprodine	-	-	-	-	50 (30.29)
Ketoconazole	-	-	-	-	50 (18.82)

หมายเหตุ (-) หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 125 $\mu\text{g} / \text{ml}$

จากตารางที่ 4.25 จะเห็นได้ว่า สารประกอบ 4 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 1.96 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (12.40 μM) และ 15.63 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (98.92 μM) รองลงมาคือ Cyclo(L-Leu-L-Pro) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 1.96 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (9.28 μM), 62.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (296.0 μM) และ 31.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (31.25 μM) ตามลำดับ และ ergosterol peroxide มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 7.82 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (23.84 μM), 31.25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (95.27 μM), และ 62.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (190.55 μM) ตามลำดับ ในขณะที่ Thymine และ Uracil ไม่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์